

**THESE
POUR LE DIPLOME D'ETAT
DE DOCTEUR EN PHARMACIE**

**Soutenu publiquement le lundi 14 octobre 2024
Par Mlle BITAN Joan**

**VALIDATION DE LA CYTOTOXICITÉ DES CELLULES CAR-T ANTI-CD19
DANS UN CONTEXTE DE LEUCÉMIE AIGUË MYÉLOÏDE EN RECHUTE OU
RÉFRACTAIRE EXPRIMANT LE CD19**

Membres du jury :

Président :

Madame le Professeur Annabelle DUPONT, PU-PH (CHU de Lille)

Directeur de thèse :

Madame le Docteur Julie DEMARET, MCU-PH (CHU de Lille)

Assesseurs :

Madame le Professeur Myriam LABALETTE, PU-PH (CHU de Lille)

Monsieur le Professeur Ibrahim YAKOUB-AGHA, PU-PH (CHU de Lille)

LISTE DES ENSEIGNANTS

Université de Lille

Président	Régis BORDET
Premier Vice-président	Etienne PEYRAT
Vice-présidente Formation	Corinne ROBACZEWSKI
Vice-président Recherche	Olivier COLOT
Vice-président Ressources humaines	Bertrand DÉCAUDIN
Directrice Générale des Services	Anne-Valérie CHIRIS-FABRE

UFR3S

Doyen	Dominique LACROIX
Premier Vice-Doyen, Vice-Doyen RH, SI et Qualité	Hervé HUBERT
Vice-Doyenne Recherche	Karine FAURE
Vice-Doyen Finances et Patrimoine	Damien CUNY
Vice-Doyen International	Vincent DERAMECOURT
Vice-Doyen Coordination pluriprofessionnelle et Formations sanitaires	Sébastien D'HARANCY
Vice-Doyenne Formation tout au long de la vie	Caroline LANIER
Vice-Doyen Territoire-Partenariats	Thomas MORGENROTH
Vice-Doyen Santé numérique et Communication	Vincent SOBANSKI
Vice-Doyenne Vie de Campus	Anne-Laure BARBOTIN
Vice-Doyen étudiant	Valentin ROUSSEL

Faculté de Pharmacie

Doyen	Delphine ALLORGE
Premier Assesseur et	
Assesseur à la Santé et à l'Accompagnement	Anne GARAT
Assesseur à la Vie de la Faculté et	
Assesseur aux Ressources et Personnels	Emmanuelle LIPKA
Responsable des Services	Cyrille PORTA
Représentant étudiant	Honoré GUISE
Chargé de mission 1er cycle	Philippe GERVOIS
Chargée de mission 2eme cycle	Héloïse HENRY
Chargé de mission Accompagnement et Formation à la Recherche	Nicolas WILLAND
Chargé de mission Relations Internationales	Christophe FURMAN
Chargée de Mission Qualité	Marie-Françoise ODOU
Chargé de mission dossier HCERES	Réjane LESTRELIN

Professeurs des Universités - Praticiens Hospitaliers (PU-PH)

Civ.	Nom	Prénom	Service d'enseignement	Section CNU
Mme	ALLORGE	Delphine	Toxicologie et Santé publique	81
M.	BROUSSEAU	Thierry	Biochimie	82
M.	DÉCAUDIN	Bertrand	Biopharmacie, Pharmacie galénique et hospitalière	81
M.	DINE	Thierry	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique	81
Mme	DUPONT-PRADO	Annabelle	Hématologie	82
Mme	GOFFARD	Anne	Bactériologie - Virologie	82
M.	GRESSIER	Bernard	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique	81
M.	ODOU	Pascal	Biopharmacie, Pharmacie galénique et hospitalière	80
Mme	POULAIN	Stéphanie	Hématologie	82
M.	SIMON	Nicolas	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique	81
M.	STAELS	Bart	Biologie cellulaire	82

Professeurs des Universités (PU)

Civ.	Nom	Prénom	Service d'enseignement	Section CNU
M.	ALIOUAT	El Moukhtar	Parasitologie - Biologie animale	87
Mme	AZAROUAL	Nathalie	Biophysique - RMN	85
M.	BERLARBI	Karim	Physiologie	86
M.	BERTIN	Benjamin	Immunologie	87
M.	BLANCHEMAIN	Nicolas	Pharmacotechnie industrielle	85
M.	CARNOY	Christophe	Immunologie	87
M.	CAZIN	Jean-Louis	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique	86
M.	CUNY	Damien	Sciences végétales et fongiques	87
Mme	DELBAERE	Stéphanie	Biophysique - RMN	85
Mme	DEPREZ	Rebecca	Chimie thérapeutique	86
M.	DEPREZ	Benoît	Chimie bioinorganique	85
M.	DURIEZ	Patrick	Physiologie	86
M.	ELATI	Mohamed	Biomathématiques	27
M.	FOLIGNÉ	Benoît	Bactériologie - Virologie	87
Mme	FOULON	Catherine	Chimie analytique	85
M.	GARÇON	Guillaume	Toxicologie et Santé publique	86
M.	GOOSSENS	Jean-François	Chimie analytique	85
M.	HENNEBELLE	Thierry	Pharmacognosie	86
M.	LEBEGUE	Nicolas	Chimie thérapeutique	86
M.	LEMDANI	Mohamed	Biomathématiques	26
Mme	LESTAVEL	Sophie	Biologie cellulaire	87
Mme	LESTRELIN	Réjane	Biologie cellulaire	87
Mme	LIPKA	Emmanuelle	Chimie analytique	85
Mme	MELNYK	Patricia	Chimie physique	85
M.	MILLET	Régis	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert Lespagnol	86
Mme	MUHR-TAILLEUX	Anne	Biochimie	87
Mme	PERROY	Anne-Catherine	Droit et Economie pharmaceutique	86
Mme	RIVIÈRE	Céline	Pharmacognosie	86
Mme	ROMOND	Marie-Bénédicte	Bactériologie - Virologie	87
Mme	SAHPAZ	Sevser	Pharmacognosie	86
M.	SERGHERAERT	Éric	Droit et Economie pharmaceutique	86
M.	SIEPMANN	Juergen	Pharmacotechnie industrielle	85
Mme	SIEPMANN	Florence	Pharmacotechnie industrielle	85
M.	WILLAND	Nicolas	Chimie organique	86

Maîtres de Conférences - Praticiens Hospitaliers (MCU-PH)

Civ.	Nom	Prénom	Service d'enseignement	Section CNU
Mme	CUVELIER	Élodie	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique	81
Mme	DANEL	Cécile	Chimie analytique	85
Mme	DEMARET	Julie	Immunologie	82
Mme	GARAT	Anne	Toxicologie et Santé publique	81
Mme	GENAY	Stéphanie	Biopharmacie, Pharmacie galénique et hospitalière	81
M.	GRZYCH	Guillaume	Biochimie	82
Mme	HENRY	Héloïse	Biopharmacie, Pharmacie galénique et hospitalière	80
M.	LANNOY	Damien	Biopharmacie, Pharmacie galénique et hospitalière	80
Mme	MASSE	Morgane	Biopharmacie, Pharmacie galénique et hospitalière	81
Mme	ODOU	Marie-Françoise	Bactériologie - Virologie	82

Maîtres de Conférences des Universités (MCU)

Civ.	Nom	Prénom	Service d'enseignement	Section CNU
Mme	ALIOUAT	Cécile-Marie	Parasitologie - Biologie animale	87
M.	ANTHÉRIEU	Sébastien	Toxicologie et Santé publique	86
Mme	AUMERCIER	Pierrette	Biochimie	87
M.	BANTUBUNGI-BLUM	Kadiombo	Biologie cellulaire	87
M.	BERTHET	Jérôme	Biophysique - RMN	85
M.	BOCHU	Christophe	Biophysique - RMN	85
M.	BORDAGE	Simon	Pharmacognosie	86
M.	BOSC	Damien	Chimie thérapeutique	86
Mme	BOU KARROUM	Nour	Chimie bioinorganique	
M.	BRIAND	Olivier	Biochimie	87
Mme	CARON-HOUDE	Sandrine	Biologie cellulaire	87
Mme	CARRIÉ	Hélène	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique	86
Mme	CHABÉ	Magali	Parasitologie - Biologie animale	87
Mme	CHARTON	Julie	Chimie organique	86
M.	CHEVALIER	Dany	Toxicologie et Santé publique	86
Mme	DEMANCHE	Christine	Parasitologie - Biologie animale	87
Mme	DEMARQUILLY	Catherine	Biomathématiques	85
M.	DHIFLI	Wajdi	Biomathématiques	27
Mme	DUMONT	Julie	Biologie cellulaire	87
M.	EL BAKALI	Jamal	Chimie thérapeutique	86
M.	FARCE	Amaury	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert Lespagnol	86
M.	FLIPO	Marion	Chimie organique	86
M.	FRULEUX	Alexandre	Sciences végétales et fongiques	
M.	FURMAN	Christophe	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert Lespagnol	86
M.	GERVOIS	Philippe	Biochimie	87
Mme	GOOSSENS	Laurence	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert Lespagnol	86
Mme	GRAVE	Béatrice	Toxicologie et Santé publique	86
M.	HAMONIER	Julien	Biomathématiques	26

Mme	HAMOUDI-BEN YELLES	Chérifa-Mounira	Pharmacotechnie industrielle	85
Mme	HANNOTHIAUX	Marie-Hélène	Toxicologie et Santé publique	86
Mme	HELLEBOID	Audrey	Physiologie	86
M.	HERMANN	Emmanuel	Immunologie	87
M.	KAMBIA KPAKPAGA	Nicolas	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique	86
M.	KARROUT	Younes	Pharmacotechnie industrielle	85
Mme	LALLOYER	Fanny	Biochimie	87
Mme	LECOEUR	Marie	Chimie analytique	85
Mme	LEHMANN	Hélène	Droit et Economie pharmaceutique	86
Mme	LELEU	Natascha	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert Lespagnol	86
M.	LIBERELLE	Maxime	Biophysique - RMN	
Mme	LOINGEVILLE	Florence	Biomathématiques	26
Mme	MARTIN	Françoise	Physiologie	86
M.	MENETREY	Quentin	Bactériologie - Virologie	
M.	MOREAU	Pierre-Arthur	Sciences végétales et fongiques	87
M.	MORGENROTH	Thomas	Droit et Economie pharmaceutique	86
Mme	MUSCHERT	Susanne	Pharmacotechnie industrielle	85
Mme	NIKASINOVIC	Lydia	Toxicologie et Santé publique	86
Mme	PINÇON	Claire	Biomathématiques	85
M.	PIVA	Frank	Biochimie	85
Mme	PLATEL	Anne	Toxicologie et Santé publique	86
M.	POURCET	Benoît	Biochimie	87
M.	RAVAUX	Pierre	Biomathématiques / Innovations pédagogiques	85
Mme	RAVEZ	Séverine	Chimie thérapeutique	86
Mme	ROGEL	Anne	Immunologie	
M.	ROSA	Mickaël	Hématologie	
M.	ROUMY	Vincent	Pharmacognosie	86
Mme	SEBTI	Yasmine	Biochimie	87
Mme	SINGER	Elisabeth	Bactériologie - Virologie	87
Mme	STANDAERT	Annie	Parasitologie - Biologie animale	87
M.	TAGZIRT	Madjid	Hématologie	87
M.	VILLEMAGNE	Baptiste	Chimie organique	86
M.	WELTI	Stéphane	Sciences végétales et fongiques	87
M.	YOUS	Saïd	Chimie thérapeutique	86
M.	ZITOUNI	Djamel	Biomathématiques	85

Professeurs certifiés

Civ.	Nom	Prénom	Service d'enseignement
Mme	FAUQUANT	Soline	Anglais
M.	HUGES	Dominique	Anglais
Mme	KUBIK	Laurence	Anglais
M.	OSTYN	Gaël	Anglais

Professeurs Associés

Civ.	Nom	Prénom	Service d'enseignement	Section CNU
M.	DAO PHAN	Haï Pascal	Chimie thérapeutique	86
M.	DHANANI	Alban	Droit et Economie pharmaceutique	86

Maîtres de Conférences Associés

Civ.	Nom	Prénom	Service d'enseignement	Section CNU
M.	COUSEIN	Etienne	Biopharmacie, Pharmacie galénique et hospitalière	
Mme	CUCCHI	Malgorzata	Biomathématiques	85
M.	DUFOSSEZ	François	Biomathématiques	85
M.	FRIMAT	Bruno	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique	85
M.	GILLOT	François	Droit et Economie pharmaceutique	86
M.	MITOUMBA	Fabrice	Biopharmacie, Pharmacie galénique et hospitalière	86
M.	PELLETIER	Franck	Droit et Economie pharmaceutique	86

Assistants Hospitalo-Universitaire (AHU)

Civ.	Nom	Prénom	Service d'enseignement	Section CNU
M.	BOUDRY	Augustin	Biomathématiques	
Mme	DERAMOUDT	Laure	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique	
Mme	GILLIOT	Sixtine	Biopharmacie, Pharmacie galénique et hospitalière	
M.	GISH	Alexandr	Toxicologie et Santé publique	
Mme	NEGRIER	Laura	Chimie analytique	

Hospitalo-Universitaire (PHU)

Civ.	Nom	Prénom	Service d'enseignement	Section CNU
M.	DESVAGES	Maximilien	Hématologie	
Mme	LENSKI	Marie	Toxicologie et Santé publique	

Attachés Temporaires d'Enseignement et de Recherche (ATER)

Civ.	Nom	Prénom	Service d'enseignement	Section CNU
Mme	BERNARD	Lucie	Physiologie	
Mme	BARBIER	Emeline	Toxicologie	
Mme	COMAPGNE	Nina	Chimie Organique	
Mme	COULON	Audrey	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique	
M.	DUFOSSEZ	Robin	Chimie physique	
Mme	KOUAGOU	Yolène	Sciences végétales et fongiques	
M.	MACKIN MOHAMOUR	Synthia	Biopharmacie, Pharmacie galénique et hospitalière	

Enseignant contractuel

Civ.	Nom	Prénom	Service d'enseignement
M.	MARTIN MENA	Anthony	Biopharmacie, Pharmacie galénique et hospitalière
M.	MASCAUT	Daniel	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique
Mme	NDIAYE-BOIDIN	Maguette	Anglais
M.	ZANETTI	Sébastien	Biomathématiques



L'Université n'entend donner aucune approbation aux opinions émises dans les thèses ; celles-ci sont propres à leurs auteurs.



UFR3S-Pharmacie - 3, rue du Professeur Laguesse - 59000 Lille
T. +33 (0)3 20 96 40 40 - <https://pharmacie.univ-lille.fr>

REMERCIEMENTS

À la présidente de jury de thèse,

Madame le Professeur Annabelle Dupont

Professeur des Universités – Praticien Hospitalier

Laboratoire d'Hématologie – Secteur Hémostase, CHU de Lille

C'est un grand honneur que vous me faites en acceptant la présidence de mon jury de thèse. Je tenais également à vous remercier pour toute votre aide, écoute et disponibilité tout au long de mon internat. Soyez assurée de ma reconnaissance et de mon plus grand et profond respect.

Aux assesseurs,

Madame le Professeur Myriam Labalette

Professeur des Universités – Praticien Hospitalier

Institut d'Immunologie, CHU de Lille

C'est un réel honneur que vous ayez accepté de participer à ce jury de thèse. Votre avis rigoureux sur ce travail est pour moi une immense chance, et je vous en suis profondément reconnaissante. Je tiens également à vous remercier chaleureusement de m'avoir accueillie dans votre institut tout au long de cette année. J'ai eu l'opportunité d'acquérir et de perfectionner des connaissances fondamentales en immunologie. J'ai beaucoup apprécié de pouvoir évoluer au sein de votre équipe de biologistes, d'ingénieurs et de techniciens, dont l'expertise et l'engagement m'ont profondément inspirée. Je vous réitère mes sincères remerciements pour votre soutien, votre écoute, votre disponibilité et la confiance que vous m'avez accordée tout au long de cette année.

Monsieur le Professeur Ibrahim YAKOUB-AGHA

Professeur des Universités – Praticien Hospitalier

Responsable de l'unité allogreffe de cellules souches

Service des Maladies du Sang – Hôpital Claude Huriez, CHU de Lille

C'est un véritable honneur que vous ayez accepté de juger et d'évaluer ce travail en tant qu'assesseur de ce jury de thèse. Je tiens à vous exprimer ma profonde admiration pour votre engagement dans la recherche et l'influence de vos travaux, en particulier dans le domaine des thérapies cellulaires. Collaborer avec vous, notamment lors de mon internat au laboratoire HLA pour la greffe de cellules souches, a été un réel plaisir. J'ai pu approfondir mes connaissances et mieux comprendre les enjeux dans ce domaine.

À ma directrice de thèse,

Madame le Docteur Julie DEMARET

Maître de Conférences des Universités – Praticien Hospitalier

Institut d'Immunologie, CHU de Lille

Je tiens à vous exprimer ma plus profonde gratitude pour votre encadrement et votre soutien tout au long de cette thèse. Je vous remercie également de m'avoir confié ce sujet si passionnant et d'actualité. Votre expertise, vos conseils avisés et votre disponibilité ont été essentiels à la réalisation de ce travail. Vous avez su m'orienter avec bienveillance et rigueur, et à toujours viser la précision et l'excellence. J'ai beaucoup appris à vos côtés sur le plan humain et professionnel. Vous êtes une source d'inspiration et un modèle de persévérance. Je suis également honorée d'avoir pu bénéficier de vos compétences scientifiques et de votre encadrement. Vous avez toute ma reconnaissance. Je tiens à réitérer mes remerciements pour tout le soutien, l'aide et l'écoute que vous m'avez offerts.

À mes parents,

Je tiens à exprimer ma profonde affection à mes parents, ma mère Cathy et mon père Jean-Pierre, qui ont été mes piliers tout au long de ce parcours. Votre soutien inconditionnel, vos encouragements et votre amour m'ont permis de réaliser mes rêves. Merci d'avoir toujours cru en moi et de m'avoir offert les opportunités nécessaires pour progresser. Vous m'avez transmis les plus belles valeurs, tant dans le monde du travail que dans la vie personnelle. Votre persévérance, votre sérieux, votre rigueur, votre bonne humeur et votre générosité sans limite sont des qualités pour lesquelles je vous admire profondément et que j'aspire à incarner dans ma propre vie. Je ne serais pas la personne que je suis aujourd'hui sans vous.

À ma sœur,

Je souhaite également exprimer mes sincères remerciements à ma sœur, Lauren, dont la présence et le soutien constant ont été une véritable source de réconfort et d'inspiration pour moi. Merci pour tous les moments précieux que nous avons partagés et pour avoir toujours été là pour me soutenir dans mes choix. Tu es une personne extraordinaire, dotée de valeurs humaines remarquables. En tant que ma confidente, ma plus grande conseillère et la personne avec qui je partage tout, tu illumines ma vie. Ton sens aiguisé du style, que ce soit dans le choix d'une tenue ou dans ton travail où tu excelles, est impressionnant. Merci infiniment d'être toujours à mes côtés, ma petite sœur chérie. Je suis tellement fière de toi.

À mes grands-parents,

J'aurais tellement aimé que vous soyez présents parmi nous pour partager ce moment, mais la vie en a décidé autrement. J'espère que, de là où vous êtes, vous m'entendez. Votre sagesse, votre bonne humeur, votre joie, votre gentillesse... La liste de vos qualités est si longue qu'aucune page de cette thèse ne pourrait suffire. J'ai eu la chance incroyable de vous connaître et de vous avoir eu à mes côtés pendant tant d'années, et au début de cette aventure professionnelle. Je vous remercie, Mamie Raymonde, Mamie Juliette, Papi Gad et Papi Meyer, pour toutes les belles valeurs que vous m'avez transmises, ainsi que pour l'amour inconditionnel que vous m'avez toujours offert. Vous me manquez énormément, et je pense à vous tous les jours.

À mes oncles et tantes,

Je tiens à remercier mes oncles et tantes. Je me remémore avec plaisir les grands repas chez tata Sandra et tonton Avi avec tata Paulette et tata Sandrine, les parties de belote ou d'autres jeux de cartes autour de la table avec tata Liliane, tata Joëlle, et tonton Aimé, où chacun rivalisait d'ingéniosité avec des stratégies plus folles les unes que les autres, le tout en musique grâce aux chants de tonton Élie. Les fous rires que nous avons partagés tous ensemble, notamment grâce aux blagues de tonton Franck, restent gravés dans ma mémoire. Merci également à tata Michèle et tonton Alain. À mes regrettés tata Peggy, tonton Yves et tonton Charlie, avec qui j'ai partagé de si précieux instants que je garde dans mon cœur. Vous me manquez énormément.

À mes cousines et à mes cousins,

Merci à tous mes cousins (David, Mickael, Yoram, Nathan, Gad, Jonathan, Gad, Elliot, Jérémy, Yanniv, Max, Teddy et Rudy) et à mes cousines (Laurence, Shannon, Audélia, Chany et Johanna), avec qui j'ai partagé des souvenirs mémorables. Chaque moment passé ensemble est comme une véritable bouffée d'oxygène, et j'apprécie toujours ces instants de convivialité. Nos rires, nos échanges et nos voyages, ainsi que tous les instants passés en votre compagnie, sont précieux à mes yeux. J'ai hâte de vivre encore de nombreux moments ensemble aux quatre coins du monde. Je suis également enchantée que certains d'entre vous aient trouvé l'amour, élargissant ainsi notre famille et ajoutant des joyeuses célébrations à notre histoire (Jessica, Catia, Léa, Laurie, Ilan, Marjorie, Sophie, Éléonor, Eliran).

Aux équipes des laboratoires de mes différents stages,

Je tiens à exprimer ma gratitude au Professeur Delphine Borgel pour son enseignement, sa confiance en moi, son soutien et sa bienveillance depuis ma deuxième année d'études. Merci infiniment de m'avoir accueillie dans votre équipe de recherche en M1 puis dans votre service clinique, où j'ai eu l'opportunité de travailler avec des personnes brillantes comme François, Dominique, Fanny, Maximilien et Allan, avec qui j'ai gardé contact. Vous restez un modèle de réussite et de motivation.

Je tiens à remercier toute l'équipe de pharmacie clinique et du CRPV de l'HEGP (Agnès, Christine et Roya), où j'ai effectué mon stage en tant qu'externe.

Un grand merci à l'équipe de Saint-Louis de m'avoir accueillie en tant que FFI. J'ai enfin pu explorer les domaines du HLA et de l'immunologie. J'ai effectué mes premiers pas dans la greffe de cellules souches et de moelle osseuse, et j'ai eu l'opportunité de trouver des donneurs pour des cas complexes. Tout cela a été possible grâce à une équipe bienveillante de biologistes (Kahina, Pascale, Vincent, Débora, Jean-Luc et Sophie) et de techniciens (Salvatore, Estelle, Anne-Claire, Catherine). Vous avez renforcé ma détermination à poursuivre ma carrière dans cette voie.

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude à l'équipe de microbiologie du CH de Béthune, où j'ai débuté en tant qu'interne en biologie médicale. Votre accueil chaleureux, notamment durant cette période difficile du COVID, a été une véritable lumière pour moi, petite parisienne perdue dans le Pas-de-Calais. Un grand merci à Magali, Aurélie (pour nos chansons de JJG), Olivier (pour nos discussions sur l'astronomie), ainsi qu'à Sophie, Dominique, et à toute l'équipe de techniciens qui a su instaurer une ambiance joyeuse au laboratoire.

Un immense merci à toute l'équipe de biochimie et d'hormonologie du CHU de Lille. Vous m'avez accueillie dans des conditions idéales. Chaque garde à vos côtés est un réel plaisir. Vous avez tout mon respect et mon estime ! Mentions spéciales aux chansons au ukulélé avec Lucie et Jaime, à notre grand patriarche Patrice, aux conversations profondes avec Caroline, aux contrôles avec Amel, sans oublier les gardes-anniversaires avec Noémie et Jacob, les élastiques qui s'envolent avec Aurore, et les discussions mode et mariage avec Aurélie, Sylvie et Koko, ainsi que les fous rires partagés avec Floriane et Phiphi.

À l'équipe de génopathies du CHU de Lille, je tiens à vous remercier infiniment pour tout le savoir que j'ai pu acquérir à vos côtés. Un immense merci au Professeur Claire-Marie Dhaenens pour sa confiance et sa détermination, et pour m'avoir confié des projets de recherche enrichissants. Une mention spéciale à Olivier F et Farid avec qui j'ai partagé mon bureau et de nombreuses discussions intéressantes.

Un grand merci à toute l'équipe d'hématologie de Lille, les biologistes et les techniciens de cytologie et d'hémostase. Un merci tout particulier à Anne, qui m'a accueillie comme sa fille tout au long de ce semestre. J'ai adoré partager avec toi nos gardes et après-midis, qui ont rendu cette période encore plus agréable.

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude au Professeur Florent Ginhoux pour m'avoir chaleureusement accueillie au sein de son équipe. Merci également à Camille Blériot pour m'avoir supervisée tout au long de mon master 2, ainsi qu'à Garrett pour le partage de ses connaissances. Je remercie Romain et Wissal F pour votre aide précieuse ; vous occupez une place particulière dans mon cœur. Vous êtes des amis que j'affectionne énormément. Un grand merci aussi à Sassou, Amadou, Robin C, Sindija, Nabila, Aymeric, Marguerite, Clem', Lilia, Saïma et Mohamad pour votre bonne humeur et pour les soirées, et expériences partagées. Enfin, un immense merci au Professeur Encarnita Mariotti-Ferrandiz pour son encadrement exceptionnel durant ce master 2.

Je tiens à remercier toute l'équipe d'immunologie – techniciens, ingénieur, et biologistes. Vous m'avez fait sentir intégrée dès le premier jour. Je vous en suis profondément reconnaissante pour tout ce que vous m'avez transmis. Je tiens à adresser des mentions spéciales à Célia et tout particulièrement à Marie, avec qui j'ai eu la chance de collaborer pour cette thèse. Marie, tu es une personne extrêmement assidue, et travailler à tes côtés a été un réel plaisir. Je te souhaite le meilleur pour la suite de ta carrière professionnelle, tu le mérites amplement.

À ma famille lilloise, à mes co-internes,

Tout commençait après un examen de virologie où je rencontrais mes premières co-internes lilloises. Nous étions les nouvelles lilloises à la recherche de potes puis « les trois brunettes » au PTI de bioch. Merci beaucoup à vous mes Leïla et Sarah adorées d'avoir toujours été là pour moi ! A nos petites soirées, notre promesse d'aller ensemble un jour au stade Bollaert.... Je vous souhaite le meilleur pour la suite et également : pour toi ma Leïla de bien te ressourcer pendant ta dispo avec le K et pour toi ma Sarah, de bien profiter de ta nouvelle vie parisienne avec le B.

Un grand merci à mes co-internes du PTI de biochimie, Fanny, Manon D, Ludo, Sarah et Leïla avec qui j'ai adoré discuter, débattre, jouer à Géoguessr, faire des tests sur Google, chanter... Vous avez rendu ce stage si agréable. Est-ce que j'aurais oublié les interventions surprises de Quentin B au PTI ? Non bien sûr ! En tout cas, tu m'auras bien fait rire avec tes histoires toujours plus folles chaque jour.

Un réel merci à mon Dimitri, avec qui j'ai partagé de si beaux et bons moments tels que l'incroyable mallet-finger gate. Je suis impressionnée par ton courage et ta détermination. Tu nous manques, à Lille, et je te souhaite le meilleur pour tes ECN.

Un immense merci à la team Hémato Summer 2022, avec qui nous avons su nous soutenir à chaque instant, vous êtes incroyables : Manon D (notre référence), Sarah (ma Marseillaise préférée), Toto (mon skateur favori), Manon F (mon binôme de cœur), Alex et Thibaut. Mentions spéciales à mes hématologues préférés, Chloé et Loïc.

À mon équipe de Patate Vibes, Amine (notre batata), Wissal (notre queen patate), Nawal (notre patate douce) et Nicolas (notre potatoe), je vous remercie mille fois, vous avez illuminé mon stage ! Entre nos fous rires sans fin, nos chansons, nos discussions sur tout et rien, et surtout notre soutien indéfectible, vous avez rendu cette expérience inoubliable.

À ma team Immunogirls, Sophie, Anne-Claire, Julie et Mélinda, merci beaucoup pour tous ces moments de franches rigolades, vos conseils pour les destinations de rêves (Mexique, Guadeloupe, Bali, Porto...), nos petites soirées improvisées...

Merci à tous mes co-internes avec qui je n'ai pas eu la chance de partager un stage, mais avec qui j'ai vécu de superbes moments lors de soirées mémorables, de parties de baby-foot épiques, de gardes et de pauses bien méritées. Vous avez illuminé ces instants d'internat : Mariam, Guillaume (notre queen, quel honneur d'avoir fait ta dernière garde), Ilyes (petit chat), Pauline R, Thomas R, Adrien, Clara, Emma, Nolan (petit cœur), Juliette R, Émeline M, Émeline G (ma choupi), Mahdi (notre grand sage savant), Maxou (mon chatenaysien...haha), Luc (le surfeur normand), Julien, Fabien, Perrine, Ramzi, Mehdi, Alizé, Juliette F, Apolline, Gatien, Khalil, Lotfi, Quentin P, Chloé, Corentin, Ambroise, Daniela.

Je voudrai remercier particulièrement Manon F avec qui j'ai, certes, partagé un stage mais également de bons moments. Tu as toujours été de très bons conseils. C'est très agréable de travailler avec toi. Tu es toujours présente et partante pour de nouvelles pépites culinaires ou artistiques à travers Lille et ses environs.

Mon cher Ronny, je ne sais pas comment te remercier pour ton soutien infaillible. Merci d'être toi, d'être toujours là, de m'aider et de m'écouter, tu es comme mon frère. Je n'oublierai jamais ce premier moment où je t'ai parlé... c'était une évidence. Ta lucidité, la finesse de tes mots, ton intelligence rare, tout cela me touche profondément. Je te souhaite le meilleur dans tout ce que tu entreprendras, que ce soit dans ta vie personnelle ou professionnelle, tu le mérites amplement, et je suis certaine que tu y réussiras sans effort.

Merci beaucoup mon Raphael de ta gentillesse, de ces moments partagés et de ton soutien.

Mon petit Denys, c'est à ton tour, haha ! Je tiens à te remercier pour tout : ta ténacité, ta vigueur incomparable, et tous ces moments partagés ensemble. Nos discussions téléphoniques interminables, nos soirées... tant de souvenirs qui me font sourire. J'espère que cela continuera encore et encore !

Mon frère Amine, ah que dire ? Notre sniper, notre maître des blagues et expressions ! Tu trouves toujours celles qui nous font exploser de rire. Tu es notre rayon de soleil au CBP ! Ta gentillesse maladroite, mais toujours sincère et généreuse, te rend unique. Merci, mon frère, pour tous ces moments inoubliables.

Mon petit Marcooo, merci pour tous ces moments partagés. Tes petites blagues toujours bien placées et justes, ta gentillesse, ton soutien...font de toi quelqu'un d'exceptionnel. Ne l'oublie jamais, notre *italiano vero* (je m'améliore, non ?).

Ma petite sœur Wissal, tu le sais depuis le tout début, on a tout de suite eu cette connexion spéciale. Merci pour toutes nos conversations, nos soirées thèse, nos fous rires... Chaque moment passé avec toi est précieux ! Tu es ma confidente, toujours pleine de bons conseils, brillante comme la queen que tu es, aux côtés de ton prince, Paul-Élie, que j'apprécie énormément.

Merci à toi, mon Nico, mon petit frère comme j'aime bien le dire. Tu es toujours droit et juste. De plus, tu es mon meilleur partenaire de karaoké et de quiz. Je suis vraiment admirative de ton sérieux et de ton dévouement dans tout ce que tu entreprends.

Merci à tous mes amis rencontrés au fil de cet internat, qui m'ont offert un soutien inestimable et avec qui j'ai partagé des moments inoubliables : Tetiana pour nos goûters/tea-times et soirées entre filles ; Edouard pour nos conversations entre deux manip' ; Vincent pour nos trains de 6h du lundi matin et nos gardes coordonnées pleines de petits filous ou pad'gardes ; Johanna, pour nos instants de rigolade, et nos verres partagés ; Michael, pour nos discussions autour d'un café au CBP.

À mes sœurs de cœur,

Un grand merci à Hanaele, Déborah, Sandra, Myriam, Sonia, Hanna P, Hanna L, Rachel, Tess, Esther A, Léa B, Donia, Eva, Charline, Audélia, Whitney, Certaines d'entre vous me connaissent depuis ma naissance, d'autres depuis presque 10 ans, mais vous avez toutes une place précieuse dans ma vie. Nous avons partagé des week-ends, des vacances, des moments inoubliables comme des mariages, des naissances, des EVJFs... et j'espère que ces instants de joie continueront encore longtemps.

À la brigade du kif,

Steeven, Olivier, Élodie, Yoann, Pierre, Sacha, Claire, Yann, Candice E, Louis, Elisa, Yoni, Candice M, Sam et Karen, merci infiniment pour votre soutien inébranlable et pour tous les moments incroyables que nous avons vécus ensemble. De Strasbourg à Deauville, en passant par ce magnifique voyage en Sicile, chaque instant à vos côtés est un pur bonheur. J'ai hâte de tous vous retrouver à Deauville et encore de belles destinations pour encore plus de beaux souvenirs et de folies douces ! Yallaaaah !

À mes coups de cœur,

Je tiens à vous remercier du fond du cœur, Ash (ma chanteuse hors-pair), Popi, Ariane, Nassima et Laure, d'avoir été présents dès le début de cette aventure. Dès nos premiers échanges, une véritable amitié est née, un coup de foudre amical qui perdure encore aujourd'hui, et je suis tellement fière de vous avoir dans ma vie. Un merci tout particulier également à ma chère Élise et ma Manon A.

À mes amis de la team Retrouvailles,

Samuel, Déborah, Jonathan, Demphis, Yentelle, Elisa et Éva je vous remercie pour ces brunchs de joie et je vous souhaite le meilleur pour vous et vos petites familles.

À ma famille du love,

Nathan, Simon, Clémence et Laurie, un immense merci pour tout ! Vos visites à Lille, nos voyages à l'étranger, ainsi que nos dîners et soirées sur Paris, sont toujours inoubliables. Notre team s'agrandit avec les petits amours de Naomie, Raphael et Léo, qui rendent chaque retrouvaille encore plus spéciale.

Adrien, mon frère depuis la Seconde, déjà à l'époque tu m'impressionnais avec tes talents de photographe et ton goût pour l'aventure et les voyages. Aujourd'hui, savoir que tu as réussi à en faire ton métier me remplit de fierté.

Un immense merci à David H, Sharone, Mickael, Léa E, Sarah, Hilary, Guillaume, David A, Michael M, Marie T, Robin F, Pierre D (mon cher PDD), Ruben. Vous avez toujours été là pour moi, certains d'entre vous m'ayant même rendu visite à Lille.

Je tiens aussi à remercier ma Sim, que j'ai eu le plaisir de rencontrer lorsque j'étais externe et avec qui j'ai partagé des défilés et des duo "incroyables" de chant !

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADN	Acide désoxyribonucléique
AgMPO	Antigène de la myéloperoxydase
ALAT	Alanine aminotransférase
ANC	Nombre absolu de neutrophiles
Ang-2	Angiopoïétine 2
ANSM	Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé
ARN ou RNA	Acide ribonucléique ou en anglais <i>ribonucleic acid</i>
ARN	Acide ribonucléique
ASAT	Aspartate aminotransférase
ASTCT	<i>American Society for Transplantation and Cellular Therapy</i>
BBIR	<i>Biotin-binding immune receptor</i>
BCMA	Antigène de maturation des cellules B
BHE	Barrière hémato-encéphalique
BPF	Bonnes pratiques de fabrication
CAR	<i>Chimeric antigen receptor</i>
CARTOX-10	<i>CAR-T-cell-therapy-associated toxicity 10-point neurological assessment</i>
CBF	<i>Core binding factor</i>
CBP	Centre de biologie et pathologie
CCR7	<i>CC-chemokine receptor 7</i>
CGH	<i>Comparative Genomic Hybridization</i>
CHIP	<i>Clonal hematopoiesis of indeterminate potential</i>
CHMP	<i>Committee for Medicinal Products for Human Use</i>
CHU	Centre hospitalier universitaire
CIVD	Coagulation intravasculaire disséminée
CLP	Couches leuco-plaquettaires
CMF	Cytométrie en flux
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
CMN	Cellules mononucléées
CMV	Cytomégalovirus
CPA	Cellule présentatrice d'antigène
CRES	<i>CAR-T cell-related encephalopathy syndrome</i>
CRP	Protéine C réactive
CRS	Syndrome de relargage cytokinique
CSH	Cellule souche hématopoïétique
CSL	Cellule souche leucémique
DAMP	<i>Damage Associated Molecular Pattern</i>
d(d)PCR	PCR digitale
DFG	Débit de filtration glomérulaire
DLBCL	Lymphome B diffus à grandes cellules
DMSO	Diméthylsulfoxyde
EBMT	<i>European Society for Blood and Marrow Transplantation</i>

EBV	Epstein-Barr virus
E:C	Effecteur : Cible
ECOG	<i>Eastern Cooperative Oncology Group</i>
EFS	Établissement français du sang
EGFRt	Récepteur tronqué non fonctionnel du facteur de croissance épidermique
EGIL	<i>European Group of Immunology of Leukemia</i>
EHA	<i>European Hematology Association</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked immno assay</i>
ELISpot	<i>Enzyme-linked immunospot</i>
ELN	<i>European LeukemiaNet</i>
EMA	<i>European medicines agency</i>
FAB	<i>French-American-British</i>
FACS	<i>Fluorescence-activated cell sorting</i>
FasL	<i>Fas ligand</i>
FcεR1γ	Chaîne γ du récepteur Fc d'immunoglobuline
FDA	<i>Food and drug administration</i>
FISH	<i>Fluorescence in situ hybridization</i>
FLAIR	<i>Fluid attenuated inversion recovery</i>
FSC	<i>Forward scatter</i>
G-CSF	<i>Granulocyte colony-stimulating factor</i>
GGT	Gamma-glutamyltransférase
GM-CSF	<i>Granulocyte macrophage colony-stimulating factor</i>
GO	Gemtuzumab ozogamicin
HAS	Haute autorité de santé
HCG	Hormone gonadotrophine chorionique humaine
HGBCL	Lymphome à cellules B de haut grade
HLA	<i>Human leucocyte antigen</i>
HR	<i>Hazard ratio</i>
HSV	Virus Herpes simplex
HTLV-1	Virus lymphotrope à cellules T humain de type 1
ICAHT	<i>Immune effector cell-associated hematoxicity</i>
ICANS	<i>Immune effector cell-associated neurotoxicity syndrome</i>
ICC	<i>International Consensus Classification</i>
ICE	<i>Immune Effector Cell-Associated Encephalopathy</i>
IFN-γ	Interféron gamma
Ig	Immunoglobuline
IL-x	Interleukine-x (x correspondant à un chiffre ou un nombre)
INR	<i>International normalized ratio</i>
IRM	Imagerie par résonance magnétique
ISCN	<i>International System of Human Cytogenomic Nomenclature</i>
ITD	<i>Internal tandem duplications</i>
IV	Voie intraveineuse
LA	Leucémie aiguë
LAIP	<i>Leukemia-Associated Immunophenotype</i>

LAM	Leucémie aiguë myéloïde
LAL-B	Leucémie aiguë lymphoblastique B
LCR	Liquide céphalorachidien
LDH	Lactate déshydrogénase
LGL	Leucémie à grands lymphocytes à grains
LLC	Leucémie lymphoïde chronique
LMC	Leucémie myéloïde chronique
LNH	Lymphome non Hodgkinien
LTR	<i>Long Terminal Repeat</i>
MCP-1	<i>Monocyte chemoattractant protein 1</i>
MDC	<i>Myeloid differentiating chemokines</i>
MMSE	<i>Mini-Mental State Examination</i>
MOI	<i>Multiplicity of infection</i>
MRD	Maladie résiduelle minimale
MTI	Médicament de thérapie innovante
NFS	Numération de formule sanguine
NGS	Séquençage de nouvelle génération
NIH	<i>National cancer institue</i>
NK	<i>Natural killer</i>
OMS	Organisation mondiale de la santé
PBMC	Cellules mononucléées périphériques
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PE	Phycoérythrine
PHA	Phytohémagglutinine
PIC	Pression intracrânienne
PMBCL	Lymphome primaire médiastinal à grandes cellules B
PNN	Polynucléaire neutrophile
PQ	Plaquettes
qPCR	PCR quantitative
RC	Rémission complète
RCh	Récupération hématologique partielle
RCi	Récupération hématologique incomplète
RPM	<i>Revolutions per minute of rotor</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RQ-PCR	<i>Real-time quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction</i>
R/R	En rechute et réfractaire
RT-MLPA	<i>Reverse transcriptase-multiplex ligation-dépendent probe amplification</i>
SAM	Syndrome d'activation macrophagique
scFv	<i>Single-chain Fv domain</i>
SDF-1	<i>Stromal cell-derived factor 1</i>
SFGM-TC	<i>Francophone Society of Bone Marrow Transplantation and Cellular Therapy</i>

SMD	Syndrome myélodysplasique
SMP	Syndrome myéoprolifératif
SNC	Système nerveux central
SNIP	<i>Signal neutralization by an inhibitable protease</i>
SSC	<i>Side scatter</i>
SUPRA	<i>Split, universal and programmable</i>
SVF	Sérum de veau fœtal
TCA	Temps de céphaline activée
TCR	Récepteur de cellules T ou <i>T cell receptor</i>
TDM	Tomodensitométrie
TEP	Tomographie par émission de positons
TNF	<i>Tumor necrosis factor</i>
TP	Temps de prothrombine
TRUCK	<i>T cells Redirected Universal Cytokine product</i>
TSM	Taux d'incidence standardisé sur la population mondiale
UMAP	<i>Uniform manifold approximation and projection</i>
USA	<i>United States of America</i>
UTR	<i>Untranslated regions</i>
VAF	<i>Variant allelic frequency</i>
VCAM-1	<i>Vascular cell adhesion protein 1</i>
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
VIH	Virus de l'immunodéficience
VIH-1	Virus de l'immunodéficience de type 1
VZV	Virus varicelle-zona
WT	<i>Wild-type</i>
7-AAD	7-Aminoactinomycine D

SOMMAIRE

I.	LAM REFRACTAIRE OU EN RECHUTE EXPRIMANT LE CD19	19
A)	DEFINITION GENERALE D'UNE LAM	19
B)	CLASSIFICATION DES LAM	22
C)	ÉPIDEMIOLOGIE GENERALE EN FRANCE	25
D)	FACTEURS DE RISQUE ET ETIOLOGIE DES LAM	28
E)	MANIFESTATIONS CLINIQUES DES LAM	31
F)	DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE DES LAM EXPRIMANT LE CD19	32
a)	<i>Bilan cytologique</i>	33
b)	<i>Bilan phénotypique</i>	33
c)	<i>Étude cytogénétique et bilan de biologie moléculaire</i>	36
d)	<i>Examens biologiques et cliniques additionnels nécessaires</i>	41
G)	PRONOSTIC DES LAM CD19+	43
H)	TRAITEMENT DES LAM CD19+	47
I)	SITUATION AU CHU DE LILLE DES LAM CD19+	52
a)	<i>Population étudiée</i>	52
b)	<i>Schéma thérapeutique</i>	59
c)	<i>Réfractaire ou en rechute et pronostic</i>	63
II.	LES CELLULES CAR-T	71
A)	HISTOIRE ET GENERALITES	71
B)	PRODUCTION DES CELLULES CAR-T	76
C)	MODE D'ACTION GENERAL DES CELLULES CAR-T	77
D)	MEDICAMENTS COMMERCIALISES ET LEURS INDICATIONS	78
E)	EFFETS INDESIRABLES	88
a)	<i>Syndrome de relargage de cytokines</i>	89
b)	<i>Neurotoxicité</i>	94
c)	<i>Diverses complications post-cellules CAR-T</i>	99
d)	<i>Complications hématologiques post-cellules CAR-T</i>	107
F)	L'UTILISATION DES CELLULES CAR-T AU CHU DE LILLE	112
a)	<i>Les essais cliniques en cours</i>	112
b)	<i>Activité clinique des CAR-T au CHU à Lille</i>	117
c)	<i>Population traitée par cellules CAR-T au CHU de Lille</i>	119
d)	<i>Les annulations des cellules CAR-T et les secondes réinjections</i>	122
e)	<i>Effets indésirables des CAR-T au CHU de Lille</i>	125
f)	<i>Rechute et survie des patients au CHU de Lille post-CAR-T</i>	128
g)	<i>Suivi des patients au CHU de Lille post-CAR-T</i>	133
III.	RATIONNEL ET OBJECTIFS	144
IV.	MATÉRIEL ET MÉTHODES	146
A)	LES CELLULES CAR-T ET CULTURES CELLULAIRES UTILISEES	146
a)	<i>Présentation des lignées cellulaires utilisées</i>	146
b)	<i>Présentation des cellules CAR-T produites et utilisées</i>	148
B)	ÉTUDE DE LA CYTOTOXICITE DES CELLULES CAR-T ISSUES DE LA PRODUCTION ACADEMIQUE	151
a)	<i>Étude de la cytotoxicité des CAR-T par CMF</i>	151
b)	<i>Étude de l'expression du CD19 à la surface des MOLM-13 CD19+</i>	156
C)	CAPACITE FONCTIONNELLE DES CELLULES CAR-T ANTI-CD 19 ISSUES DE LA PRODUCTION ACADEMIQUE EVALUEE PAR ENZYME-LINKED IMMUNOSPOT (ELISPOT)	158
D)	ANALYSES STATISTIQUES	159
E)	PREPARATION DES FIGURES	159

V.	RÉSULTATS	160
	A) MISE AU POINT DE LA TECHNIQUE : EXPERIENCE PRELIMINAIRE	160
	a) <i>Étude de cytotoxicité des cellules CAR-T</i>	160
	b) <i>ELISpot</i>	165
	B) ÉTUDE DE LA CYTOTOXICITE DES CELLULES CAR-T	167
	a) <i>RAJI</i>	167
	b) <i>MOLM-13 CD19-</i>	171
	c) <i>MOLM-13 CD19+</i>	175
	d) <i>Comparaison de toutes les lignées entre elles</i>	181
	C) ÉTUDE DE LA CAPACITE FONCTIONNELLE DES CELLULES CAR-T PAR ELISPOT	190
VI.	DISCUSSION	191
	A) CYTOTOXICITE DES CELLULES CAR-T IN VITRO SUR UNE LIGNEE CELLULAIRE BLASTIQUE MYELOÏDE EXPRIMANT LE CD19	192
	B) DIMINUTION DU NOMBRE DE CELLULES CD19+ EN PRESENCE DE CELLULES CAR-T	195
	C) UN TEST DE FONCTIONNALITE DES CELLULES CAR-T EN ROUTINE	197
	D) UNE PRODUCTION ACADEMIQUE EN COURS AU CHU DE LILLE	199
VII.	CONCLUSION	200
VIII.	BIBLIOGRAPHIE	202
IX.	LISTE DES FIGURES	222
X.	LISTE DES TABLES	226
XI.	ANNEXE	228

I. LAM réfractaire ou en rechute exprimant le CD19

A) Définition générale d'une LAM

La leucémie aiguë myéloïde (LAM) est une hémopathie maligne dont les premiers symptômes apparaissent rapidement, au bout de quelques jours voire quelques semaines, et est caractérisée par la prolifération monoclonale et incontrôlée de blastes envahissant la moelle osseuse. Par conséquent, celle-ci ne peut plus assurer correctement la production de cellules sanguines normales causant ainsi une insuffisance médullaire. L'expansion de cellules blastiques immatures et précurseurs de cellules sanguines bloquées à un stade précoce de différenciation dans la moelle osseuse bouleverse ainsi l'hématopoïèse.

L'hématopoïèse, à l'origine de la production des cellules sanguines, est un système organisé de façon très hiérarchique et très finement régulé permettant l'équilibre quantitatif des éléments matures du sang. Au sommet de cette pyramide hématopoïétique, est retrouvée la cellule souche hématopoïétique (CSH) qui, par différents processus physiologiques, aura la capacité de se différencier en cellules progénitrices, soit des hématies, des leucocytes ou des plaquettes. En effet, les cellules progénitrices ainsi produites évoluent ensuite en précurseur myéloïde ou lymphoïde pour ainsi former un seul type de cellule mature du sang (Figure 1).

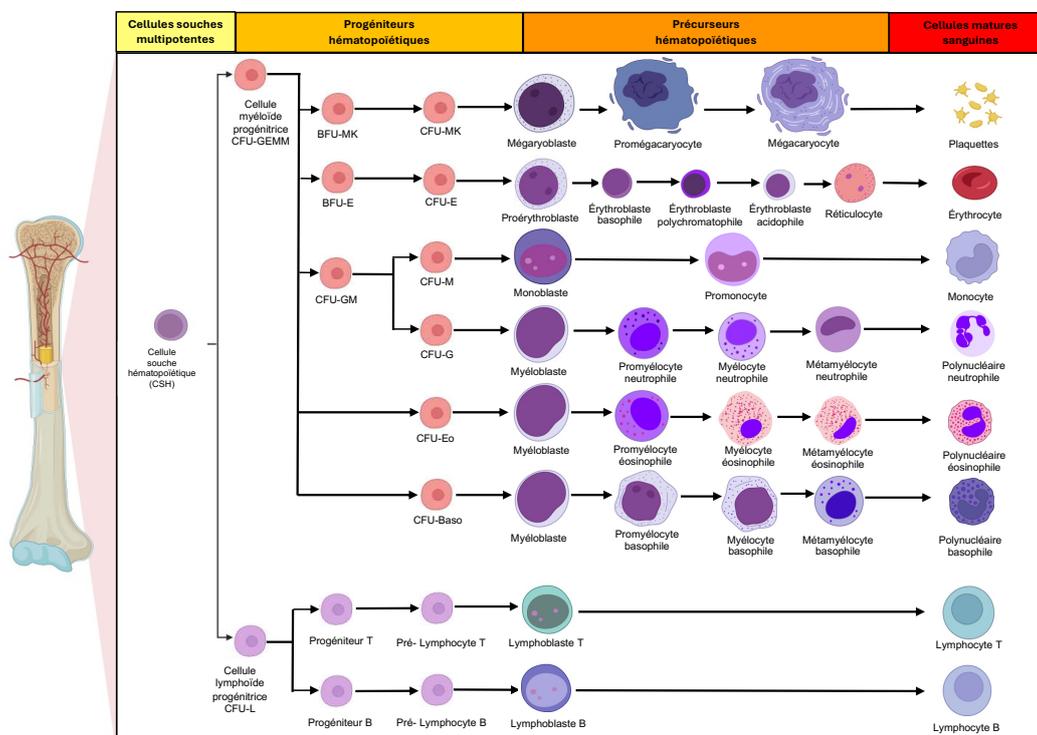


Figure 1 – Différents stades de différenciations des cellules hématopoïétiques humaines : De la cellule souche à la cellule mature (Adaptée de Travlos GS, *Toxicol Pathol*, 2006 (1); réalisée à l'aide de Biorender). Abréviations : Baso, *Basophil* ; BFU, *Burst Forming Unit* ; CFU, *Colony Forming Unit* ; CSH, cellule souche hématopoïétique ; E, *Erythroid* ; Eo, *Eosinophil* ; G, *Granulocyte* ; GEMM, *Granulocyte Erythroid Megakaryocyte Macrophage* ; GM, *Granulocyte Macrophage* ; L, *Lymphoid* ; M, *Macrophage* ; MK, *Megakaryocyte* ;

Des variations génétiques le plus souvent acquises d'ordre génomique peuvent changer le phénotype des progéniteurs hématopoïétiques, leur conférant des propriétés d'auto-renouvellement perpétuel et de préservation d'immaturité (perdant ainsi leur capacité à se différencier) en compromettant l'apoptose qui s'ensuit (2). Dans la moelle osseuse, une multiplication inconditionnée de cellules immatures, les blastes, aura lieu et sera à l'origine des leucémies aiguës. Ce mécanisme s'appelle la leucémogénèse. C'est un processus tumoral composé de plusieurs étapes avec une potentielle implication de cellules souches leucémiques (CSL). Cette notion de présence de CSL tumorigènes a été premièrement décrite il y a plus de 50 ans par quelques études montrant que seul un groupe limité de cellules cancéreuses pouvait induire une prolifération *in vivo* et *in vitro*. Ces cellules présentaient des différences de clonogénicité par rapport aux CSH ce qui a permis d'introduire la notion de CSL (3–5). L'apparition d'un clone leucémique de LAM serait organisée de façon hiérarchique à partir d'une CSL capable de produire des progéniteurs de ce clone puis des blastes avec les mêmes instabilités et/ou combinaisons aberrantes. Cependant, après des tests sur des souris immunodéficientes, Bonnet et Dick montraient que seules les CSL (dérivées de patients avec une LAM) présentant un phénotype bien défini (correspondant à une seule fraction des CSL) permettaient la multiplication d'un clone leucémique conduisant au développement de LAM chez ces souris (6). Un parallélisme entre CSH et CSL a souvent été rapporté de par leur capacité commune d'avoir une prolifération importante et d'être à l'origine de populations cellulaires hétérogènes caractérisées par des phénotypes différents. Une certaine complexité des CSL a été mise en évidence rapportant une hétérogénéité fonctionnelle de ce compartiment cellulaire, ajoutant une caractéristique analogue observée chez les CSH (7). Une hypothèse a ainsi émergé émettant la possibilité que les CSL seraient des CSH qui sont devenues leucémiques par l'accumulation de variations génétiques leur attribuant une certaine instabilité pour donner naissance ensuite à des cellules blastiques à l'origine de LAM. Mais ce concept reste très controversé (8,9).

Au sein d'un même patient leucémique, les cellules blastiques peuvent présenter des fonctions distinctes mais également une identité phénotypique et génétique différente. Ceci montre alors une certaine hétérogénéité de caractères au sein d'un même clone tumoral. Deux modèles hypothétiques ont essayé d'expliquer ce phénomène : le modèle stochastique et le modèle hiérarchique (9). D'une part, le modèle stochastique considère que l'hétérogénéité viendrait des influences extrinsèques ou intrinsèques que subiraient les cellules tumorales causant des réponses aléatoires et donc imprévisibles de ces dernières. Ce modèle part du postulat qu'au départ, toutes les

cellules tumorales sont équivalentes. D'autre part, le modèle hiérarchique suppose qu'il existe à l'origine plusieurs classes de CSL avec une biologie, un comportement et des fonctions distinctes mais seulement un sous-ensemble de CSL est capable d'initier une croissance tumorale vers une leucémie (9,10). (Figure 2) Ces modèles ont permis de poser les bases pour expliquer l'hématopoïèse clonale à l'origine des LAM. Aujourd'hui d'autres modèles possibles peuvent être décrits pour mieux expliciter la physiopathologie des LAM en mettant en évidence les potentiels facteurs intrinsèques et/ou extrinsèques à l'origine de la croissance tumorale et les différentes conséquences moléculaires, génétiques et protéiques induites par ces derniers. Par exemple, l'âge et la présence de certaines variations génétiques somatiques dans le sang ou la moelle osseuse supérieure ou égale à 2% de la fréquence de variation allélique (11,12) ont été décrits comme conduisant à un risque accru de développement d'hémopathies malignes chez ces populations.

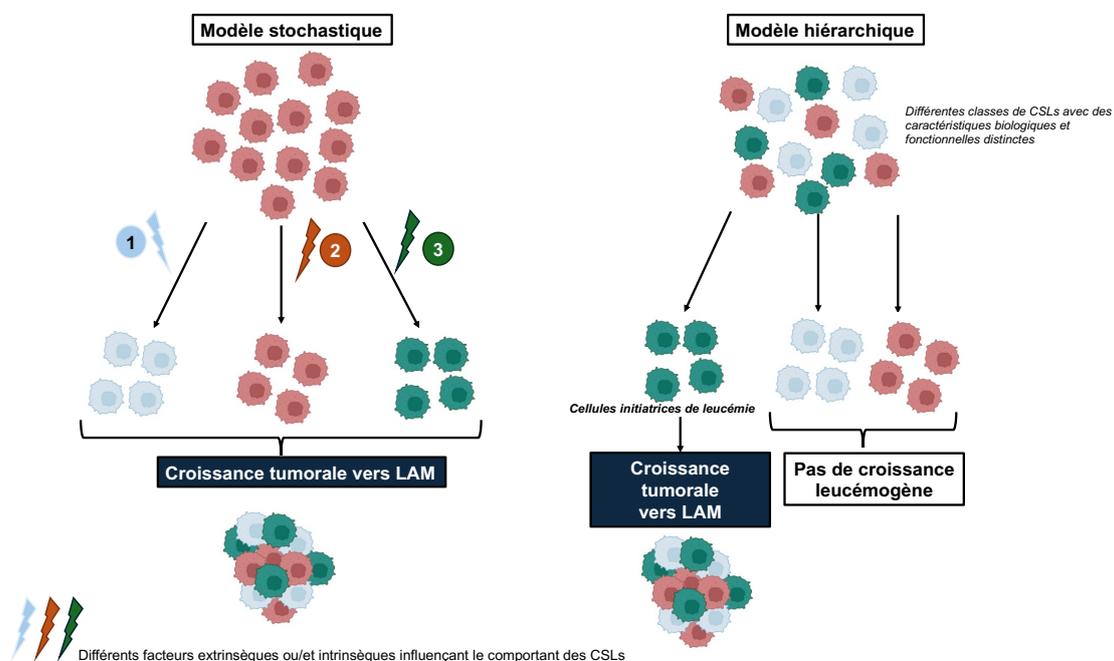


Figure 2 - Les modèles expliquant l'hétérogénéité des cellules leucémiques au sein d'un tissu tumoral ou leucémique (Adaptée de Dick JE, *Blood*, 2008 et Wang JCY et al., *Trends in Cell Biology*, 2005 ; réalisée à l'aide de Biorender)(9,10)

La présence d'anomalies au niveau chromosomique à partir de caryotypes de patients avec une LAM a d'abord été observée, présentant des translocations ou inversions somatiques non aléatoires à l'origine de la formation de transcrits de fusion causant l'effet leucémogène. En effet, ils sont impliqués dans la transduction du signal ou/et des voies d'activation transcriptionnelle altérant la différenciation myéloïde. Comme expliqué précédemment, la pathogénèse de la LAM comporte plusieurs étapes entravées également par des anomalies au niveau génétique qui vont soit conférer des propriétés de survie et de multiplication des progéniteurs hématopoïétiques, soit

bloquer la différenciation et l'apoptose, soit causer des modifications épigénétiques (13,14). Cela aboutirait ainsi à la prolifération de cellules leucémiques et blastiques incapables de devenir plus matures, celles-ci restant non différenciées induiraient donc l'arrivée d'une LAM. La complexité et l'hétérogénéité des LAM augmentent de plus en plus, ce qui encourage aujourd'hui l'avancée des analyses génomiques et transcriptomiques, pour une meilleure description des voies de signalisation et des variations génétiques impliquées (15).

B) Classification des LAM

Ces dernières années, les connaissances sur la caractérisation cytologique, moléculaire, phénotypique, cytogénétique des leucémies aiguës myéloïdes se sont développées de façon exponentielle grâce aux nouvelles avancées technologiques. Tous ces critères doivent alors être pris en compte dans la classification des LAM. C'est pourquoi la classification *French American British* (FAB) de 1976(16) et révisée en 1985 (17) n'est plus celle de référence. Cependant, elle a permis de poser les bases pour les nouvelles classifications et est toujours employée pour qualifier certaines caractéristiques et/ou particularités cytologiques observées pour quelques LAM. Aujourd'hui, la classification des LAM a bien évolué, prenant en considération de plus en plus les critères moléculaires, phénotypiques et cytogénétiques dans le diagnostic, le pronostic mais aussi la prise en charge.

Parmi les cellules souches et progénitrices hématopoïétiques, des variations somatiques acquises *de novo* peuvent apparaître et alors engendrer une altération de l'hématopoïèse et la propagation d'un clone néoplasique dans la moelle osseuse pouvant entraîner une insuffisance médullaire. Plusieurs variations sur les gènes suivants, *DNMT3A*, *NPM1*, *CEPBA*, *IDH1/2* et *RUNX1*, sont communes aux LAM et entraînent la formation de transcrits de fusion qui jouent potentiellement un rôle dans leur initiation(18). D'autres variants sont identifiés sur d'autres gènes (*FLT3*, *c-KIT*, *NRAS*, *KRAS*...) codant pour des protéines de signalisation causant des perturbations possiblement responsables de la pathogénèse de la LAM (2). Ces variations génomiques induisent une description complexe de la LAM en termes biologiques et cliniques. La classification des LAM a, par conséquent, évolué de façon à être principalement basée sur la causalité de la maladie pour une meilleure pertinence clinique.

Deux autres classifications ont ainsi vu le jour après celle de la FAB : tout d'abord, celle de l'Organisation mondiale de la santé (OMS) en 2001 puis celle de l'*International Consensus Classification* (ICC) en 2022. En effet, celle de l'OMS a été révisée plusieurs fois après 2001, et la dernière mise à jour datant de 2022(19) a suscité un

débat parmi certains spécialistes (20), conduisant à la classification de l'ICC en septembre 2022 (21). L'application de l'une ou l'autre classification est centre-dépendant en France. La principale différence entre les deux classifications réside dans la manière dont l'ICC distingue les syndromes frontières syndrome myélodysplasique (SMD)/LAM des LAM. Mais au centre hospitalier universitaire (CHU) de Lille en hématologie biologique, celle de l'ICC est plus communément appliquée. De plus, les recommandations de 2017 par *European LeukemiaNet* (ELN)(22) pour le diagnostic et la prise en charge des LAM ont également nécessité une révision en 2022 (23) afin d'inclure de nouvelles perspectives à considérer dans la caractérisation, le traitement et le pronostic des LAM.

Par conséquent, la mise à jour en 2022 de la classification de l'OMS de 2016 (24) par l'ICC des LAM (20,21) a permis des changements avec une stratification du taux des blastes et la considération de nouvelles variations génétiques et cytogénétiques pouvant définir les LAM. Ainsi, la caractérisation moléculaire des LAM devient prioritaire et prend une place primordiale dans la désignation de la LAM. Cette nouvelle classification est illustrée dans la figure 3 (23). Les LAM sont des hémopathies malignes très hétérogènes avec des anomalies génétiques distinctes.

La classification diagnostique de l'ICC est hiérarchique. Les anomalies récurrentes se retrouvent au sommet et ont la priorité sur toutes les autres catégories de LAM (Figure 3). Les anomalies récurrentes sont listées dans la table 1. Le diagnostic de LAM est établi en présence de ces anomalies génétiques récurrentes et un taux de blastes supérieur ou égal à 10% dans le sang ou la moelle osseuse (25–27) excepté pour les LAM avec $t(9;22)(q34.1;q11.2)/BCR::ABL1$. Cette exception est faite pour éviter la confusion avec les leucémies myéloïdes chroniques (LMC) en phase accélérée. Ensuite, c'est la variation du gène *TP53* avec une *variant allelic frequency* (VAF) supérieure ou égale à 10% qui doit être prise en compte pour poser le diagnostic. En effet, les LAM associées à ces variations sont connues pour avoir des anomalies cytogénétiques complexes avec des survies de courte durée (15,28–30). Puis, lorsqu'il y a des variations au niveau des gènes *ASXL1*, *BCOR*, *EZH2*, *RUNX1*, *SF3B1*, *SRSF2*, *STAG2*, *U2AF1*, ou *ZRSR2*, un diagnostic de LAM avec des variations génétiques reliées à la myélodysplasie pourra être évoqué. Si aucune variation au niveau du gène *TP53* ni au niveau des gènes reliés à la myélodysplasie n'a été observée chez un patient, des anomalies cytogénétiques reliées aux myélodysplasies peuvent être utilisées pour caractériser la LAM. Si la LAM diagnostiquée ne peut pas être classée dans une des catégories précédemment citées, elle sera classée en tant que LAM sans autres spécificités. Cependant, si un diagnostic de syndrome

myéloprolifératif (SMP) a déjà été énoncé auparavant, ce cas n'est pas identifié comme LAM dans une des catégories de la classification ICC. Ils sont considérés comme un SMP en phase accéléré si le nombre de blastes est compris entre 10 et 19% ou en phase blastique si le nombre de blastes est supérieur à 20%.

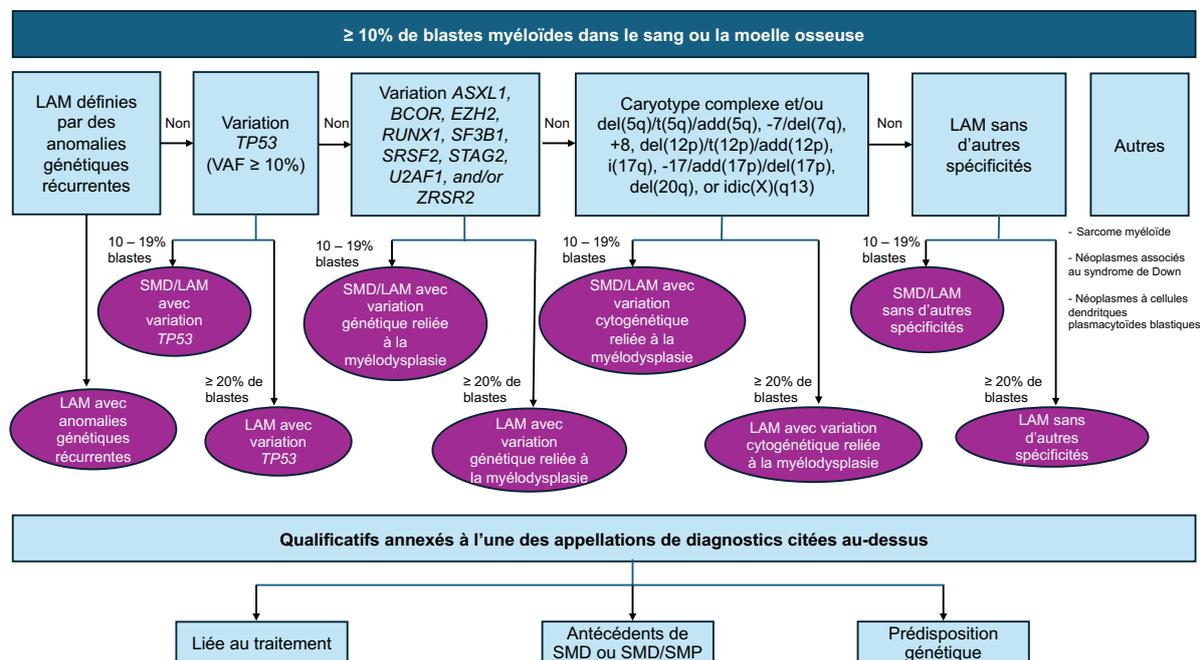


Figure 3 - Classification hiérarchique 2022 de l'ICC des LAM (Adaptée de Döhner et al., *Blood*, 2022 et de Arber et al., *Am J Hematol*, 2022)(20,23) Abréviations : LAM, Leucémie aiguë myéloïde ; SMD, Syndrome myélodysplasique ; SMP, Syndrome myéloprolifératif ; VAF, *Variant allele frequency*

La prise antérieure d'un traitement (chimiothérapie, radiothérapie ou intervention impliquant le système immunitaire), des antécédents hématologiques myéloïdes tels que les SMD ou les SMD/SMP ou les prédispositions génétiques sont également reconnus comme des facteurs pouvant conduire au développement d'une LAM. Mais ils sont considérés comme des qualificatifs de diagnostic plutôt que des catégories de LAM. En effet, des clones résistants à une chimiothérapie ou radiothérapie précédente (31) ont pu subsister après traitement et ont pour conséquence l'apparition de LAM associée à des variations génétiques et caryotypiques défavorables et anormales (par exemple des variations de TP53 (32,33) ou l'apparition de caryotype complexe)(34,35). D'autres catégories de LAM liées à d'autres pathologies sont toujours notifiées comme le sarcome myéloïde, les néoplasmes myéloïdes associée au syndrome de Down et les néoplasmes à cellules dendritiques plasmacytoïdes blastiques.

Catégories de LAM		Seuil de blastes
LAM avec anomalies génétiques récurrentes		
Leucémie aiguë promyélocytaire avec t(15;17)(q24.1;q21.2)/PML::RARA		
Leucémie aiguë promyélocytaire avec d'autres réarrangements RARA	LAM avec t(1;17)(q42.3;q21.2)/IRF2BP2::RARA LAM avec t(5;17)(q35.1;q21.2)/NPM1::RARA LAM avec t(11;17)(q23.2;q21.2)/ZBTB16::RARA LAM avec cryptique inv(17q) or del(17)(q21.2q21.2)/STAT5B::RARA LAM avec STAT3::RARA Autres gènes rarement réarrangés avec RARA:TBL1XR1 (3q26.3), FIP1L1 (4q12), BCOR (Xp11.4).	
Leucémie aiguë myéloïde avec t(8;21)(q22;q22.1)/RUNX1::RUNX1T1		
Leucémie aiguë myéloïde avec inv(16)(p13.1q22) or t(16;16)(p13.1;q22)/CBFB::MYH11		
Leucémie aiguë myéloïde avec t(9;11)(p21.3;q23.3)/MLLT3::KMT2A		
Leucémie aiguë myéloïde avec d'autres réarrangements KMT2A	LAM avec t(4;11)(q21.3;q23.3)/AFF1::KMT2A LAM avec t(6;11)(q27;q23.3)/AFDN::KMT2A LAM avec t(10;11)(p12.3;q23.3)/MLLT10::KMT2A LAM avec t(10;11)(q21.3;q23.3)/TET1::KMT2A LAM avec t(11;19)(q23.3;p13.1)/KMT2A::ELL LAM avec t(11;19)(q23.3;p13.3)/KMT2A::MLLT1 (enfants+++)	
Leucémie aiguë myéloïde avec t(6;9)(p22.3;q34.1)/DEK::NUP214		
Leucémie aiguë myéloïde avec inv(3)(q21.3q26.2) or t(3;3)(q21.3;q26.2)/GATA2, MECOM(EVI1)		≥ 10%
Leucémie aiguë myéloïde avec d'autres réarrangements MECOM	LAM avec t(2;3)(p11~23;q26.2)/MECOM::? LAM avec t(3;8)(q26.2;q24.2)/MYC, MECOM LAM avec t(3;12)(q26.2;p13.2)/ETV6::MECOM LAM avec t(3;21)(q26.2;q22.1)/MECOM::RUNX1.	
Leucémie aiguë myéloïde avec d'autres translocations récurrentes rares	LAM avec t(1;3)(p36.3;q21.3)/PRDM16::RPN1 LAM avec t(3;5)(q25.3;q35.1)/NPM1::MLF1 LAM avec t(8;16)(p11.2;p13.3)/KAT6A::CREBBP LAM avec t(1;22)(p13.3;q13.1)/RBM15::MRTF1 LAM avec t(5;11)(q35.2;p15.4)/NUP98::NSD1 LAM avec t(11;12)(p15.4;p13.3)/NUP98::KMD5A LAM avec NUP98 and other partners LAM avec t(7;12)(q36.3;p13.2)/ETV6::MNX1 LAM avec t(10;11)(p12.3;q14.2)/PICALM::MLLT10 LAM avec t(16;21)(p11.2;q22.2)/FUS::ERG LAM avec t(16;21)(q24.3;q22.1)/RUNX1::CBFA2T3 LAM avec inv(16)(p13.3q24.3)/CBFA2T3::GLIS2	
Leucémie aiguë myéloïde avec variations NPM1		
Leucémie aiguë myéloïde avec variation in-frame bZIP de CEBPA		
Leucémie aiguë myéloïde avec t(9;22)(q34.1;q11.2)/BCR::ABL1		≥ 20%
Variation TP53		
SMD/LAM avec variation TP53		10 – 19%
LAM avec variation TP53		≥ 20%
Variations ASXL1, BCOR, EZH2, RUNX1, SF3B1, SRSF2, STAG2, U2AF1, ou ZRSR2		
SMD/LAM avec variations génétiques reliées à la myélodysplasie		10 – 19%
LAM avec variations génétiques reliées à la myélodysplasie		≥ 20%
Caryotype complexe (≥ 3 anomalies chromosomiques* clonales non apparentées en l'absence d'autres anomalies génétiques récurrentes définissant la classe), del(5q)/t(5q)/add(5q), -7/del(7q), +8, del(12p)/t(12p)/add(12p), i(17q), -17/add(17p) ou del(17p), del(20q), et/ou idic(X)(q13) anomalies clonales		
SMD/LAM avec variations cytogénétiques reliées à la myélodysplasie		10 – 19%
LAM avec variations cytogénétiques reliées à la myélodysplasie		≥ 20%
Sans d'autres anomalies spécifiques		
SMD/LAM		10 – 19%
LAM		≥ 20%
Autres : Sarcome myéloïde, Néoplasmes myéloïdes associés au syndrome de Down et à cellules dendritiques plasmacytoïdes blastiques		

Table 1 - Classification diagnostique de l'ICC 2022 pour les LAMs(21). * Les caryotypes hyperdiploïdes avec trois ou plus de trisomies (ou polysomies) sans anomalies structurales sont exclues.

C) Épidémiologie générale en France

La LAM est considérée comme une hémopathie maligne rare. Cependant, elle est la plus commune des leucémies aiguës chez l'adulte comptant approximativement 80% des patients souffrant de leucémies aiguës (36,37). C'est une pathologie de mauvais pronostic en étant l'une des principales causes de décès par cancer chez les enfants et les adultes jeunes (38).

Santé publique France en collaboration avec le réseau Francim (registre des cancers) a publié une étude sur l'incidence et la mortalité par cancer en France métropolitaine

entre 1990 et 2018 (39). En France, 3 428 nouveaux cas estimés de LAM sont comptés en 2018 avec un sexe ratio Homme/Femme égal à 1,1. L'âge médian au diagnostic chez l'homme est de 69 ans et pour la femme de 72 ans. Pour la population mondiale, le taux d'incidence standardisé chez l'homme est de 3,1 et 2,3 chez la femme pour 100 000 personnes-années. L'incidence des LAM augmente avec l'âge avec un taux maximal d'incidence pour les classes d'âges [85 ; 89] ans chez l'homme et [90 ; 94] ans chez la femme (Figure 4). Les données peuvent se transposer aux chiffres retrouvés aux États-Unis et récoltés par le NIH (*National cancer institute*)(40) et également à ceux du Royaume-Uni récoltés par l'organisation *Cancer Research UK* (41). De plus, l'incidence en 2018 par rapport à 1990 a augmenté pour les deux sexes avec un taux d'incidence standardisé sur la population mondiale (TSM) qui passe de 2,2 à 3,1 pour 100 000 personnes-années chez l'homme et de 1,8 à 2,3 chez la femme. Cette augmentation est en partie expliquée par le vieillissement de la population. De plus, il est remarqué une hausse de l'incidence depuis 1990 chez les femmes âgées de 80 ans et plus, avec une variation annuelle moyenne de 2% contre 1,1% pour les autres classes d'âges. Elle semblerait ne pas être expliquée par l'évolution démographique (28% de sa part attribuable à l'évolution du nombre de cas de LAM entre 1990 et 2018) mais plutôt des facteurs de risque (69% de leur part attribuable) comme des facteurs environnementaux (radiations ionisantes, exposition au benzène), génétiques, des antécédents tumoraux, ou le fait d'avoir déjà été traité par chimiothérapie ou radiothérapie.

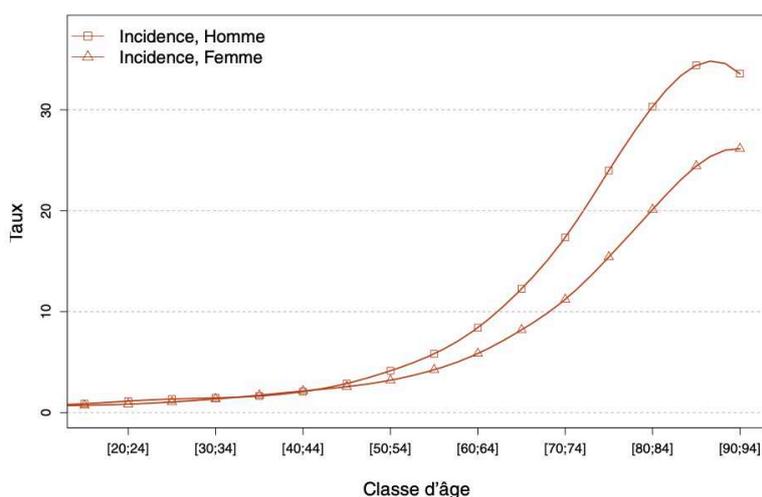


Figure 4 – Taux d'incidence selon la classe d'âge et le sexe en France en 2018 pour les leucémies aiguës myéloïdes (Extrait de l'étude de Santé publique France avec le réseau Francim (39)).

La survie des LAM en France a également été étudiée dans l'étude Santé publique France avec le registre Francim entre 1989 et 2018 (42). La survie nette standardisée à 5 ans est égale à 27%, et à 50% pour la survie à 1 an pour les patients diagnostiqués

entre 2010 et 2015. Cependant, une forte disparité a été observée pour les survies nettes à 5 ans selon l'âge du diagnostic. En effet, elle est de 69% à 30 ans et de 6% à 80 ans (Figure 5).

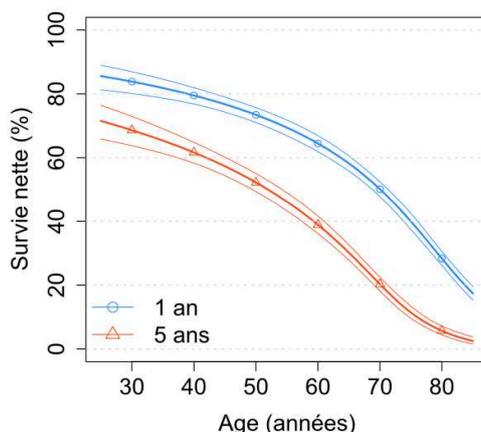


Figure 5 – Survie nette standardisée à 1 (en bleu) et 5 ans (en rouge) selon l'âge au diagnostic avec intervalle de confiance à 95% pour les LAM de patients entre 2010 et 2015 en France (Extraite de l'étude de Santé publique France avec le réseau Francim(42)).

Les patients atteints de LAM meurent, dans la plupart des cas, de leur LAM. D'après les courbes de la Figure 6, il est possible de remarquer que la mortalité due à la LAM ou à son traitement survient principalement lors des premières semaines après le diagnostic de LAM. A partir de l'âge de 70 ans, taux de mortalité en excès (excédent de décès observés par rapport au nombre de décès attendus) est supérieur à celui des patients âgés de moins de 60 ans (2 vs 0,8). Un accès possible et plus facile aux thérapies curatives telles que la greffe de cellules souches hématopoïétiques, et plus intensives pour les patients plus jeunes peut potentiellement expliquer cette différence ainsi qu'une toxicité plus importante observée chez les patients plus âgés. En effet, les populations plus jeunes ne présentent pas ou peu de comorbidités contre-indiquant ces thérapies ce qui leur permet d'arriver plus rapidement en rémission complète.

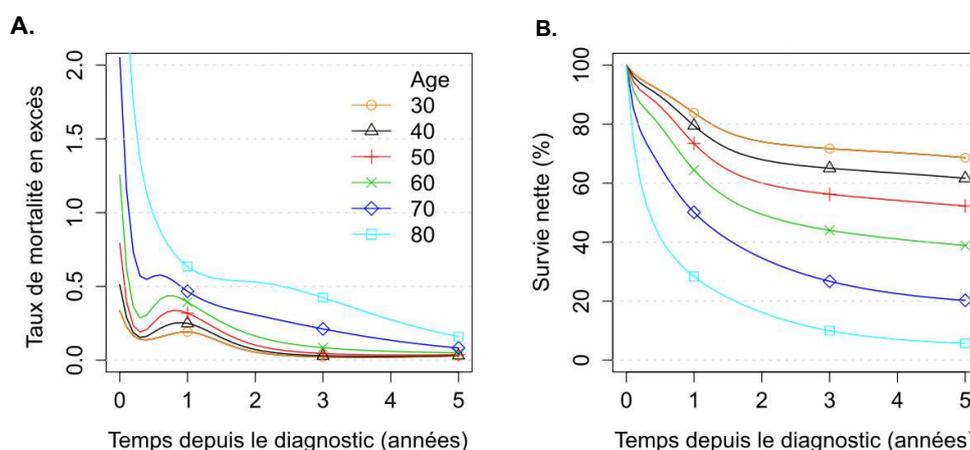


Figure 6 – (A), Taux de mortalité en excès (en nombre de décès par personne-année) ; (B), Survie nette selon le temps depuis le diagnostic pour différents âges en France entre 2010 et 2015 (Extraite de l'étude de Santé publique France avec le réseau Francim (42))

Cependant, le bilan réalisé suite à cette étude a pu montrer une amélioration de la survie nette standardisée (à 1, 5 et 10 ans) entre 1990 et 2015 et en particulier pour les patients de 40 ans (le maximum de gain de pourcentage de survie égal à 30) par rapport aux patients de 80 ans (le minimum de gain de pourcentage de survie égal à 5). L'étude de la survie nette à long terme des patients diagnostiqués entre 1989 et 2000 a montré une stagnation de la survie après 10 ans de suivi pour tous les âges.

D) Facteurs de risque et étiologie des LAM

L'étiologie des LAM est encore inconnue mais de nombreux facteurs de risque contribuent à leur apparition. Comme écrit juste précédemment, l'âge peut être considéré comme un facteur de risque principal sur l'incidence de la LAM.

D'après l'ICC et l'ELN 2022 (21,23), certains facteurs de risque sont décrits comme qualificatifs de diagnostic (la prise antérieure d'un traitement (chimiothérapie anticancéreuse, radiothérapie, ou intervention impliquant le système immunitaire), les antécédents hématologiques ou les prédispositions génétiques).

Aujourd'hui, la part familiale des LAM est clairement établie (43) et même prise en compte dans les classifications. En effet, il est devenu de plus en plus nécessaire d'identifier les variations germinales pouvant prédire une possible survenue de néoplasie de type myéloïde (Table 2). Cela permet un diagnostic possiblement plus précoce mais aussi une amélioration de la prise en charge des patients et de la sélection des donneurs apparentés. Si une greffe de CSH est envisagée, cela aide à éviter de choisir un membre de la famille présentant la même variation génétique (le patient peut vraisemblablement développer plus facilement ultérieurement soit un SMD ou une LAM dérivé(e) de donneur soit un échec de la greffe)(44–47). Selon l'ELN 2022, certains donneurs sont exclus lorsque des variants délétères des gènes *RUNX1* et *CEBPA* sont détectés(23). Toutefois, nous ne disposons pas d'informations sur la possibilité que d'autres variants génétiques soient permissifs ou non pour la greffe de CSH.

Néoplasies hématologiques avec prédisposition germinale sans un trouble plaquettaire pré-existant ou une dysfonction d'organe
Prédisposition germinale due à des variations PP/P des gènes <i>CEBPA</i> , <i>DDX41</i> ou <i>TP53</i> (Syndrome Li-Fraumeni)
Néoplasies hématologiques avec prédisposition germinale associées à un trouble plaquettaire pré-existant
Prédisposition germinale due à des variations PP/P des gènes <i>RUNX1</i> , <i>ANKRD6</i> ou <i>ETV6</i>
Néoplasies hématologiques avec prédisposition germinale associées à une potentielle dysfonction d'organe
Prédisposition germinale due à des variations PP/P des gènes <i>GATA2</i> , <i>SAMD9</i> ou <i>SAMD9L</i>
Néoplasies myéloïdes associées à des syndromes d'insuffisance médullaire
Anémie de Fanconi (via le gène <i>FANCA</i>)
Syndrome de Shwachman-Diamond (via les gènes <i>SBDS</i> , <i>DNAJC21</i> , <i>EFL1</i> , <i>SRP54</i>)
Troubles de la biologie des télomères, y compris dyskératose congénitale (via les gènes <i>ACS</i> , <i>CTC1</i> , <i>DKC1</i> , <i>MDM4</i> , <i>RTEL1</i> , <i>TERC</i> , <i>TERT</i> , <i>TINF2</i> , <i>ACD</i> , <i>NHP2</i> , <i>NOP10</i> , <i>NPM1</i> , <i>PARN</i> , <i>WRAP53</i> , <i>RPA1</i> , <i>Apollo</i>)
Neutropénie congénitale sévère (via les gènes <i>ELANE</i> , <i>G6PC3GFI1</i> , <i>HAX1</i> , <i>JACN</i> , <i>TCRG1</i> , <i>VPS45A</i>)
Anémie de Diamond-Blackfan
Leucémie myélonocyttaire juvénile associée à la neurofibromatose de type 1 (via le gène <i>NF1</i>)
Leucémie myélonocyttaire juvénile associée au syndrome de Noonan-like (syndrome <i>CBL</i>)
Néoplasies myéloïdes ou lymphoïdes associés au syndrome de Down
Syndrome de Noonan (via les gènes <i>PTPN11</i> , <i>NRAS</i> , <i>KRAS</i>)
Syndrome de Bloom (via le gène <i>BLM</i>)
Gènes de prédisposition germinale à l'origine de plusieurs types de cancers, y compris les néoplasies myéloïdes
Prédisposition germinale due à des variations PP/P des gènes <i>CHEK2</i> , <i>MPL</i> ou <i>RECQL4</i>
Cancer du sein et de l'ovaire héréditaire via les gènes <i>BRCA1</i> ou <i>BRCA2</i>
Syndrome de Lynch via les gènes <i>MLH1</i> , <i>MSH2</i> , <i>MSH6</i> , <i>PMS2</i>
Syndrome de Nijmegen ou de Nimègue (Nijmegen breakage syndrome) via le gène <i>NBN</i>
Syndrome de Wiskott-Aldrich via le gène <i>WAS</i>
Troubles émergents
Prédisposition germinale due à des variations PP/P des gènes <i>CSF3R</i> , <i>ERCC6L2</i> , <i>JAK2</i> , <i>MBD4</i> , <i>MECOM/EVI1</i> , <i>NPM1</i> , <i>RBBP6</i> , <i>SRP72</i> ou <i>TET2</i>

Table 2 – Prédispositions germinales des néoplasies myéloïdes d'après l'ICC et l'ELN 2022(21,23). Abréviations : PP/P, Probablement pathogène/Pathogène

En 2022, l'ICC a établi un classement des prédispositions germinales avec des mises à jour par rapport à la classification de l'OMS de 2016. De plus, l'ELN a également ajouté des précisions à ce classement (Table 2)(48,49). Ici, cette table concerne uniquement les néoplasies myéloïdes. Cependant, certains des gènes cités sont également impliqués dans les prédispositions de néoplasies lymphoïdes. Si une variation génétique est détectée, elle doit être spécifiée en tant que qualificatif après le diagnostic du sous-type de LAM.

Parmi toutes ces prédispositions germinales génétiques, la grande majorité des variations détectées se transmet selon un mode autosomal dominant. De surcroît, le diagnostic a pu être établi à un âge très jeune, voire pendant l'enfance ou l'adolescence en particulier pour les prédispositions germinales associées à une potentielle dysfonction d'organe. En revanche, chez les patients qui présentaient des prédispositions germinales responsables de plusieurs cancers, y compris les néoplasies myéloïdes, la maladie hématologique s'est généralement manifestée à l'âge adulte (23). Cette détection de variation génétique liée à une prédisposition germinale doit être alors identifiée le plus tôt possible pour donner ainsi la possibilité aux familles ciblées d'avoir un conseil génétique orienté afin de prévenir au mieux la survenue potentielle d'une LAM chez un des membres.

La prise antérieure de traitements de chimiothérapie, tels que les agents alkylants et les inhibiteurs de topo-isomérase II, expose potentiellement les patients au développement d'une LAM. Les agents alkylants sont associés à un risque accru de

LAM qui peut se manifester généralement 5 à 7 ans après le traitement. En revanche, les inhibiteurs de topo-isomérase II peuvent entraîner une LAM avec une période de latence plus courte, typiquement de 2 à 3 ans après le traitement (35). Ces deux classes de médicaments de chimiothérapie ont des mécanismes d'action différents (les alkylants modifient l'ADN de manière covalente et les inhibiteurs de topo-isomérase II empêchent la ligation des brins d'ADN clivés par cet enzyme), mais tous deux peuvent induire des variations génétiques et des altérations chromosomiques qui contribuent à la leucémogénèse.

L'exposition aux radiations ionisantes (comme les rayons X par exemple) peut avoir un pouvoir leucémogène. En 1954, une étude a montré que 75 cas d'hémopathies malignes ont été recensés parmi une population estimée de survivants des bombes atomiques à Hiroshima et Nagasaki au Japon (50). Cependant, le lien entre la radiothérapie en monothérapie et la survenue de LAM après ce traitement est moins bien établi que celui avec la chimiothérapie. Patel et al., en 2021, ont montré que dans leur cohorte de patients, les LAM survenues après radiothérapie présentaient des anomalies cytogénétiques dans les chromosomes 5 et/ou 7 et la médiane de latence entre la radiothérapie et la survenue de diagnostic de LAM était de 6.5 ans (31). Toutefois, selon le contexte, l'association de la radiothérapie et de la chimiothérapie anticancéreuse n'accroît pas forcément le risque d'apparition de LAM. Par ailleurs, l'exposition aux agents chimiques comme le benzène (51), les pesticides ou les herbicides serait leucémogène provoquant des perturbations et des cassures au niveau de l'ADN via certains de leurs métabolites. Ces métabolites engendreraient des instabilités génétiques favorisant une prolifération incontrôlée des CSH indifférenciées, due à une régulation homéostatique défectueuse dans la niche de la moelle osseuse (52,53). Ce dysfonctionnement serait probablement causé par des altérations de certaines voies de signalisation (54), plutôt que par l'apparition directe de lésions cytogénétiques.

Certaines infections virales sont également associées à une augmentation du risque de développer des hémopathies malignes telles que la leucémie. Les virus Epstein-Barr (EBV) et le virus lymphotrope à cellules T humain de type 1 (HTLV-1) sont particulièrement notables dans ce contexte. D'une part, l'EBV peut infecter les cellules B et les cellules épithéliales, menant parfois à une transformation maligne via l'activation de gènes oncogènes et l'inhibition de gènes suppresseurs de tumeurs (55,56). D'autre part, le HTLV-1 infecte les lymphocytes T CD4+, et un de ses principaux gènes viraux joue un rôle clé dans l'oncogénèse, notamment en favorisant la prolifération cellulaire et en inhibant l'apoptose ainsi que les mécanismes de contrôle

de la croissance cellulaire (57). Ces deux virus induisent un environnement immunosuppresseur local et systémique (58,59), réduisant la capacité du système immunitaire à éliminer les cellules infectées. Ainsi, les cellules infectées peuvent survivre et proliférer de manière incontrôlée grâce à un mécanisme d'échappement au contrôle immunitaire, ce qui est propice à l'émergence de tumeurs ou d'hémopathies malignes.

E) Manifestations cliniques des LAM

La prolifération tumorale et l'insuffisance médullaire observées dans les LAM surviennent assez rapidement entraînant ainsi un diagnostic précoce de l'hémopathie. Les signes cliniques ne sont pas très francs dans les LAM. En effet, certains ne sont pas spécifiques et sont communs à toutes les hémopathies comme la fièvre et l'altération de l'état général (fatigue, amaigrissement, asthénie).

Les manifestations cliniques principales sont liées aux cytopénies du patient dues à l'insuffisance médullaire en cours, provoquée par la LAM. Tout d'abord, un syndrome hémorragique peut être observé en raison d'une thrombopénie, se manifestant par des épistaxis, des ecchymoses, ou des hémorragies muqueuses, intra-buccales, digestives ou cérébrales. Ensuite, un syndrome anémique en raison d'un défaut de l'érythropoïèse peut se présenter avec une tachycardie, une dyspnée, une pâleur cutanéomuqueuse, vertiges, et/ou de la fatigue. Enfin, les patients atteints de LAM sont souvent très neutropéniques, ce qui favorise le développement d'un syndrome infectieux (infections récurrentes et réfractaires, sepsis ...).

L'infiltration tumorale est souvent peu présente dans la LAM. Cependant, il est possible de noter une tuméfaction des organes hématopoïétiques (adénopathies, splénomégalie et/ou une hépatomégalie), une hypertrophie gingivale (notamment dans les formes très leucocytaires), des lésions cutanéomuqueuses (leucémides, testiculaires), des douleurs osseuses ainsi que des symptômes neurologiques liés à la présence de quelques blastes dans le liquide céphalo-rachidien. De plus, des tumeurs solides composées de cellules leucémiques, appelées chloromes, peuvent se manifester chez certains patients et ont des localisations extra-médullaires (cerveau, os, peau, ...).

Trois situations cliniques sont cependant considérées comme urgentes dans le cadre de la LAM : la coagulation intravasculaire disséminée (CIVD), la leucostase et le syndrome de lyse tumorale. La CIVD se définit par une hyperactivation de la cascade de coagulation entraînant une consommation importante des plaquettes, du fibrinogène et des facteurs de coagulation, ce qui conduit à des saignements

incontrôlés et à la formation de caillots au niveau des petits vaisseaux sanguins. La leucostase est la conséquence d'une hyperleucocytose due à un nombre important de blastes. Cela cause l'obstruction des vaisseaux sanguins et ainsi une mauvaise oxygénation des tissus, car les blastes empêchent les globules rouges d'atteindre ces tissus. Les symptômes se manifestent surtout au niveau pulmonaire et neurologique ressemblant respectivement à une détresse respiratoire (dyspnée, essoufflements) et à un accident vasculaire cérébral (confusion, céphalée, troubles de l'élocution, vision floue). Le syndrome de lyse tumorale est également causé par l'hyperleucocytose circulante, libérant dans le sang des substances telles que le potassium, le phosphate et l'acide urique, ce qui peut provoquer une insuffisance rénale aiguë avec une augmentation de la créatinine. Les patients souffrant de ce syndrome présentent souvent des symptômes digestifs (nausées, vomissements ou diarrhées), des convulsions dues à une hypocalcémie consécutive et des arythmies cardiaques. Certains patients peuvent ne présenter aucun symptôme, et la découverte de la LAM peut alors être fortuite, à la suite d'un hémogramme réalisé pour d'autres raisons.

F) Diagnostic biologique des LAM exprimant le CD19

Après avoir abordé les généralités sur les LAM, nous allons nous concentrer sur les LAM exprimant le CD19 à leur surface, également appelées LAM CD19+.

Les LAM exprimant le CD19 (ou LAM CD19+) représentent un sujet de recherche et de débat dans la littérature scientifique. Typiquement, le CD19 est un marqueur associé aux cellules B lymphoïdes et donc, n'est généralement pas exprimé sur les cellules myéloïdes. Ainsi, les cas de LAM exprimant le CD19 sont rares et inhabituels. Ces LAM présentent un phénotype immunologique aberrant associé à la leucémie (LAIP) ou en anglais *Leukemia-Associated Immunophenotype*.

Les cas rapportés de LAM exprimant le CD19 dans la littérature impliquent souvent des analyses détaillées de la morphologie cellulaire, de l'immunophénotypage et des études génétiques pour caractériser ces leucémies atypiques. Nous allons les reprendre dans ce paragraphe. Ces analyses sont essentielles pour identifier les caractéristiques distinctives de ces leucémies rares et comprendre leur comportement clinique et leur réponse au traitement. Par exemple, des études ont montré que ces LAM CD19+ peuvent parfois présenter des translocations spécifiques (comme la t(8 ;21)) ou non. L'immunophénotypage permet de confirmer l'expression aberrante de CD19 et d'autres marqueurs cellulaires, tandis que les études génétiques offrent des informations cruciales sur les anomalies sous-jacentes.

a) Bilan cytologique

Après une numération de formule sanguine sur 200 cellules comptées via un hémogramme, une suspicion de LAM peut être soulevée en présence de bi- ou pancytopenie d'installation brutale. En effet, l'analyse sanguine révèle souvent une anémie normocytaire normochrome arégénérative, fréquemment associée à une thrombopénie centrale et/ou périphérique, qui peut entraîner une CIVD. La numération leucocytaire est variable, mais une neutropénie est presque toujours présente, augmentant le risque infectieux chez les patients leucémiques. L'élément le plus notable et crucial à observer dans cet examen est la présence de blastes circulants. Cependant, tout décompte de blastes sur hémogramme doit être confirmé par un décompte sur un myélogramme pour obtenir un pourcentage médullaire (le décompte doit être effectué sur au moins 500 cellules). Un myélogramme permet également de réaliser une meilleure description morphologique des blastes et de classer la LAM selon la classification FAB, fournissant ainsi une première orientation clinique. Cela est aussi possible grâce à l'évaluation d'un paramètre cytochimique supplémentaire : la coloration à la myéloperoxydase (en effet, l'estérase n'est plus réalisée en routine). Dans un diagnostic de LAM, la moelle est souvent de richesse augmentée avec des blastes ayant un rapport nucléo-cytoplasmique élevé. Les blastes de LAM présentent un noyau à chromatine fine avec 1 ou plusieurs nucléoles visibles au microscope optique et un cytoplasme variablement basophile pouvant contenir ou non des granulations azurophiles ou des corps d'Auer (en fagot ou en aiguille de boussole). Les différents aspects morphologiques et cytochimiques des blastes permettent de caractériser un sous-type de LAM d'où l'importance de la double description et du double comptage sang/moelle pour essayer de fournir un diagnostic précis selon la classification FAB. Comme écrit précédemment, le seuil de 20% de blastes sanguins ou médullaires permet de poser le diagnostic pour la majorité des LAM (pour les LAM avec anomalies génétiques récurrentes, un seuil de 10% suffit) et de distinguer les LAM des SMD/LAM. Si le prélèvement du myélogramme est impossible, la réalisation d'une biopsie ostéo-médullaire est nécessaire mais la lecture sera effectuée par le secteur d'anatomo-pathologie.

b) Bilan phénotypique

L'immunophénotypage par cytométrie en flux (CMF) multiparamétrique est une étape importante dans le diagnostic des LAM. Elle arrive souvent à la suite de la première identification faite sur l'hémogramme et le myélogramme pour nous confirmer ou nous préciser l'origine (myéloïde ou lymphoïde) de la leucémie aiguë (LA) mais également

la présence de certains marqueurs extra ou/et intracellulaires caractérisant le stade de différenciation des cellules blastiques. En CMF, nous utilisons des tubes EDTA de sang ou de moelle. Après une étape d'isolement des cellules mononucléées (CMN) puis une incubation avec des anticorps spécifiques des marqueurs d'intérêt couplés à des fluorochromes, chaque cellule en suspension passe finalement à travers les différents faisceaux lasers composant le cytomètre, où elles émettent un signal lumineux fluorescent spécifique de chaque fluorochrome. L'ELN 2022 (23) a listé tous les marqueurs cytoplasmiques et de surface intéressants pour le diagnostic de LAM (Table 3). Le délai de rendu de résultat de l'immunophénotypage des leucémies aiguës (LA) est de 1 à 3 jours.

En CMF, le CD19, est souvent inclus dans le panel de marqueurs diagnostiques de LA pour orienter sur son origine (lymphoïde ou myéloïde ou les deux) ou déceler une expression aberrante.

Le CD19 est une glycoprotéine transmembranaire codé par le gène *CD19* localisé au niveau du bras court du chromosome 16. Il fait partie de la superfamille des immunoglobulines qui est exprimé par les lymphocytes B (normaux et néoplasiques), de leur forme précoce (lymphocytes pré-B), jusqu'à leur différenciation terminale en plasmocytes (60). Néanmoins, le rôle du CD19 dans les LAM reste encore incertain.

Marqueurs phénotypiques cytoplasmiques ou extracellulaires		
Diagnostic de LAM	Marqueurs de précurseurs	CD34, CD117, HLA-DR
	Marqueurs myéloïdes	MPO cytoplasmique, CD33, CD13
	Marqueurs de maturation myéloïde	CD11b, CD15, CD64, CD65
	Marqueurs monocytaires	CD14, CD36, CD64, CD4, CD38, CD11c
	Marqueurs mégaryocytaires	CD41 (glycoprotéine IIb.IIIa), CD61 (glycoprotéine IIIa), CD36
	Marqueurs érythroïdes	CD235a (glycophorine A), CD71, CD36
Diagnostic de LA bi ou multilinéale	Lignée myéloïde	MPO ou ≥ 2 des marqueurs de la différenciation monocyttaire (estérase non spécifique, CD11c, CD14, CD64, lysozyme) ou ≥ 2 des marqueurs myéloïdes (CD117, CD33, CD13)
	Lignée T	CD3 cytoplasmique (avec des anticorps spécifiques de la chaîne ε du CD3) ou CD3 en surface
	Lignée B	CD19 fort avec ≥ 1 des marqueurs suivants exprimés fortement : CD79a, CD22c ou CD10 ou CD19 faible avec ≥ 2 des marqueurs suivants exprimés fortement : CD79a, CD22c ou CD10

Table 3 – Expression de marqueurs cytoplasmiques et de surface pour le diagnostic de LAM et de LA bi-ou multilinéale d'après l'ELN 2022(23)

Les phénotypes immunologiques aberrants associés à la leucémie ou LAIPs sont divisés en 5 sous-groupes principaux : expression asynchrone d'antigènes (expression simultanée de marqueurs précoces et tardifs à la surface d'une cellule, comme la coexpression du CD34 et CD15) ; infidélité de lignée (expression concomitante de marqueurs associés appartenant physiologiquement à des lignées différentes ; par exemple, expression des marqueurs associés aux cellules lymphoïdes

comme le CD2, CD3, CD5, CD7, CD10 et CD19 sur des blastes myéloïdes) ; surexpression de certains antigènes par rapport à leur niveau d'expression physiologique (par exemple, expression anormalement accrue des marqueurs myéloïdes : CD13, CD33, CD15 ou CD14) ; modification des paramètres morphométriques (graphe de CMF aberrant en taille-structure) ; absence d'antigènes spécifiques de lignée (absence d'expression d'antigènes tels que CD13 et CD33 par les blastes myéloïdes)(61–63). Les LAM exprimant le CD19 font partie du sous-groupe d'infidélité de lignée des LAIP.

Dans les LAM avec une infidélité de lignée en raison de leur expression aberrante de certains marqueurs lymphoïdes, le score immunophénotypique pour les marqueurs myéloïdes doit être strictement supérieur à 2 alors que pour les marqueurs lymphoïdes, il doit être strictement inférieur à 2 (Table 4). Les marqueurs lymphoïdes les plus fréquemment exprimés de façon aberrante dans les LAM sont le CD7, le CD19 et le CD56 (64).

L'identification par CMF du CD19 à la surface des blastes mais également des marqueurs myéloïdes tels que l'antigène de la myéloperoxydase (AgMPO), le CD33 et le CD13 et ceux d'immaturité comme le CD34 et le HLA-DR correspond à l'étape déterminante et cruciale dans le diagnostic de LAM CD19+. En effet, c'est l'expression aberrante du marqueur lymphoïde B, le CD19, par les « cellules immatures » ou blastes (HLA-DR+ et/ou CD34+ ou/et autres marqueurs d'immaturité) myéloïdes (CD33+ ou/et CD13+ ou/et AgMPO+ ou/et autres marqueurs myéloïdes) qui permet principalement de caractériser cette hémopathie. Cependant, il faut prêter attention également aux autres marqueurs présents à la surface des blastes pour pouvoir exclure les autres LA pouvant exprimer le CD19 comme les leucémies aiguës lymphoblastiques de type B (LAL-B)(65), les LA biphénotypiques (66,67) (Table 4) et les LA bi ou multi-linéales (23) (Table 3). Aucun autre marqueur des cellules lymphoïdes B n'est présent dans les LAM CD19+. Des marqueurs supplémentaires sont alors nécessaires dans le panel de CMF d'identification et de diagnostic des LAM (Tables 3 et 4). Ils aident ainsi à caractériser plus précisément les cellules leucémiques présentes et à distinguer les LAM avec une expression aberrante du CD19 parmi les autres LA citées précédemment. Cette étape est donc essentielle pour rendre un diagnostic précis et permettre par la suite, une prise en charge appropriée.

	2 points	1 point	0.5 points
Lignée myéloïde	MPO Lysozyme	CD117 CD33 CD13 CD65a	CD14 CD15 CD64
Lignée B	CD79a IgM cytoplasmique CD22 cytoplasmique	CD19 CD20 CD10	TdT CD24
Lignée T	CD3 (cytoplasmique ou surface) TCR α/β TCR γ/δ	CD2 CD5 CD8 CD10	TdT CD1a CD7

Table 4 – Système de score pour déterminer une LA biphénotypique d’après l’EGIL (*European Group of Immunology of Leukemia*) 1998(66,67) Des points sont attribués aux marqueurs que l’EGIL a jugé utile pour le diagnostic des LA biphénotypiques. Cette valeur va de 2 points pour les marqueurs les plus spécifiques d’une lignée à 0.5 pour les marqueurs les moins spécifiques. Une LA biphénotypique a un score strictement supérieur à 2 pour 2 lignées différentes. Abréviations : α , alpha ; β , beta ; δ , delta ; γ , gamma ; MPO, myéloperoxydase ; TCR, récepteur des lymphocytes T ; TdT, *Terminal deoxynucleotidyl transferase*

Le marquage du CD19 couplé à celui de la lignée myéloïde et des précurseurs pour les blastes dans le cadre des LAM CD19+ à différents temps pendant et post-traitement peut également permettre le suivi de la maladie résiduelle minimale (MRD) par détection de LAIP par CMF car elle permet une détection plus fiable des cellules leucémiques (23,68,69). En effet, cela correspond à l’immunophénotype que présentent les blastes des LAM CD19+ au diagnostic. Le principe de la MRD en CMF repose sur cette évaluation multiparamétrique pour déterminer quantitativement le nombre de cellules leucémiques présentant cet immunophénotype de diagnostic et ainsi définir le statut du patient face à son traitement et à sa maladie (rémission ou non). D’autre part, elle contribue également à suivre la progression de la maladie, à prévenir une rechute (imminente ou après rémission) et à optimiser les réponses aux traitements pour éviter un échec thérapeutique. Toutefois, d’après les recommandations de l’ELN 2022, le CD19 ne fait pas partie des marqueurs de base listés pour évaluer la MRD en CMF. Cette approche avec la détection par LAIP peut offrir plusieurs avantages comme une bonne précision grâce à la spécificité de cet immunophénotype par les blastes, un suivi personnalisé, une sensibilité accrue (la MRD peut être détectée à des seuils très bas en CMF allant jusqu’à 10^{-4}) pour ainsi mieux évaluer le risque de rechute des patients. Cette méthode de suivi est plus informative, fiable et prédictive du pronostic (rémission ou rechute) que celle conventionnelle basée sur la morphologie cytologique.

c) Étude cytogénétique et bilan de biologie moléculaire

1. Étude cytogénétique

L’analyse cytogénétique conventionnelle est obligatoire au diagnostic dans l’évaluation pronostique de la LAM. En effet, elle permet d’affiner le diagnostic, ce qui est essentiel

dans l'élaboration d'une prise en charge ciblée et personnalisée pour le patient. En outre, cette analyse fournit des informations pronostiques importantes sur la LAM (23). La cytogénétique conventionnelle correspond à la mise en œuvre de techniques de culture cellulaire et microscopiques (techniques de bandes) permettant l'établissement du caryotype.

L'analyse est réalisée préférentiellement sur un échantillon médullaire pour lequel le recueil a été effectué dans un tube hépariné. La mise en culture est effectuée dans des conditions stériles avec un nombre de cellules à ensemercer compris entre 0.5 et 2×10^6 cellules par millilitre pour une incubation à 37°C avec du CO₂ 5% pendant 24 heures en présence ou non de *Granulocyte colony-stimulating factor* (G-CSF) (pour avoir un nombre suffisant de cellules en métaphase). Au diagnostic, un minimum de 20 mitoses à analyser est nécessaire en l'absence d'anomalie détectée (comptage et identification des chromosomes) pour permettre de classer 4 à 5 caryotypes mais aussi dans les cas de caryotype complexe et/ ou d'anomalies additionnelles (70) et dans les cas d'anomalies clonales ou sous-clonales (71). En général, en cas d'anomalie, le nombre minimum de mitoses à analyser doit permettre d'établir la clonalité du ou des clone(s) anormal(aux). Selon *the International System of Human Cytogenomic Nomenclature* (ISCN) de 2020(72), un clone est considéré quand une même anomalie chromosomique de structure ou de gain est présente dans au moins deux cellules en mitose et dans au moins trois cellules pour une perte de chromosome (71). Dans certains cas, il est souhaitable de confirmer ou d'infirmer une éventuelle clonalité par une technique de cytogénétique moléculaire supplémentaire en utilisant une sonde spécifique de l'anomalie suspectée (FISH, *fluorescence in situ hybridization*). Pour l'interprétation de l'analyse cytogénétique, il est utile de connaître les données cytologiques (hémogramme et myélogramme) et immunophénotypiques de la LAM pour savoir si d'éventuelles analyses complémentaires doivent être ajoutées (FISH (interphasique ou métaphasique) ou biologie moléculaire). En effet, en cas d'échec au caryotype ou de suspicion de présence d'anomalie cytogénétique d'après les différents arguments cliniques ou morphologiques rapportés, il est fortement recommandé d'ajouter ces analyses (73). Un des principaux intérêts de la FISH est effectivement la détection d'une anomalie cryptique (trop petite pour être détectée au caryotype). De plus, l'analyse cytogénétique permet de proposer une orientation à la fois diagnostique mais aussi pronostique de la LAM identifiée(74).

D'après la classification des LAM de l'ICC 2022 (21), les anomalies chromosomiques incluent soit des anomalies de structure telles que les translocations, les inversions, les délétions ou les duplications soit des anomalies de nombre telles que les trisomies,

les monosomies ou les hyperploïdies. La cytogénétique apporte ainsi une meilleure compréhension des mécanismes physiopathologiques sous-jacents de la LAM identifiée.

La question du suivi en cytogénétique dans les LAM est encore discutable car il n'y a pas encore d'indication de suivi par cytogénétique de la maladie résiduelle. Par ailleurs, pour la recherche d'une anomalie chromosomique préalablement décelée au diagnostic et en fonction du contexte clinique, il est possible d'augmenter la sensibilité de l'analyse de cytogénétique conventionnelle en augmentant le nombre de métaphases à analyser et/ou en réalisant une recherche par cytogénétique moléculaire. Ce suivi sera alors informatif pour le contrôle d'une rémission complète (pour savoir si la LAM est réfractaire ou non) mais également pour le dépistage d'une éventuelle rechute par réapparition d'un clone initial ou l'apparition d'anomalies chromosomiques supplémentaires.

De nouvelles technologies peuvent être développées en cytogénétique moléculaire telles que le *Comparative Genomic Hybridization* (CGH array) dans la détection des pertes et gains chromosomiques (aujourd'hui indiqué en complément ou en cas d'échec du caryotype) et le *Whole genome sequencing* dans l'identification des réarrangements équilibrés.

2. Bilan de biologie moléculaire

La place de la biologie moléculaire devient de plus en plus importante dans le diagnostic ainsi que dans le pronostic des LAM pour une meilleure mise en place de prise en charge thérapeutique du patient. L'ELN 2022 a établi une liste de gènes à dépister pour poser un diagnostic, mais aussi pour identifier d'éventuelles cibles thérapeutiques, essentielles pour une prise en charge personnalisée du patient(23) . Ainsi, le répertoire de gènes est le suivant : *FLT3, IDH1, IDH2, NPM1, CEBPA, DDX41, TP53, ASXL1, BCOR, EZH2, RUNX1, SF3B1 ; SRSF2, STAG2, U2AF1, ZRSR2*.

Par ailleurs, cette liste de gènes tend à être mise à jour en fonction de l'évolution des connaissances dans ce domaine en recherche. De plus, le dépistage de variation génétique de manière individuelle est de plus en plus remplacé par un dépistage utilisant des panels de gènes grâce au séquençage de nouvelle génération (NGS). En effet, c'est déjà le cas au CHU de Lille pour la majorité des gènes à partir d'échantillon d'acide désoxyribonucléique (ADN). La surexpression de certains gènes comme l'*EV11* et *WT1* est quantifiée par *real-time quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction* (RQ-PCR). De plus, la recherche de duplication du gène *FLT3 (FLT3-ITD*

(*internal tandem duplications*)) est réalisée par analyse de fragment plutôt que par NGS en raison de sa sensibilité, de sa rapidité, et de sa fiabilité.

D'autres gènes peuvent être aussi recherchés au diagnostic comme *ANKRD26*, *BCORL1*, *BRAF*, *CBL*, *CSF3R*, *DNMT3A*, *ETV6*, *GATA2*, *JAK2*, *KIT*, *KRAS*, *NRAS*, *NF1*, *PHF6*, *PPM1D*, *PTPN11*, *RAD21*, *SETBP1*, *TET2*, *WT1*. Ces gènes ne sont pas requis pour le diagnostic ni en thérapeutique mais surtout pour le suivi de la MRD en biologie moléculaire (à l'exception des variations génétiques au niveau des gènes *DNMT3A* et *TET2* qui peuvent causer l'apparition d'un clone pré-malin au cours de l'hématopoïèse).

De surcroît, il est aussi important de considérer le dépistage des réarrangements génétiques. Ceux-ci résultent de translocations chromosomiques qui entraînent la fusion de deux gènes, ce qui conduit à la production d'un acide ribonucléique (ARN) puis d'une protéine chimérique. En effet, ce dépistage des réarrangements génétiques doit être effectué pour confirmer la translocation retrouvée en analyse cytogénétique (ou s'il y a eu un échec de technique tel que la mauvaise qualité de morphologie des chromosomes ou l'absence d'une anomalie cytogénétique fortement suspectée) et pour la mise en place rapide d'une thérapie appropriée. La méthode utilisée au CHU de Lille consiste en une détection par RT-MLPA (*reverse transcriptase-multiplex ligation-dépendent probe amplification*) couplée à une identification par pyroséquençage (quantification des gènes de fusion sur ADN circulant par RQ-PCR) (75). Si une translocation a été observée en cytogénétique mais que le réarrangement génétique correspondant n'est pas retrouvé en RT-MLPA, une analyse des signatures transcriptomiques peut être effectuée se résumant à l'étude de l'expression des gènes fondée sur le séquençage des transcrits à partir des ARNs totaux. Les réarrangements génétiques recherchés au dépistage sont : *PML::RARA*, *CBFB::MYH11*, *RUNX1::RUNX1T1*, réarrangements de *KMT2A*, *BCR::ABL1*, et d'autres gènes de fusion plus rares. Ainsi, leur détection permet d'affirmer le diagnostic des LAM avec anomalies génétiques récurrentes décrites dans les classifications de l'OMS et ICC 2022.

La MRD peut aussi être suivie par des techniques de biologie moléculaire (PCR digitale (d(d)PCR) ou RQ-PCR) sur des échantillons sanguins ou médullaires. Cette méthode est très sensible. Le marqueur le plus spécifique des cellules blastiques est utilisé comme marqueur de suivi de la MRD. Il est important également de prendre en considération la stabilité de ce marqueur en cas de rechute. Les cibles utilisées pour le suivi sont soit des transcrits de fusion tels que *RUNX1::RUNX1T1*, *BCR::ABL1*, *CBFB::MYH11*, *KMT2A::MLLT3*, *DEK::NUP214*, soit une surexpression d'un gène

comme *EVI1*, *WT1*, soit un variant au niveau d'un gène comme *NPM1*, *IDH1/IDH2*, *FLT3-ITD*, *JAK2*... . Toutefois, il est nécessaire de distinguer les variations génétiques pertinentes pour caractériser la LAM, en vue du suivi de la MRD, des anomalies liées à l'hématopoïèse clonale. Le suivi de la MRD peut être également réalisé par NGS pour les variations génétiques individuelles (cependant, le seuil n'est pas bien défini dû à un manque de normalisation de la technique mais la MRD est considérée comme positive de façon provisionnelle quand la proportion de variations génétiques individuelles est $\geq 0.1\%$ de la fréquence allélique du variant)(23).

3. Dans le cadre des LAM exprimant le CD19

Au diagnostic, la grande majorité des cas de LAM exprimant le CD19 présentent une translocation $t(8 ;21)(q22 ;q22)$ (76–79). De nombreuses études montrent une certaine corrélation entre cette translocation $t(8 ;21)$ et l'expression aberrante du CD19(77,78,80,81). La translocation $t(8 ;21)$ entraîne l'expression du gène de fusion *RUNX1::RUNX1T1*. Le gène *RUNX1* code pour la sous-unité α du complexe CBF (*core binding factor*), un facteur de transcription impliqué dans l'hématopoïèse normale. Cette translocation représente 5-10% des LAM. Elle entraîne la formation d'un gène de fusion entre les gènes *RUNX1* (appelée aussi *AML1* ou *CBF α*) situé en 21q22 et *RUNX1T1* (*ETO*) en 8q22. Elle peut être associée à des anomalies secondaires telles que la perte d'un chromosome sexuel (X chez les femmes ou Y chez les hommes) et la délétion partielle du bras long d'un chromosome 9 (*del 9q*). Cependant, ces anomalies secondaires ne modifient pas le bon pronostic de cette translocation. Au myélogramme, les LAM avec une translocation $t(8 ;21)$ peuvent s'affilier aux LAM2 selon la classification FAB, avec la présence de blastes à cytoplasme possédant possiblement un long et fin corps d'Auer dit en « aiguille de boussole » (82). L'expression aberrante du CD19 peut, dans certains cas avec la translocation $t(8 ;21)$, être associée à une expression aberrante du CD56 (83,84)et du CD7 (76) et ainsi contribuer à la détection rapide et spécifique des blastes dans le suivi de la MRD (85). La fréquence d'expression du CD19 varie suivant les différents cas (76).

Dans l'étude de Piñero et al., quelques cas de LAM présentant le transcrit *PML::RARA* expriment aussi de façon aberrante le marqueur lymphoïde CD19 (84). La fusion du gène *PML* localisé en 15q24 et du gène *RARA* en 17q21 est effectivement causée par la translocation $t(15 ;17)$ qui est pathognomonique des LAM3 de la classification FAB ou LA promyélocytaire. Elle peut être *de novo* ou secondaire à un cancer, en particulier celui du sein traité par anthracyclines. La trisomie 8 est l'anomalie secondaire la plus

fréquemment associée à cette translocation mais n'affecte pas son bon pronostic (82). Au myélogramme ou à l'hémogramme, les blastes sont des promyélocytes anormaux comportant un cytoplasme avec des grosses granulations azurophiles et/ou des corps d'Auer en fagot pour certains d'entre eux et un noyau dystrophique (réniforme ou bilobé) avec un ou plusieurs nucléoles et une chromatine fine.

De plus, une corrélation significative a été retrouvée entre la translocation t(9;22) responsable de la fusion du gène *BCR::ABL1* et la co-expression du CD19 et du CD34 (77). Dans d'autres cas rapportés, l'expression aberrante du CD19 s'est retrouvée présente avec cette même translocation (76).

Pour rappel, d'après la classification de l'ICC 2022, en présence d'une de ces trois translocations, un taux de blastes supérieur ou égal à 10% classe l'hémopathie en LAM.

Par ailleurs, dans l'étude de Kita et al.(76), des cas avec des caryotypes normaux associés à une expression aberrante du CD19 ont été également rapportés.

D'autres translocations ou anomalies cytogénétiques ainsi que d'autres variations génétiques ont été rapportées dans la littérature, associées à une expression aberrante du CD19 dans le diagnostic de LAM (86). Cette variabilité souligne l'importance d'une analyse cytogénétique, génétique et immunophénotypique détaillée dans la prise en charge des LAM, afin d'identifier les cibles thérapeutiques appropriées et d'améliorer les résultats cliniques pour les patients.

d) Examens biologiques et cliniques additionnels nécessaires

D'autres analyses biologiques et examens cliniques sont recommandés lors de la suspicion de LA au moment du diagnostic. Ces investigations permettent de prévenir certaines complications et urgences associées à la LA mais aussi d'évaluer la situation clinique du patient avant de lui administrer un traitement adapté.

Tout d'abord, une recherche systématique de CIVD doit être réalisée. Cela inclut des tests de coagulation tels que le temps de prothrombine (TP) ou *International normalized ratio* (INR) (si le patient est sous anti-vitamine K), le temps de céphaline activée (TCA) ainsi que les dosages du fibrinogène, du facteur V de la cascade de coagulation, des D-dimères et des monomères de fibrine. Ensuite, pour vérifier la présence éventuelle d'un syndrome de lyse tumorale sous-jacent, des analyses biochimiques doivent être effectuées comprenant les dosages de lactate déshydrogénase (LDH), de phosphate, de calcium et d'acide urique dans le sang. Il est également nécessaire d'évaluer la fonction rénale (dosages sanguins d'urée et de créatinine avec calcul du débit de filtration glomérulaire (DFG)) et la fonction hépatique

du patient (dosages sanguins de transaminases, de bilirubine, de phosphatase alcaline, de protéines totales) avant le début du traitement. La fonction cardiaque doit aussi être explorée (électrocardiogramme, dosage sanguin de la créatine phosphokinase, échographie cardiaque) si une chimiothérapie à base d'anthracyclines est envisagée en raison de leur potentiel cardiotoxique.

Pour les femmes en âge de procréer, un dosage sanguin de l'hormone gonadotrophine chorionique humaine (HCG) est conseillé car certains traitements peuvent être tératogènes et leur utilisation serait alors contre-indiquée en cas de grossesse. De plus, pour les hommes et les femmes en âge procréer, une cryopréservation, respectivement, du sperme et des ovocytes, leur est proposée en accord avec les souhaits de procréation et de conservation de la fertilité des patients.

Les dosages de glycémie et de triglycéridémie d'une part et d'autre part, ceux de sodium, potassium, chlore dans le sang sont préconisés pour une première approche de l'état métabolique et de l'équilibre ionique du patient au moment du diagnostic.

Les patients atteints de leucémie aiguë présentent un risque accru d'infections en raison de leur cytopénie, surtout la neutropénie. Ainsi, en complément du dosage sanguin de la protéine C-réactive (CRP) et d'un examen clinique évaluant les signes d'infection, des prélèvements infectieux et une tomodensitométrie du thorax (si suspicion d'infection pulmonaire) doivent être exécutés. Il est également essentiel de connaître le statut viral au diagnostic du patient à travers des examens sérologiques (hépatite A, B, C, virus de l'immunodéficience de type 1 (VIH-1), cytomegalovirus (CMV), EBV, virus Herpes simplex (HSV), virus varicelle-zona (VZV)). Si une allogreffe de cellules souches périphériques ou de moelle osseuse est envisagée, le statut CMV du patient est requis (bien qu'avec le letermovir (traitement préventif de l'infection au CMV), ce critère soit de moins en moins déterminant dans le choix des donneurs), ainsi que son groupe sanguin et son typage HLA (*Human leukocyte antigen*). Si le parcours de greffe est fortement engagé, il est important de rechercher des donneurs dans la famille du patient mais si aucun membre familial n'est compatible, une recherche parmi des donneurs volontaires non apparentés sera entreprise. De plus, au cours de sa chimiothérapie, le patient peut présenter une aplasie périphérique, ce qui peut entraîner des variations importantes de plusieurs paramètres sur son hémogramme nécessitant un support transfusionnel (plaquettes ou culots globulaires). Il est donc crucial de connaître les sérologies virales et le groupe sanguin pour éviter les réactivations et les accidents transfusionnels.

Si des signes neurologiques ou/et une hyperleucocytose sont présents, une ponction lombaire est fortement suggérée afin de contrôler la présence de blastes dans le

liquide céphalo-rachidien. En complément, une imagerie est conseillée pour détecter les saignements intracrâniens, une maladie leptoméningée et des lésions massives cérébrales.

Au niveau clinique, le statut de performance du patient est gradé à l'aide du score *Eastern Cooperative Oncology Group* (ECOG), ce qui permet de chiffrer son état de santé général. Un examen physique complet est également mis en œuvre pour prêter une attention particulière aux symptômes cutanés et muqueux (*leukemia cutis* ou pétéchies, hyperplasie gingivale), aux lymphadénopathies et à l'augmentation du volume testiculaire.

G) Pronostic des LAM CD19+

Le pronostic d'une maladie dépend de l'influence de certains paramètres et variables cliniques et biologiques sur la survie sans événement, la survie sans rechute, ainsi que la survie globale. Les facteurs pronostiques des LAM peuvent être à la fois inhérents au patient et à l'hémopathie (87). Les LAM CD19+ sont des leucémies aiguës myéloïdes présentant une expression aberrante du CD19, ce qui peut leur conférer des caractéristiques communes aux LAM en général. Par conséquent, cette section discutera d'abord du pronostic des LAM de manière générale, avant de se concentrer plus spécifiquement sur le rôle du CD19 dans le risque associé aux LAM CD19+.

Parmi les facteurs spécifiques du patient, l'âge est un critère essentiel. Un âge avancé est souvent lié à un pronostic moins favorable, notamment si l'état général du patient est très faible ou médiocre (ECOG <2), ce qui accroît le risque de décès précoce (moins de 30 jours après le début du traitement d'induction). De plus, les personnes âgées présentent une proportion plus élevée de multirésistance aux traitements ou d'anomalies chromosomiques à cytogénétique défavorable (88,89). Cependant, la prise en compte des comorbidités du patient s'est avérée pertinente pour prédire le taux de mortalité précoce et la survie globale, en particulier chez les patients âgés, pour la mise en place d'une thérapie d'induction (90). Par conséquent, l'âge ne devrait pas être le seul critère limitant des décisions thérapeutiques. Les facteurs propres aux patients sont considérés comme prédictifs de la mortalité liée au traitement.

Parmi les facteurs pronostiques spécifiques de la LAM, on retrouve des éléments biologiques présents au moment du diagnostic, tels que l'éventuelle hyperleucocytose circulante et la caractérisation des anomalies chromosomiques et moléculaires présentes dans les cellules blastiques. D'autres facteurs, notamment les antécédents hématologiques prédisposant à la LAM (comme une LAM secondaire à un SMD antérieur), ainsi que l'exposition antérieure à des traitements cytotoxiques, jouent

également un rôle. Ces facteurs liés à la LAM sont *a contrario* de ceux propres au patient, prédictifs de la résistance au traitement classique et conventionnel.

L'ELN classe le risque pronostique des LAM en 3 groupes au moment du diagnostic initial : favorable, intermédiaire, défavorable. Des mises à jour sont faites régulièrement, et la dernière version date de 2022 (Table 5). La cytogénétique représente une partie prédominante dans cette classification. En effet, les caryotypes complexes ou certains déséquilibres chromosomiques (par exemple les pertes affectant les parties 5q, 17p et 7q et les gains touchant le 8q, 11q et 21q) sont systématiquement associés à un pronostic défavorable alors que les anomalies récurrentes moins (telles que les t(8 ;21) et inv(16)). Les hyperdiploïdies ne sont pas considérées automatiquement défavorables (91) mais elles devraient être évaluées avec les anomalies chromosomiques et génétiques associées. Par ailleurs, le fait que certains patients atteints de LAM présentent un caryotype normal a accentué l'importance du paramètre génétique des blastes pour le pronostic de l'hémopathie. En effet, les variations génétiques simples ou en combinaison (en particulier celles des gènes *NPM1*, *CEBPA*, *FLT3* (87), *RUNX1*, *ASXL1*(22), *BCOR*, *EZH2*, *SF3B1*, *SRSF2*, *STAG2*, *U2AF1*, ou *ZRSR2* (23)) ont acquis une signification pronostique croissante au fil des révisions des recommandations de l'ELN. Certains de ces gènes sont d'ailleurs associés à des diagnostics à des âges avancés mais également à des pronostics défavorables (*RUNX1* et *ASXL1*). En outre, les variants de *TP53* sont pris en considération depuis 2017 et sont associés à un très mauvais pronostic. Ils sont souvent combinés avec des caryotypes complexes et des aneuploïdies chromosomiques, telles que des délétions des chromosomes 5 et 7, aggravant ainsi le pronostic (15,22,28). Néanmoins, quelques variations concernant certains de ces gènes (notamment *IDH1/IDH2* ou *DNMT3A*) ne sont pas assignées à un groupe pronostique distinct dans les recommandations de l'ELN 2022 en raison de l'utilisation thérapeutique possible d'inhibiteurs ciblant ces variations (par exemple celles d'*IDH1/IDH2*)(23).

Catégorie de risque pronostique	Anomalies génétiques et cytogénétiques
Favorable	<ul style="list-style-type: none"> ▪ t(8 ;21)(q22 ;q22.1)/<i>RUNX1</i> ::<i>RUNX1T1</i> ▪ inv(16)(p13.1q22) ou t(16 ;16)(p13.1 ;q22)/<i>CBFB</i> ::<i>MYH11</i> ▪ variant <i>NPM1</i> sans <i>FLT3-ITD</i> ▪ bZIP in-frame <i>CEBPA</i> variant (bi-ou monoallélique)
Intermédiaire	<ul style="list-style-type: none"> ▪ variant <i>NPM1</i> avec <i>FLT3-ITD</i> ▪ <i>NPM1</i>wt avec <i>FLT3-ITD</i> (sans lésions génétiques à risque défavorable) ▪ t(9 ;11)(p21.3 ;q23.3)/<i>MLL3</i> ::<i>KMT2A</i> ▪ anomalies cytogénétiques et/ou moléculaires non classées comme favorables ou défavorables
Défavorable	<ul style="list-style-type: none"> ▪ t(6;9)(p23.3;q34.1)/<i>DEK</i> ::<i>NUP214</i> ▪ t(v;11q23.3)/<i>KMT2A</i>-réarrangé (<i>KMT2A-PTD</i> exclu) ▪ t(9;22)(q34.1;q11.2)/<i>BCR</i>::<i>ABL1</i> ▪ t(8;16)(p11.2;p13.3)/<i>KAT6A</i>::<i>CREBBP</i> ▪ inv(3)(q21.3q26.2) ou t(3;3)(q21.3;q26.2)/<i>GATA2</i>, <i>MECOM(EV11)</i> ▪ t(3q26.2;v)/<i>MECOM(EV11)</i>-réarrangé ▪ -5 ou del(5q); 27; 217/abn(17p) ▪ caryotype complexe, caryotype monosomal ▪ variants au niveau des gènes <i>ASXL1</i>, <i>BCOR</i>, <i>EZH2</i>, <i>RUNX1</i>, <i>SF3B1</i>, <i>SRSF2</i>, <i>STAG2</i>, <i>U2AF1</i> et/ou <i>ZRSR2</i> (non défavorables quand associés à une anomalie à risque favorable) ▪ variant <i>TP53</i> (≥10% de fréquence de variation allélique)

Table 5 – Classification du risque pronostique au moment du diagnostic initial d’après l’ELN 2022(23). Des variations génétiques concomitantes de *KIT* et/ou *FLT3* avec la translocation t(8 ;21) et l’inversion du chromosome 16 (inv(16)) ne modifient pas la stratification du risque de ces anomalies cytogénétiques. Un variant *NPM1* est classé comme défavorable lorsqu’il est associé à une anomalie cytogénétique défavorable. La présence de t(9 ;11)(p21.3 ;q23.3) est prioritaire sur les variations génétiques défavorables. Un caryotype est considéré comme complexe quand 3 ou plus d’anomalies chromosomiques sont présentes en l’absence d’anomalies génétiques récurrentes (les hyperdiploïdies avec trois trisomies ou polysomies sont exclues). Le caryotype est dit monosomal en présence d’au moins deux monosomies distinctes (à l’exclusion de la perte des chromosomes sexuels X ou Y) ou d’une seule monosomie autosomique associée avec une anomalie structurale chromosomique (sauf les LAM CBF (core-binding factor)). Abréviations : PTD, *partial tandem duplication* ; wt, *wild-type*

Les facteurs mentionnés précédemment concernent la période pré-traitement. Cependant, avec l’instauration d’un suivi régulier de la MRD dans les services cliniques et biologiques, de nouveaux facteurs pronostiques peuvent également être pris en compte pendant et après le traitement pour qualifier et classer à nouveau les patients atteints de LAM, en dépit des facteurs identifiés avant traitement. La réponse à la thérapie initiale et l’évaluation de la MRD sont désormais intégrées dans la désignation du risque pronostique de la LAM. La cinétique des marqueurs de la LAM pour le suivi de la MRD au cours du traitement est de plus en plus fréquemment évaluée et peut être évocatrice d’une possible rechute ultérieure. De plus, la présence de MRD en post-traitement est associée à un risque accru de rechute dans la plupart des études cliniques (92). L’importance de se focaliser sur les événements biologiques (évaluation de la MRD par CMF et/ou biologie moléculaire) et/ou cliniques post-traitement dans le pronostic de la LAM souligne la nécessité d’un suivi rigoureux de cette hémopathie. Un patient atteint de LAM, initialement considéré comme ayant un risque pronostique favorable, peut être reclassé en risque intermédiaire en fonction du statut de sa MRD.

La classification des risques pronostiques de l’ELN pourrait bientôt être révisée en raison du développement de nouvelles thérapies ciblées pour les LAM, et de la prise

en compte de traitements moins intensifs susceptibles d'être utilisés. Actuellement, cette classification se base sur des patients ayant reçu un traitement intensif.

L'attention se porte désormais sur le risque associé à l'expression aberrante du CD19 dans les LAM. Le CD19 est un marqueur habituellement exprimé sur les lymphocytes B, et son expression dans les LAM est considérée comme atypique ou aberrante. Cette expression aberrante n'a généralement pas un impact positif sur le pronostic des LAM. Au contraire, elle est souvent associée à un pronostic défavorable (93,94). La présence de CD19 à la surface des blastes myéloïdes peut être un indicateur de risque accru de rechute et une survie plus courte(93,95). Bien que rares, comme expliqué précédemment, ces leucémies sont typiquement observées dans les cas de translocations t(8 ;21). Les LAM avec une translocation t(8 ;21) sont généralement de pronostic favorable, mais elles présentent un risque de rechute supérieur à 30%(96). En revanche, même si une LAM liée à une thérapie présente la translocation t(8 ;21) avec des caractéristiques communes à celles diagnostiquées *de novo*, telles que l'expression aberrante de CD19, son pronostic, d'après Gustafson et al. (97), est très défavorable. Toutefois, d'après une méta-analyse de Pinheiro et al.(98), l'expression aberrante du CD19 dans les LAM n'est pas forcément synonyme de mauvais pronostic, comme décrit dans quelques cas de la littérature avec une rémission complète (83,99,100). Cependant, le cas d'une patiente LAM CD19+ a été également publié, avec une absence de rémission et un décès, malheureusement, 3 mois après le diagnostic. Elle présentait une association de l'expression aberrante du CD19 avec seulement une anomalie caryotypique acquise au niveau de deux mitoses où une trisomie 21 avait été détectée (sans l'observation de signes cliniques connus de syndrome de Down). Néanmoins, aucune analyse de biologie moléculaire qualifiant les blastes n'avait été mentionnée donc l'expression aberrante du CD19 est discutable dans le pronostic défavorable de ce cas d'hémopathie (101). En effet, cette expression aberrante du CD19 peut aussi se retrouver dans des LAM avec d'autres anomalies cytogénétiques ou sans aucune translocation spécifique. Le pronostic se mesurera alors à l'échelle moléculaire dans le cas de caryotype normal. Par conséquent, comme écrit précédemment, la question pronostique d'un patient doit prendre en compte tout un ensemble de paramètres caractéristiques de la LAM. Mais, l'importance d'un suivi spécifique de la MRD doit également être un critère important en raison de la rareté de cette LAM CD19+.

Cette expression aberrante du CD19 est fréquemment associée à certains sous-types de LAM qui présentent des rechutes et des difficultés de traitement (LAM réfractaire)(77,85,90,101–105), malgré un pronostic initial potentiellement favorable.

De ce fait, l'expression du CD19 dans les LAM peut aggraver le pronostic en raison de ce risque accru de rechute. Une MRD positive ciblant le CD19 dans les blastes constitue alors un élément pronostique défavorable majeur. Une surveillance plus stricte de la MRD, notamment via la méthode LAIP en CMF, doit être mise en place durant et après le traitement, associée à une technique complémentaire pouvant qualifier autrement les blastes circulants. Cela pourrait permettre une meilleure gestion du risque de rechute. De plus, une étude récente réalisée par l'équipe Barneih et al a pu comparer les LAM CD19+ avec des LAM CD19- présentant toutes la translocation t(8 ;21) via des données de transcriptomiques par du *bulk-RNA sequencing*. Il a pu être démontré que les LAM CD19+ avec la translocation t(8 ;21) présentaient une réduction de l'activité métabolique et également de division cellulaire, ce qui peut former un état de privation énergétique et donc moins prolifératif. Les cellules peuvent ainsi montrer une sensibilité diminuée à la chimiothérapie conventionnelle (106). Par conséquent, des protocoles de thérapie alternatives ciblant spécifiquement les blastes exprimant le CD19 pourraient être une option appropriée de traitement et être administrés dans le cas de LAM CD19+ pour prévenir une rechute ou un échec précoce de traitement, réduisant ainsi leur risque de survenue.

H) Traitement des LAM CD19+

Les LAM présentant une expression aberrante du CD19 sont traitées de la même manière que les autres LAM, avec pour objectif principal d'éradiquer la maladie le plus efficacement possible. En premier lieu, un traitement cytoréducteur à base d'hydroxyurée est souvent instauré en réponse à une hyperleucocytose potentielle observée au moment du diagnostic, avant que les résultats cytogénétiques ou moléculaires spécifiques ne soient disponibles. Si le diagnostic révèle plutôt des cytopénies et un état général dégradé, des traitements de support, tels que des transfusions et des soins palliatifs adaptés, sont prescrits pour améliorer la qualité de vie du patient. Une fois que les résultats cytogénétiques et génétiques sont obtenus, généralement 3 à 5 jours après le diagnostic, des schémas thérapeutiques appropriés comprenant des traitements ciblés ou non peuvent être mis en place, ce qui peut contribuer à une meilleure stabilisation de l'état clinique du patient.

Il est classiquement convenu dans le cadre du traitement d'une LAM de diviser les patients aptes ou non à recevoir une thérapie intensive.

La stratégie de thérapie intensive débute par un traitement d'induction visant à obtenir une rémission complète ; puis pour ensuite la renforcer, un traitement de consolidation suivi, selon les cas, d'un traitement d'entretien seront instaurés.

Le traitement d'induction classique se présente sous la forme d'un schéma « 3+7 » : pendant les 3 premiers jours, la cytarabine est en association avec une anthracycline (daunorubicine ou idarubicine) et ensuite au cours des 7 jours suivants, elle est administrée en monothérapie. Des options alternatives existent comme le schéma FLAG-IDA (fludarabine, cytarabine, G-CSF et idarubicine) ou l'association mitoxantrone et cytarabine. De plus, avec l'évolution de la biologie moléculaire et des thérapies ciblées, les patients présentant une variation *FLT3* peuvent désormais bénéficier d'un inhibiteur de kinase anti-*FLT3*, la midostaurine ou le quizartinib, qui peut, ainsi, être administré en complément afin d'améliorer leurs perspectives de survie (107,108). D'après l'ELN 2022, d'autres options comportant le gemtuzumab ozogamicin (GO) (anticorps IgG4 humanisé anti-CD33 lié à un agent cytotoxique) ou le CPX-351 (formulation liposomale encapsulant la cytarabine et la daunorubine) peuvent être administrées respectivement dans des cas de LAM à risque cytogénétique favorable (ou intermédiaire) ou de LAM liées à une myélodysplasie ou liées aux traitements (23). Une exception concerne le traitement des leucémies aiguës promyélocyaires qui repose sur l'administration d'acide tout-trans-rétinoïque ou d'arsenic. Les traitements d'induction sont assez efficaces pour permettre une rémission complète (RC) dans la plupart des cas.

Une rémission complète est définie par la présence de strictement moins de 5% de blastes dans la moelle osseuse, l'absence de blastes circulants, l'absence de maladie extra-médullaire et des taux de polynucléaires neutrophiles (PNN) et plaquettes (PQ) suffisants (respectivement ≥ 1.0 G/L et ≥ 100 G/L). Il faut aussi considérer les RC avec une récupération hématologique incomplète (RCi) (même critères que RC mais avec des taux de PNN < 1 G/L et PQ < 100 G/L) et partielle (RCh) (même critères que RC mais avec des taux de PNN ≥ 0.5 G/L et ≥ 50 G/L). Lorsqu'une RC ou RCi ou RCh est obtenue, une évaluation de la MRD est recommandée pour orienter le choix du traitement de consolidation et ensuite le mettre en place. Cela permettra une meilleure stabilisation de l'état clinique du patient. Le traitement de consolidation consiste principalement en l'administration de cytarabine à dose intermédiaire sur plusieurs cycles (2 à 5). Toutefois, si le risque de rechute estimé est élevé (109), si la MRD reste positive malgré un pronostic initial favorable et un traitement intensif d'induction, ou si la LAM présente un risque initial intermédiaire ou défavorable, l'allogreffe de cellules souches périphériques (patients $< 65 - 80$ ans, (paramètre dépendant des centres hospitaliers)) demeure la meilleure option après la première rémission complète. Par ailleurs, les résultats de l'allogreffe de CSH ne cessent de s'améliorer grâce à une

meilleure stratégie de choix du donneur et des méthodes pour prévenir et traiter au mieux les infections et la maladie du greffon contre l'hôte.

Le traitement d'entretien, s'il est mis en place, est généralement moins toxique et est administré pendant une courte période après la consolidation pour réduire le risque de rechute. Le choix se porte sur la midostaurine ou quizartinib pour les LAM avec un variant *FLT3* sinon c'est la prise orale d'azacitidine qui est proposée.

Les critères pour les patients inaptes à recevoir une chimiothérapie intensive ne sont pas réellement définis mais l'âge avancé (≥ 75 ans) ou l'état clinique altéré (ECOG <2) et/ou les comorbidités liées à l'âge (désordres cardiaques, pulmonaires, hépatiques ou rénales...) en font partie. L'azacitidine ou décitabine associée au venetoclax (inhibiteur de BCL2) constitue le schéma le plus commun. La cytarabine à faible dose peut être une alternative en association ou non avec le venetoclax. Si les patients LAM présentent des variations *IDH1* ou *IDH2*, des soins de support ou des monothérapies avec inhibiteurs ciblés *IDH1* et *IDH2* peuvent leur être administrés (respectivement ivosidenib et enasidenib)(23,110).

Cependant, comme écrit précédemment, les LAM avec expression aberrante du CD19 peuvent souvent rechuter ou être considérées comme réfractaires soulignant un échec de traitement. D'une part, une maladie est dite réfractaire en l'absence de RC, RCi ou RCh soit après 2 cycles de traitement d'induction intensif, soit à un moment prédéterminé (par exemple 180 jours après le début d'un traitement moins intensif)(23). D'autre part, la rechute se définit par la présence de 5 % ou plus de blastes médullaires ou la réapparition de blastes dans au moins 2 échantillons de sang périphérique à au moins une semaine d'intervalle, ou le développement d'une maladie extramédullaire ou par une rechute de la MRD (conversion vers une positivité de la MRD détectée par CMF ou RQ-PCR ou augmentation du nombre de copies de la MRD supérieure ou égale à $1 \log_{10}$ entre deux échantillons positifs)(23). En cas d'échec du traitement, le clone leucémique peut acquérir de nouvelles altérations génétiques. Une réévaluation moléculaire est donc fortement conseillée pour identifier si des patients peuvent bénéficier d'options thérapeutiques plus appropriées. Sinon, ces patients sont préférentiellement orientés vers une allogreffe de CSH si possible (âge $< 65 - 80$ ans (dépendant des centres hospitaliers) et possibilité d'avoir un donneur compatible apparenté ou non) ou plutôt vers des options moins intensives (citées précédemment) ou vers la participation à des essais cliniques adaptés. L'allogreffe de CSH dans le cadre de maladie réfractaire ou en rechute constitue la seule thérapie curative offrant des résultats positifs en termes de maintien de la rémission complète et de réduction du risque de rechute ultérieure(111). Il faut noter que pour les LAM avec un variant

FLT3 en rechute ou réfractaire, un autre inhibiteur de *FLT3* peut être instauré, le gilteritinib en tant que traitement de rattrapage (23).

Tous ces traitements doivent être également accompagnés de soins de soutien incluant une prophylaxie anti-infectieuse et une prévention d'aggravation des cytopénies par le biais des transfusions de plaquettes ou de culots globulaires. En cas d'atteintes neuroméningées, des injections intrathécales de cytarabine, méthotrexate et corticoïdes peuvent être réalisées.

Grâce aux récentes avancées technologiques, de nouvelles stratégies et protocoles thérapeutiques émergent, visant à améliorer la survie et les résultats cliniques dans le maintien de la rémission ainsi qu'à réduire les risques de rechute pour les patients atteints de LAM (112). L'immunothérapie offre de nouvelles perspectives prometteuses pour le traitement des LAM, notamment à travers la conception d'anticorps monoclonaux reconnaissant des cibles thérapeutiques novatrices et le développement de thérapies cellulaires, telles que les cellules T bispécifiques ou les cellules T à récepteur antigénique chimérique (*Chimeric Antigen receptor* ou CAR-T)(113) ou l'utilisation de cellules NK (*natural killer*) et CAR-NK(114). Ces approches pharmacologiques ouvrent la voie à une médecine plus personnalisée pour les LAM. Toutefois, leur efficacité et leur sécurité doivent encore être confirmées par des essais cliniques afin d'optimiser leur utilisation dans le traitement de ces pathologies. De ce fait, leur instauration se fera en 2^{ème}, 3^{ème} ou 4^{ème} ligne de traitement dans le contexte d'une LAM en rechute ou réfractaire.

La présence de CD19 sur les cellules blastiques de LAM ouvre de nouvelles opportunités d'application thérapeutique pour les traitements ciblés couramment utilisés dans les hémopathies malignes de la lignée B. Ces thérapies s'inscrivent ainsi dans une approche de médecine plus personnalisée. Cela peut inclure l'emploi d'anticorps monoclonaux dirigés contre le CD19, comme le blinatumomab (115), en monothérapie ou potentiellement en combinaison avec la chimiothérapie standard des LAM ; afin de mieux cibler la composante lymphoïde de ces LAM CD19+. Le blinatumomab est un anticorps bispécifique engageant les lymphocytes T exprimant le CD3 qui se lie sélectivement au CD19 exprimé à la surface des cellules de lignée B. Il est indiqué chez l'adulte pour des LAL-B en rechute ou réfractaire. Dans un *case report* de Plesa et al., trois cycles de blinatumomab ont été administrés en 3^{ème} ligne pour traiter une LAM CD19+ après une seconde rechute, conduisant une réponse moléculaire complète quelques mois plus tard (115). Cette approche exploite la caractéristique aberrante de ces LAM CD19+, qui expriment le CD19 à la surface des cellules leucémiques, pour induire une cytotoxicité médiée par les lymphocytes T,

visant à éliminer les cellules exprimant le CD19. Par ailleurs, les thérapies cellulaires, telles que les cellules CAR-T anti-CD19, couramment utilisées dans les hémopathies malignes de la lignée B, pourraient représenter une stratégie de traitement intéressante en raison des résultats prometteurs observés dans leurs indications initiales. Les thérapies par cellules CAR-T anti-CD19 consistent à modifier génétiquement les lymphocytes T pour qu'ils expriment un récepteur ciblant le CD19. Dans le cadre des LAM CD19+, elles auraient pour but de permettre l'élimination efficace des cellules blastiques exprimant ce marqueur. En effet, cette stratégie est actuellement explorée dans cette indication. Les résultats préliminaires sont encourageants et pourraient offrir une amélioration de l'état clinique et biologique des patients atteints de LAM CD19+ en rechute ou réfractaire (116,117). Des études cherchent à perfectionner la stratégie de ciblage des cellules CAR-T mais elles se heurtent à des obstacles de production qui remettent en question leurs objectifs. Parmi ces problèmes, il existe l'effet myéloablatif sur des cellules non tumorales en ciblant d'autres marqueurs (comme le CD123 ou le CD33)(113), la complexité du ciblage combiné via les CAR (118), et la difficulté de mettre en place une méthode d'inactivation de l'antigène d'intérêt à partir des CSH en clinique pour une optimisation des CAR (119).

Les limites de ces traitements résident dans la variabilité d'expression du CD19 et l'apparition d'effets indésirables. En effet, pour garantir une efficacité optimale, il est essentiel que les niveaux d'expression du CD19 restent stables. De plus, la gestion rigoureuse des effets secondaires de ces thérapies représente un défi supplémentaire à surmonter.

Même si certaines études ont montré une efficacité clinique et biologique prometteuse de ces immunothérapies, des essais cliniques plus approfondis s'avèrent nécessaires dans le contexte des LAM CD19+. Cela permettrait de mieux comprendre le potentiel de ces thérapies ciblant le CD19, d'optimiser les nouveaux protocoles médicamenteux, et ainsi d'améliorer leur efficacité et sécurité dans ce contexte. Un autre défi consiste également à garantir une rémission à long terme des patients atteints de LAM CD19+. L'objectif final est donc d'intégrer ces approches dans un schéma de traitement adapté et spécifique à ce sous-type de LAM. Ces stratégies thérapeutiques seront utilisées comme options en 2^{ème} ou 3^{ème} ligne de traitement après une ou plusieurs rechutes ou états réfractaires.

I) Situation au CHU de Lille des LAM CD19+

Le service des maladies du sang du CHU de Lille est l'un des plus importants de France, en termes de taille, de volume d'activité et de réputation. Le service connaît un rayonnement national en hématologie grâce à son expertise, son activité clinique, de recherche et d'innovation et son infrastructure avancée pour les traitements spécialisés (greffes de CSH et thérapies ciblées).

Un large éventail de maladies du sang peut ainsi être pris en charge allant des troubles courants aux pathologies complexes et plus rares tout en passant par les leucémies, les lymphomes et les anémies. Dans ce manuscrit, nous allons nous intéresser particulièrement aux LAM exprimant de façon aberrante le CD19 (ou LAM CD19+) diagnostiquées au CHU de Lille.

a) Population étudiée

1. Sélection des patients

La sélection des patients dans cette population étudiée s'est déroulée en plusieurs étapes. Tout d'abord, la première consistait en la définition même de l'hémopathie étudiée c'est-à-dire « LAM CD19+ » avec une sélection des patients qui présentaient un immunophénotypage de blastes myéloïdes en CMF avec un pourcentage d'expression du CD19 strictement supérieur à 50%. En parallèle, les critères d'exclusion sont : les informations biologiques manquantes de caractérisation de la LAM (c'est-à-dire les résultats des analyses cytologique, moléculaire et cytogénétique), les données cliniques insuffisantes ou absentes au diagnostic et en suivi ainsi que celles concernant les traitements utilisés (étant donné que les patients n'étaient pas toujours pris en charge à Lille ou dans la région lilloise ou dans les centres hospitaliers périphériques). En effet, dans le service d'hématologie biologique à Lille, les demandes de cytogénétique, de biologie moléculaire et/ou de CMF proviennent de toutes les régions françaises. Les dernières étapes de sélection se basaient sur la définition même de la leucémie aiguë d'après l'ELN 2022 : prendre en compte les patients présentant un pourcentage dans le sang ou la moelle $\geq 10\%$ (et si ce n'est pas une anomalie récurrente, d'après les recommandations, il faut compter plutôt 20% pour éviter les syndromes frontières entre SMD et LAM) et exclure ceux qui ont eu comme antécédents un SMP (leucémie myéloïde chronique, thrombocytémie essentielle, myélofibrose ou polyglobulie de Vaquez). (Figure 7)

Le nombre total final de patients LAM CD19+ dans cet écrit est de 45, et l'étude s'étend sur une période allant de janvier 2007 à avril 2024 au CHU de Lille.

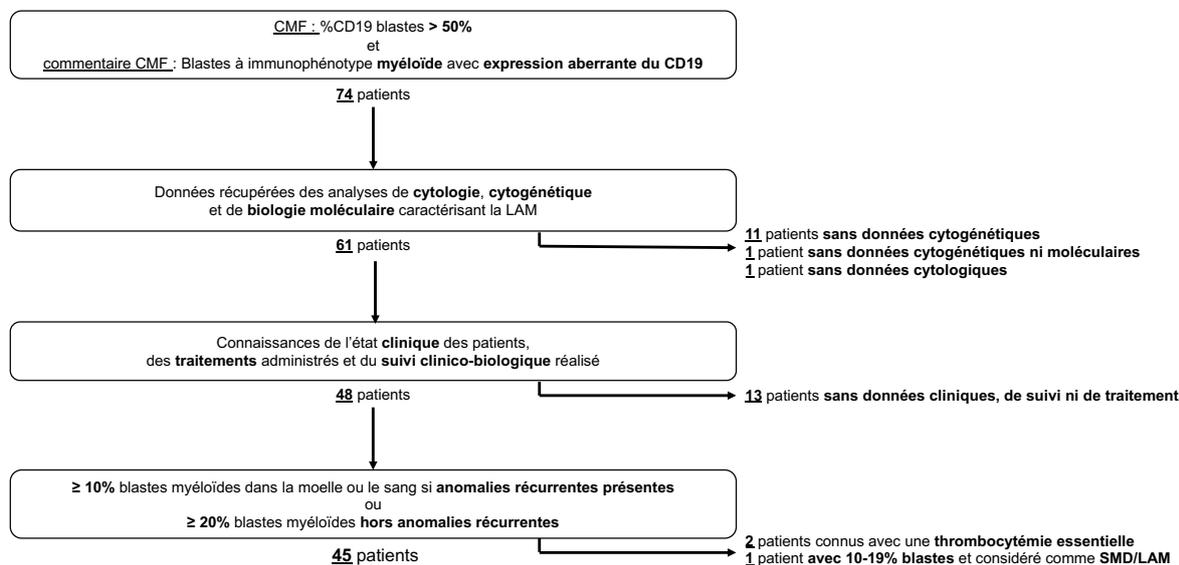


Figure 7 – Sélection des patients LAM CD19+ au CHU de Lille. Abréviations : LAM, leucémie aiguë myéloïde ; SMD, syndrome myélodysplasique

2. Caractéristiques générales des patients

Pendant cette période d'étude, 45 patients ont été diagnostiqués pour une LAM avec une expression aberrante du CD19. Les données démographiques des patients sont résumées en Table 6. Des patients très jeunes ont été touchés par une LAM CD19+, le plus jeune ayant un peu moins de 3 ans au moment du diagnostic. L'âge moyen des patients est d'environ 41 ans. La répartition entre hommes et femmes de cet échantillon de patient est presque équilibrée, avec un ratio proche 1:1. Un peu moins d'un tiers des patients ne présentaient aucun antécédent médical tandis que 42.2% avaient des antécédents personnels ou familiaux de maladies du sang et/ou de cancer. En effet, pour certains d'entre eux, leur histoire personnelle avait déjà été marquée par un diagnostic de LAM. Cependant au moment du diagnostic, seulement 2 patients ont découvert de façon fortuite qu'ils étaient atteints de LAM CD19+. La grande majorité des patients (84.4%) manifestaient un syndrome anémique (perte de poids, asthénie, fatigue, dyspnée...) alors qu'environ un tiers d'entre eux présentaient des tuméfactions des organes hématopoïétiques. Par ailleurs, un peu moins de 50% des patients avaient des localisations extra-médullaires (cutanéomuqueuses (hypertrophie gingivale par exemple), neurologiques (confusions), osseuses...). Lors des premiers examens biologiques réalisés au moment du diagnostic incluant l'hémogramme et le myélogramme, les résultats biologiques indiquaient en moyenne une bicytopenie (anémie et thrombopénie) accompagnée d'une hyperleucocytose. Le taux moyen de blastes observé dans le myélogramme était plus élevé que celui relevé sur l'hémogramme (57.4 vs 39.2%). Dans les deux cas, pour certains patients, les blastes observés pouvaient afficher un corps d'Auer dans leur cytoplasme.

Caractéristiques		N patients = 45
Caractéristiques démographiques		
Âge au diagnostic		
Âge (années) (médiane (min-max))		41.3 (2.7 - 82.6)
Sexe		
Femmes - n patients (%)		22 (48.9)
Hommes - n patients (%)		23 (51.1)
Antécédents médicaux		
Antécédents hématologiques et/ou cancéreux (patients et famille) - n patients (%)		19 (42.2)
Antécédents non hématologiques (HTA, Diabète, Maladies auto-immunes...) - n patients (%)		19 (42.2)
Sans antécédents - n patients (%)		14 (31.1)
Symptômes cliniques au diagnostic - n patients (%)		
Syndrome anémique		38 (84.4)
Syndrome hémorragique		16 (35.6)
Syndrome infectieux		20 (44.4)
Tuméfaction des organes hématopoïétiques (hépatomégalie, splénomégalie, adénopathies)		15 (33.3)
Localisations extra-médullaires (neurologiques, cutanéomuqueuses, osseuses,...)		21 (46.7)
Sans symptômes cliniques		2 (4.4)
Caractéristiques biologiques standard au diagnostic - moyenne (±SD)		
Hémogramme		
Globules blancs (G/L)		17.0 (24.8)
Hémoglobine (g/dL)		8.4 (3.1)
Plaquettes (G/L)		59.5 (52.7)
Blastes (%)		39.2 (27.2)
Myélogramme		
Blastes (%)		57.4 (24.5)

Table 6 – Caractéristiques démographiques et clinico-biologiques des patients LAM CD19+, au moment du diagnostic. Abréviations : HTA, hypertension artérielle ; min, minimum ; max, maximum ; SD, *standard deviation* (= écart-type)

3. Biologies spécialisées des patients

Après le diagnostic initial de présence de blastes sur l'hémogramme et le myélogramme, des échantillons de moelle et de sang sont aussi analysés par d'autres techniques pour caractériser au mieux la LAM circulante. En effet, des études de CMF, de cytogénétique et de biologie moléculaire seront effectuées. Les résultats seront rendus dans les meilleurs délais permettant ainsi d'administrer un traitement adapté, d'identifier les meilleurs marqueurs pour le suivi de la MRD et également de pouvoir qualifier le pronostic de la LAM diagnostiquée.

a. Cytométrie en flux

En cytométrie en flux dans le service d'hématologie, l'analyse de l'immunophénotypage permet principalement de confirmer en premier lieu l'origine de la LA (myéloïde ou/et lymphoïde) fraîchement diagnostiquée sur l'hémogramme et le myélogramme. Puis, lorsque l'origine myéloïde est détectée, les expressions de plusieurs clusters de différenciation à la surface sont observées pour permettre de qualifier la LAM et leur particularité d'expression. Pour les LAM, l'expression de CD19 est rare. C'est une aberrance d'expression qui permet également de caractériser le clone leucémique circulant et de faire le suivi de la MRD à partir d'un schéma LAIP. Les LAM CD19+ présente un LAIP avec une expression aberrante du CD19 qui peut souvent être associée avec d'autres particularités d'expression (faible ou forte) comme celles du CD56, CD7, CD4 ou/et CD2. Comme écrit précédemment, des cas dans la

littérature sont déjà publiés concernant des co-expressions. La plus connue et la plus commune dans cette étude est celle avec le CD56 (28.9%) (Table 7). Le taux moyen d'expression du CD19 pour les LAM dans cette étude est de $77.8 \pm 16.0\%$ (Table 7). En effet, dans les critères d'inclusion, l'expression du CD19 devait être strictement supérieure à 50% pour que ce soit une expression forte de ce marqueur. De plus, il faut noter que ces LAM CD19+ n'ont pas d'expression aberrante d'autres marqueurs forts de lignée des cellules lymphoïdes B (CD20, CD10 et CD79a), ce qui écarte une origine lymphoïde ou un phénotype mixte ou bi-linéale. Par ailleurs, il est à noter que certains patients ont présenté une expression de CD19 à la surface de leurs cellules lors de leur rechute de LAM, bien que cette expression aberrante n'ait pas été détectée au moment du diagnostic initial. Cependant, ces patients ont soit rechuté par la suite, soit présenté une LAM réfractaire, soit sont décédés. Néanmoins, le diagnostic de ces LAM n'est pas terminé et il faut le compléter avec les études cytogénétiques et moléculaires pour avoir un qualificatif final de la leucémie aiguë fraîchement décelée.

b. Étude cytogénétique

L'étude cytogénétique réalisée à l'aide d'un caryotype ou/et par une technique de FISH permet de mettre en évidence des anomalies cytogénétiques récurrentes ou complexe ou autres, ce qui est essentiel pour le classement de la LAM selon les recommandations de l'ICC 2022 (20). Le recueil détaillé des analyses cytogénétiques est représenté en Table Supplémentaire 1. Près de deux tiers des patients étudiés LAM CD19+ présentent une translocation t(8 ;21) (Table 7). Cette translocation cytogénétique est qualifiée comme récurrente et peut être associée avec d'autres anomalies comme la perte d'un chromosome sexuel (X ou Y) ou la délétion d'autres chromosomes. Cependant, selon les critères de l'ICC 2022, en présence de telles anomalies additionnelles, l'anomalie récurrente reste le facteur déterminant pour le classement de la LAM (20,23). En effet, pour un patient, la translocation t(8 ;21) était présente mais elle est considérée comme complexe car il y a plus de 3 anomalies clonales présentes en association avec. C'est un patient qui rechute de sa LAM. Elle est alors classée sur la Table 7 en tant que t(8 ;21) en raison de sa présence déterminante pour le diagnostic. Dans cette étude, deux patients présentaient un caryotype complexe et quatre autres avaient des anomalies cytogénétiques qualifiées de non spécifiques (Table 7). Toutefois, le caryotype de 6 patients ne montrait aucune anomalie chromosomique acquise, bien que l'un d'entre eux présentait une anomalie chromosomique constitutionnelle (trisomie 21) en raison du syndrome de Down du patient (Table 7). Pour les 10 patients dont les analyses cytogénétiques ne sont ni

spécifiques ni révélatrices d'anomalies acquises, des tests de biologie moléculaire sont requis pour caractériser plus précisément le diagnostic de ces LAM CD19+.

c. Analyse de biologie moléculaire

Le recueil détaillé des analyses de biologie moléculaire est représenté en Table Supplémentaire 2. Les résultats de cytogénétique révélant certaines translocations se manifestent en biologie moléculaire par la détection de leurs transcrits de fusion correspondants, à savoir : t(8;21) avec *RUNX1::RUNX1T1*, t(15;17) avec *PML::RARA*, et t(9;22) avec *BCR-ABL1*. Dans la Table 7, un résumé des résultats de biologie moléculaire présente les variations ou les réarrangements génétiques prédominants qui permettent de faire le diagnostic ou de réaliser le suivi de la MRD (comme *WT1*). Des variants *NPM1* sont retrouvés chez 3 patients tandis que seulement 1 patient avait une variation du gène *TP53*. Les LAM résultent d'une prolifération incontrôlée de cellules myéloïdes immatures qui envahissent la moelle osseuse, dans un contexte d'instabilité génétique. Un clone leucémique peut présenter une ou plusieurs variations ou déséquilibres génétiques. La majorité de ces variations sont acquises en réponse à divers facteurs déjà mentionnés précédemment, tels que les rayonnements ionisants, les traitements, ou les agents chimiques. Même si des réarrangements génétiques prédominants sont présents, d'autres variations sur d'autres gènes peuvent apparaître en combinaison. La plupart des transcrits de fusion *RUNX1::RUNX1T1*, dans cette étude, sont associés à une surexpression de *WT1* et/ou des variations génétiques reliées à la myélodysplasie comme *ASXL1* et *EZH2* et/ou également des variations pouvant perturber la pathogénèse comme *NRAS* ou *KRAS* ou *KIT* (Table supplémentaire 2). Un peu moins de 10% des patients présentaient également des variations du gène *FLT3*. Pour cette étude, la grande majorité des malades était suivie pour leur MRD moléculaire via leur transcrit de fusion *RUNX1::RUNX1T1* alors que pour l'autre partie des patients, c'était via la surexpression du gène *WT1* sauf pour certains cas pour lesquels le suivi était réalisé grâce aux réarrangements génétiques *PML ::RARA* ou *BCR ::ABL1* ou leurs variants *NPM1*.

Caractéristiques biologiques spécialisées (N = 45 patients)	
Biologie moléculaire déterminante - n patients (%)	
<i>Anomalies génétiques récurrentes</i> - n patients (%)	35 (77.8)
<i>BCR::ABL1</i>	2 (4.4)
<i>PML::RARA</i>	1 (2.2)
<i>RUNX1::RUNX1T1</i>	29 (64.4)
Variation <i>NPM1</i>	3 (6.5)
Variation <i>TP53</i> - n patients (%)	1 (2.2)
<i>Variations génétiques reliées à la myélodysplasie</i> - n patients (%)	
<i>EZH2</i>	1 (2.2)
<i>RUNX1</i>	2 (4.4)
<i>Autres variations</i> - n patients (%)	
Variation <i>CEBPA</i> + Surexpression <i>WT1</i>	1 (2.2)
Surexpression de <i>WT1</i>	1 (2.2)
Duplication <i>FLT3 (FLT3-ITD)</i> + Surexpression <i>WT1</i>	3 (6.5)
Variation <i>FLT3 (FLT3-TKD)</i> + Surexpression <i>WT1</i>	1 (2.2)
Cytogénétique - n patients (%)	
<i>Anomalies cytogénétiques récurrentes</i> - n patients (%)	
t(8;21)(q22;q22.1) +/- d'autres anomalies additionnelles	29 (64.4)
t(15;17)(q24.1;q21.2)	1 (2.2)
t(9;22)(q34.1;q11.2)	2 (4.4)
<i>Variations cytogénétiques reliées à la myélodysplasie</i> - n patients (%)	
Caryotype complexe	2 (4.4)
del(7q)/(-7)	1 (2.2)
<i>Autres anomalies cytogénétiques</i> - n patients (%)	
del(14)(q22q31) et t(14;15)(q32;q11)	1 (2.2)
t(1;11)(p32;q23),del(13)(q12q31)	1 (2.2)
add(2)(q37),+6	1 (2.2)
del16(q22)	1 (2.2)
<i>Caryotype normal</i> - n patients (%)	5 (11.1)
<i>Anomalie cytogénétique constitutionnelle</i> - n patients (%)	
Trisomie 21	1 (2.2)
Cytométrie en flux	
CD19 (%) (moyenne (±SD))	77.8 (16.0)
<i>Autres expressions aberrantes associées</i> - n patients (%)	
Association avec CD56 (≥ 20%) - n patients (%)	13 (28.9)
Association avec CD7 (≥ 20%) - n patients (%)	9 (20.0)
Association avec CD4 (≥ 20%) - n patients (%)	3 (6.7)
Association avec CD2 (≥ 20%) - n patients (%)	1 (2.2)
Sans autre association aberrante - n patients (%)	23 (51.1)

Table 7 – Caractéristiques des cas de LAM CD19+ suivant les analyses spécialisées d'hématologie (en cytogénétique, cytométrie en flux et biologie moléculaire).

4. Classification diagnostique selon l'ICC 2022 des cas de LAM CD19+

Grâce aux différentes parties précédentes, un regroupement d'informations caractérisant les LAM CD19+ étudiées peut être réalisé pour pouvoir les classer suivant les recommandations de l'ICC 2022 (Table 8).

Sur les quarante-cinq patients, trente-cinq sont diagnostiqués comme souffrant de LAM avec des anomalies génétiques récurrentes. La majorité des LAM CD19+ (64.4%) était associée à la translocation t(8;21)(q22;q22.1), responsable du gène de fusion *RUNX1::RUNX1T1*. La répartition des patients est ensuite plus dispersée dans les autres catégories. Il est intéressant de noter qu'environ 9 % des patients présentent une LAM associée à des variations génétiques ou cytogénétiques liées à la myélodysplasie, tandis que 4 autres patients (8.9%) sont atteints de LAM sans anomalies spécifiques. De plus, un patient, atteint du syndrome de Down, a développé une LAM alors que pour un autre patient, une LAM avec une variation *TP53* était identifiée.

Classification diagnostique des cas de LAM CD19+ selon l' ICC 2022	N patients = 45
LAM avec anomalies génétiques récurrentes	35 (77.8)
Leucémie aiguë promyélocytaire avec t(15;17)(q24.1;q21.2)/PML::RARA	1 (2.2)
Leucémie aiguë myéloïde avec t(8;21)(q22;q22.1)/RUNX1::RUNX1T1	29 (64.4)
Leucémie aiguë myéloïde avec variations NPM1	3 (6.7)
Leucémie aiguë myéloïde avec t(9;22)(q34.1;q11.2)/BCR::ABL1	2 (4.4)
Variation TP53	1 (2.2)
LAM avec variation TP53	1 (2.2)
Variations ASXL1, BCOR, EZH2, RUNX1, SF3B1, SRSF2, STAG2, U2AF1, ou ZRSR2	3 (6.7)
LAM avec variations génétiques reliées à la myélodysplasie	3 (6.7)
Caryotype complexe (≥ 3 anomalies chromosomiques* clonales non apparentées en l'absence d'autres anomalies génétiques récurrentes définissant la classe), del(5q)/t(5q)/add(5q), -7/del(7q), +8, del(12p)/t(12p)/add(12p), i(17q), -17/add(17p) ou del(17p), del(20q), et/ou idic(X)(q13) anomalies clonales	1 (2.2)
LAM avec variations cytogénétiques reliées à la myélodysplasie	1 (2.2)
Sans d'autres anomalies spécifiques	4 (8.9)
LAM	4 (8.9)
Autres : Sarcome myéloïde, Néoplasmes myéloïdes associés au syndrome de Down et à cellules dendritiques plasmacytoïdes blastiques	1 (2.2)
Néoplasmes myéloïdes associés au syndrome de Down	1 (2.2)

Table 8 - Classification diagnostique des cas de LAM CD19+ selon l'ICC 2022

5. Classification pronostique selon l'ELN 2022 des cas de LAM CD19+

Les recommandations de l'ELN 2022(23) ont permis de clarifier une classification pronostique au moment du diagnostic des LAM suivant différents paramètres cytogénétiques et génétiques. Pour les cas étudiés au CHU de Lille, il a été possible de catégoriser le risque au diagnostic des LAM CD19+ et cela est résumé dans la Table 9.

Comme mentionné précédemment, 29 cas présentaient une translocation t(8;21). Cependant, dans la Table 9, seuls 28 de ces cas sont répertoriés comme ayant un risque favorable, au lieu de 29. En effet, un patient avec cette translocation t(8;21) a été classé comme à risque défavorable en raison de la complexité du clone leucémique qu'il présentait et de la forte compatibilité avec une rechute de LAM. Lors de cette rechute, le patient a montré une expression significative (> 50%) du marqueur CD19. Un cinquième des patients était considéré à un risque intermédiaire alors qu'un peu plus de 15% étaient à risque défavorable. L'expression du CD19 est reconnue comme un facteur de mauvais pronostic quand elle est significative à la surface des blastes myéloïdes car il s'agit d'une aberrance d'expression pour les LAM. De plus, cette expression significative du CD19 dans le cas des LAM peut être aussi la conséquence d'une rechute de LAM précoce ou tardive ce qui explique pourquoi certains patients de notre étude avaient déjà connu des événements hématologiques antérieurs, principalement des LAM. Cependant, pour évaluer le pronostic final de la LAM, il est également crucial de prendre en compte les paramètres cytogénétiques et génétiques et de prioriser l'évaluation de la MRD. De plus, il faudra déterminer de nouveau le pronostic des cas étudiés après les traitements reçus et les événements post-diagnostiques recensés (rechute ou réfractaire).

Classification pronostique des cas de LAM CD19+ au diagnostic selon l'ELN 2022			
Catégories de risque pronostique	Anomalies génétiques et cytogénétiques	N patients = 45	
Favorable	t(8 ;21)(q22 ;q22.1)/RUNX1 ::RUNX1T1	28 (62.2)	29 (64.4)
	variant <i>NPM1</i> sans <i>FLT3-ITD</i>	1 (2.2)	
Intermédiaire	variant <i>NPM1</i> avec <i>FLT3-ITD</i>	2 (4.4)	9 (20.0)
	<i>NPM1</i> wt avec <i>FLT3-ITD</i> (sans lésions génétiques à risque défavorable)	3 (6.7)	
	anomalies cytogénétiques et/ou moléculaires non classées comme favorables ou défavorables	4 (8.9)	
Défavorable	t(9;22)(q34.1;q11.2)/BCR::ABL1	2 (4.4)	7 (15.6)
	caryotype complexe, caryotype monosomal	1 (2.2)	
	variants au niveau des gènes <i>ASXL1</i> , <i>BCOR</i> , <i>EZH2</i> , <i>RUNX1</i> , <i>SF3B1</i> , <i>SRSF2</i> , <i>STAG2</i> , <i>U2AF1</i> et/ou <i>ZRSR2</i> (non défavorables quand associés à une anomalie à risque favorable)	3 (6.7)	
	variants <i>TP53</i> (≥10% de fréquence de variation allélique)	1 (2.2)	

Table 9 - Classification pronostique des cas selon l'ELN 2022 au moment de leur diagnostic en tant que LAM CD19+

b) Schéma thérapeutique

Les patients traités pour une LAM suivent un cycle de thérapie débutant par une chimiothérapie d'induction, complétée par soit une chimiothérapie de consolidation, soit une allogreffe. Certains patients participent également à des essais cliniques. Ainsi, divers schémas thérapeutiques (induction + consolidation) ont été appliqués. Pour cette étude, la Table 10 résume les traitements reçus en induction et en consolidation.

En induction, la grande majorité des patients a reçu de la cytarabine associée ou non à un autre traitement. La combinaison la plus commune parmi cette cohorte de patients était avec de la daunorubicine (18 patients sur les 45 équivalent à 40.0% des patients) sur un schéma « 3 + 7 » (comme décrit précédemment). Un peu moins de 15% des patients ont bénéficié d'injections intrathécales de cytarabine associées avec du méthotrexate et de l'hydrocortisone visant à prévenir les complications neuroméningées possibles. Cette prophylaxie neuroméningée est souvent administrée lorsqu'une hyperleucocytose circulante a été observée au diagnostic. Six patients ont également reçu de l'amsacrine qui est une alternative possible à la daunorubicine ou à l'idarubicine. C'est un médicament qui a comme propriété de se lier à l'ADN par intercalation et par forces électrostatiques externes. Ainsi, il inhibe la synthèse de l'ADN mais pas de l'ARN empêchant la croissance de certaines cellules. Un patient a reçu directement une allogreffe de CSH après le diagnostic de LAM CD19+ étant donné que c'était une rechute de LAM déjà traitée auparavant par différents traitements (daunorubicine, amsacrine, cytarabine, azacitidine). C'était considéré comme une LAM réfractaire et en rechute, car évolutive, et avec un parcours de greffe déjà initié. De même, deux patients ont été placés directement en soins palliatifs et de soutien. Le premier en raison d'une dégradation clinique très rapide et d'un pronostic défavorable de sa LAM, associé à une variation *TP53*. Le second, en raison d'une détérioration clinique marquée par une pancytopenie importante, incluant

une hémoglobine à 5 g/dL, ainsi qu'une localisation neuroméningée avec des symptômes qui ont aggravé son cas. La translocation t(9 ;22) est responsable de la formation du gène de fusion *BCR::ABL*, qui, au niveau protéique, permet l'expression d'une tyrosine kinase. Cette protéine peut être inhibée par une certaine catégorie de médicaments dont le dasatinib. De ce fait, les deux patients porteurs de cette translocation se sont vus administrer ce médicament. Par ailleurs, il est intéressant de noter l'impact du pronostic au diagnostic de LAM CD19+ sur le choix du schéma thérapeutique, même en phase d'induction. Un patient avec un pronostic favorable a reçu un anti-CD33 (GO), tandis que deux patients présentant un pronostic très défavorable ont été traités par différentes approches : l'un a reçu du F14512, un inhibiteur de la topoisomérase II (en raison de sa rechute après une allogreffe pour un patient de plus de 60 ans) ; le deuxième a été traité avec du gilteritinib, un anti-*FLT3* (suite à une rechute de LAM avec un variant *FLT3-ITD*). Enfin, pour un patient présentant une expression aberrante du CD19, observée pour la première fois au CHU de Lille lors d'une rechute de sa LAM CD19+ diagnostiquée antérieurement à l'étranger, un traitement anti-CD19 (blinatumomab) a été prescrit en induction en raison de l'expression significative du CD19 à la surface des cellules blastiques myéloïdes, conformément au modèle décrit dans l'article de Plesa et al(115). Ce schéma thérapeutique ouvre ainsi la voie à des traitements ciblés et personnalisés anti-CD19 pour les LAM CD19+

En consolidation, les traitements impliquent, pour la majorité des patients, de la cytarabine seule ou associée en 3 cycles (le plus souvent). Un peu moins de 10% ont bénéficié d'une allogreffe au lieu d'un traitement de chimiothérapie de consolidation. Le patient présentant la translocation t(15 ;17) avait reçu de la cytarabine seule en induction puis en consolidation du trioxyde d'arsenic qui a un rôle dans la dégradation de la protéine de fusion *PML::RARA* en se fixant directement et spécifiquement sur la partie PML. Un peu plus de 10 % des patients (n = 5) n'ont reçu aucun traitement de consolidation. Parmi eux, trois patients étaient réfractaires à la LAM, et une rémission complète n'a pas pu être obtenue : deux de ces patients sont décédés en raison de cet état réfractaire, tandis que le troisième est encore en observation dans un état réfractaire, nécessitant une évaluation pour trouver une solution thérapeutique appropriée. Dans les deux autres cas, l'un concernait une patiente ayant directement reçu une allogreffe en induction, ce qui a interrompu tout traitement de consolidation, et l'autre patient, ayant bénéficié de soins palliatifs en induction, n'a pas continué de traitement en consolidation. Le patient qui a reçu des soins palliatifs en consolidation avait d'abord été traité avec du gilteritinib. À la suite d'une rechute, il a été décidé de

le placer en soins palliatifs en raison de l'impasse thérapeutique rencontrée. Par ailleurs, 6 patients ont reçu 3 cures de consolidation différentes : la première comprenait de la cytarabine et de l'amsacrine, puis en deuxième cure, c'était la combinaison de trois principes actifs (cytarabine, daunorubicine, etoposide) et enfin, la troisième consistait en l'association de cytarabine avec de la L-asparaginase et certains pouvaient recevoir possiblement de l'interleukine 2. Cela concernait uniquement les patients âgés de moins de 18 ans participant à un essai clinique nommé ELAM02 qui avait pour but d'évaluer l'efficacité de l'interleukine 2 en traitement d'entretien des LAM.

Traitements d'induction (N patients = 45)	
Allogreffe - n patients (%)	1 (2.2)
Azacitidine + Soins palliatifs - n patients (%)	1 (2.2)
Blinatumomab puis Azacitidine + Venetoclax - n patients (%)	1 (2.2)
Cytarabine - n patients (%)	2 (4.4)
Cytarabine + Amsacrine - n patients (%)	4 (8.9)
Cytarabine + Amsacrine + Midostaurine - n patients (%)	1 (2.2)
Cytarabine + Amsacrine puis Decitabine + Venetoclax - n patients (%)	1 (2.2)
Cytarabine + Daunorubicine - n patients (%)	18 (40.0)
Cytarabine + Daunorubicine + Dasatinib - n patients (%)	1 (2.2)
Cytarabine + F14512 - n patients (%)	1 (2.2)
Cytarabine + Idarubicine - n patients (%)	1 (2.2)
Cytarabine + Mitoxantrone + IT (MTX, cytarabine, hydrocortisone) - n patients (%)	6 (13.3)
Cytarabine + Mitoxantrone - n patients (%)	1 (2.2)
Cytarabine puis Azacitidine + Venetoclax - n patients (%)	1 (2.2)
Cytarabine puis Cytarabine + Mitoxantrone + Gemtuzumab ozogamicine - n patients (%)	1 (2.2)
Dasatinib - n patients (%)	1 (2.2)
Fludarabine + Cytarabine + Mitoxantrone - n patients (%)	1 (2.2)
Gilteritinib - n patients (%)	1 (2.2)
Soins palliatifs - n patients (%)	1 (2.2)
Traitements de consolidation (N patients = 45)	
Aucun - n patients (%)	5 (11.1)
Allogreffe - n patients (%)	4 (8.9)
Azacitidine + Acide tout-trans rétinoïque + Dépakine - n patients (%)	1 (2.2)
Azacitidine + Venetoclax - n patients (%)	1 (2.2)
Cytarabine (+/- IT (MTX + Cytarabine) - n patients (%)	19 (42.2)
Cytarabine + Amsacrine - n patients (%)	2 (4.4)
Cytarabine + Amsacrine puis Cytarabine + Daunorubicine + Etoposide puis Cytarabine + L-Asparaginase (+/- IL-2) - n patients (%)	6 (13.3)
Cytarabine + Amsacrine puis Cytarabine + Daunorubicine + Etoposide + IT triples (MTX, cytarabine, hydrocortisone) - n patients (%)	1 (2.2)
Cytarabine + Daunorubicine - n patients (%)	2 (4.4)
Dasatinib - n patients (%)	1 (2.2)
Mitoxantrone + Cytarabine + IT (Cytarabine) puis Cytarabine - n patients (%)	1 (2.2)
Soins palliatifs - n patients (%)	1 (2.2)
Trioxyde d'arsenic - n patients (%)	1 (2.2)

Table 10 – Traitements d'induction et de consolidation reçus par les patients. Abréviations : F14512, inhibiteur de topoisomérase II, IL, interleukine, IT, intrathécale ; MTX, methotrexate

Pour certains patients, en fonction du pronostic de la LAM diagnostiquée, des résultats de la MRD et des événements intercurrents (rechute ou état réfractaire) survenus pendant ou après le traitement de consolidation, la stratégie thérapeutique (induction + consolidation) pouvait se poursuivre directement soit par l'inclusion dans un parcours d'autogreffe ou allogreffe de CSH avec un donneur apparenté ou non, soit par un traitement d'entretien directement soit aucun traitement si la MRD l'autorisait. Cinq patients ont pu bénéficier d'une allogreffe de CSH représentant ainsi le traitement post-consolidation le plus administré dans notre échantillon de patients (Figure 8). En effet,

c'est encore aujourd'hui le seul traitement curatif des hémopathies malignes permettant des rémissions à long terme. Par conséquent, l'allogreffe est le plus souvent indiquée en consolidation, en entretien ou en rechute/état réfractaire. De plus, un des patients avait déjà entamé un parcours d'allogreffe, mais une rechute avait été observée en consultation pré-greffe. Il a été ensuite allogreffé sur sa maladie évolutive. Lorsqu'un patient est allogreffé, un suivi régulier par analyse du chimérisme est alors entrepris. Cette analyse permet de quantifier l'origine (donneur ou receveur) d'une population cellulaire obtenue à partir d'un prélèvement sanguin ou médullaire. Si le chimérisme révèle un pourcentage significatif de cellules d'origine receveuse, cela pourrait indiquer une rechute médullaire. Ce résultat devra être confronté à l'état clinique du patient. De plus, des tests complémentaires, tels qu'un hémogramme, un myélogramme, ainsi que le suivi de la MRD en cytométrie de flux et en biologie moléculaire, doivent être réalisés pour confirmer ce diagnostic. Cependant, la majorité des patients (88.9%) n'ont pas reçu de traitements d'entretien ni d'allogreffe (Figure 8). Une analyse de survie pourra peut-être révéler si la poursuite d'un traitement avec une allogreffe est significative en termes de bénéfice pour les patients. Sur la base de ces analyses, il serait possible de soutenir également l'utilisation de traitements ciblés comme le blinatumomab ou les CAR-T CD19+ en 2^{ème}, 3^{ème} ou 4^{ème} ligne de traitement, particulièrement dans les cas de LAM CD19+ réfractaire ou/et en rechute. En résumé, cette approche pourrait fournir des arguments solides pour justifier l'utilisation de thérapies ciblées dans des cas spécifiques de LAM, en se basant sur la dynamique de la MRD et les résultats des analyses de survie.

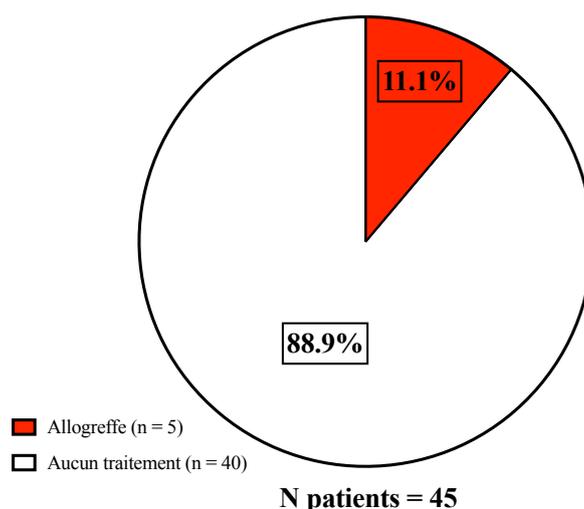


Figure 8 – Répartition des traitements d'entretien des LAM CD19+ de notre étude de patients.

c) Réfractaire ou en rechute et pronostic

1. *Caractéristiques des patients LAM CD19+ réfractaire ou en rechute*

Les LAM CD19+ ont une forte tendance à la rechute ou à être réfractaire. Selon les critères de l'ELN 2022(23), 51.1% des LAM CD19+ de cette étude ont soit rechuté, soit ont été réfractaires. Les caractéristiques démographiques, cliniques et biologiques intéressantes des rechutes et des LAM réfractaires sont résumées dans la Table 11. Parmi les patients ayant rechuté ou présentant une LAM réfractaire, la majorité sont des hommes (60.9%). De plus, l'âge médian de ces patients est de 46.7 ans avec une amplitude d'âge allant de 2.7 à 82.6 ans. Un peu moins de 50% des patients avaient des antécédents hématologiques personnels et/ou familiaux. Cependant, au diagnostic, plus de la moitié des patients (56.5%) présentaient des localisations extra-médullaires en symptômes cliniques. Après les traitements reçus (les principes actifs reçus des patients en rechute/réfractaire sont détaillés en Table supplémentaire 3), une RC n'a pas été détectée chez 8 patients. Le temps moyen sans évènement entre la rémission clinique ou le début de traitement (pour ceux qui n'ont pas connu de RC) et l'identification de l'état réfractaire ou de rechute pour ces patients est inférieur à 1 an. Au niveau biologique, l'hyperleucocytose au diagnostic peut se révéler être un critère pronostique défavorable mais dans cet échantillon de patients, la plupart des patients ne l'est pas (61.1%). Toutefois, le pourcentage moyen de blastes au myélogramme était assez important étant donné qu'il était supérieur à 50%. En CMF, légèrement plus de la moitié des patients en rechute/réfractaires (56.5%) possédait une coexpression avec un autre marqueur aberrant (CD2, CD56 ou CD7), ce qui est assez commun dans ces LAM CD19+. Sur les 23 patients en rechute ou réfractaires, 11 possédaient la translocation $t(8;21)$ responsable du transcrit de fusion *RUNX1::RUNX1T1* tandis que les 12 autres en avaient des différentes. De plus, quand cette translocation $t(8.21)$ est présente, le pronostic est évalué comme favorable pour ces patients, malgré le taux de rechute connu important dans ces LAM. L'observation de la surexpression du gène *WT1* dans près de 75 % des patients en rechute et réfractaires met en lumière son rôle significatif dans les LAM. Ce phénomène, bien que relativement fréquent dans les LAM, pourrait jouer un rôle clé dans la prolifération des cellules leucémiques et dans l'altération de la différenciation cellulaire (120). Cette surexpression peut donc représenter un marqueur important à prendre en compte pour le suivi et le traitement des patients atteints de LAM, notamment dans le contexte de

rechute ou de résistance aux traitements standards. L'impact pronostique de cette surexpression *WT1* est très discutable(121).

Évènements après diagnostic (N patients = 45)	
Décès - n patients (%)	13 (28.9)
LAM CD19+ réfractaire ou en rechute - n patients (%)	23 (51.1)
LAM CD19+ réfractaire ou en rechute (N patients = 23)	
Caractéristiques des patients	
Âge au diagnostic (années) (médiane (min - max))	46.7 (2.7 - 82.6)
Femmes - n patients (%)	9 (39.1)
Hommes - n patients (%)	14 (60.9)
Clinique	
Antécédents personnels et familiaux hématologiques - n patients (%)	10 (43.5)
Localisations extra-médullaires - n patients (%)	13 (56.5)
Patients ayant atteint une rémission clinique - n patients (%)	15 (65.2)
Patients n'ayant pas atteint une rémission clinique - n patients (%)	8 (34.8)
Paramètres temporels	
Temps moyen entre la rémission clinique et la rechute* (mois) - moyenne ± SD	7.7 ± 7.9
Temps entre la rémission clinique et la rechute inférieur à un an - n patients (%)	19 (82.6)
Temps entre la rémission clinique et la rechute supérieur à un an - n patients (%)	4 (17.4)
Paramètres biologiques	
Hémogramme au diagnostic	
Hyperleucocytose (GB > 10 G/L) - n patients (%)	9 (39.1)
Myélogramme au diagnostic	
Blastes (%) - moyenne ± SD	57.0 ± 25.4
Cytométrie en flux au diagnostic	
CD19 (%) - moyenne ± SD	76.6 ± 16.6
Expression d'un autre marqueur aberrant (CD2, CD56 ou/et CD7) - n patients (%)	13 (56.5)
Cytogénétique au diagnostic	
t(8;21)(q22;q22.1) - n patients (%)	11 (47.8)
Autre que t(8;21)(q22;q22.1) - n patients (%)	12 (52.2)
Biologie moléculaire au diagnostic	
<i>RUNX1::RUNX1T1</i> seul ou associé à une ou plusieurs autres anomalies génétiques - n patients (%)	11 (47.8)
Autres variations génétiques - n patients (%)	12 (52.2)
Surexpression <i>WT1</i> - n patients (%)	17 (73.9)
Évaluation du pronostic au diagnostic	
Pronostic favorable - n patients (%)	11 (47.8)
Pronostic intermédiaire - n patients (%)	8 (34.8)
Pronostic défavorable - n patients (%)	4 (17.4)

Table 11 – Caractéristiques démographiques, biologiques et cliniques des LAM CD19+ en rechute ou/et réfractaire observées au CHU de Lille. Les injections intrathécales sont composées de méthotrexate, corticoïdes et de cytarabine. *dans le cas de non-rémission clinique, le temps moyen entre le début d'un traitement et la rechute/état réfractaire sera considéré. Abréviations : CSH, cellules souches hématopoïétiques ; IT, intrathécale.

2. Survie sans évènements et survie globale

La survie sans évènements (rechute ou LAM réfractaire) et la survie globale ont été évaluées dans cet échantillon de patients LAM CD19+ grâce à la méthode Kaplan-Meier. La survie sans évènements correspond au temps entre le diagnostic et l'échec de traitement, rechute ou dernière date de suivi en RC. La survie globale est le temps entre le diagnostic et l'annonce du décès ou de la dernière date de suivi. Les résultats de survie globale ont été comparés utilisant un test du log-rank. Les courbes de survie sont représentées Figure 9.

Deux modèles de Cox ont été utilisés pour étudier les facteurs de risque en premier lieu, d'évènements tels que la rechute ou la LAM réfractaire et en second lieu, des décès grâce à des analyses univariées et multivariées (Tables 13 et 14). Les facteurs cliniquement pertinents ou les variables avec une *p-value* < 0.10 sont inclus dans les

analyses multivariées. Tous les tests avec une p -value < 0.05 sont considérés comme indiquant une signification statistique.

Vingt-trois des 45 patients ont rechuté ou/et présenté des LAM réfractaires et treize sont décédés. Parmi les 13 décès, 10 concernaient des patients ayant déjà subi une rechute ou un échec de traitement (Table 12). Au bout de moins d'un an, la probabilité de survie sans évènements (rechute ou état réfractaire) dans cette population LAM CD19+ est d'environ 60.0%. La probabilité de 50% de survenue d'un évènement (rechute ou réfractaire) est atteinte au bout de 2.3 ans alors que pour la probabilité de survie globale, elle est d'un peu plus de 75% au même moment. Cependant, la probabilité de survie sans évènements stagne au bout de 3.3 ans pour 46.6% alors que la probabilité de survie globale continue à diminuer pour qu'après un peu plus de 17 ans de suivi, elle approche les 67.1% (Figures 9A et 9B). Parallèlement à ces deux courbes, il est aussi intéressant d'observer les courbes de survie globale en fonction des évènements survenus (Figure 9C). La courbe de survie des patients en fonction des évènements montre que les patients sans évènements ont une meilleure probabilité de survie au bout des 15 ans de suivi que ceux avec (86.1% vs 48.1%). Les patients ayant subi un évènement (LAM réfractaire ou rechute) ont une médiane de survie égale de 9.2 ans et un *hazard ratio* (HR) de 3.73 [1.24 ; 11.17]. En effet, la différence des HR entre avec et sans évènements (3.73 vs 0.27), calculés grâce au test du log-rank, est statistiquement significative (p -value = 0.019). Ceci montre une survie globale plus courte chez un patient LAM CD19+ ayant subi un évènement tel qu'une rechute ou un échec de traitement. (Figure 9C).

L'ensemble des traitements administrés pour ces rechutes ou LAM CD19+ réfractaires est résumé dans la Table 12. Nous notons une diversité intéressante des approches thérapeutiques. Toutefois, la majorité de ces patients a bénéficié d'une allogreffe, avec ou sans chimiothérapie préalable. En revanche, cinq patients, en raison de leur état clinique gravement détérioré, ont reçu des soins palliatifs et sont décédés par la suite. Il est donc pertinent d'examiner les facteurs pronostiques qui influencent la survie globale de cet échantillon de patients atteints de LAM CD19+.

LAM CD19+ réfractaire ou en rechute (N patients = 23)	
Traitements pour la rechute ou l'état réfractaire	
Allogreffe - n patients (%)	8 (34.8)
Amsacrine + Aracytine - n patients (%)	1 (4.3)
Amsacrine + Aracytine puis allogreffe - n patients (%)	3 (13.0)
Azacitidine + Venetoclax - n patients (%)	1 (4.3)
Autogreffe de CSH puis acide tout-trans rétinolique - n patients (%)	1 (4.3)
Fludarabine + Cytarabine + IT puis allogreffe - n patients (%)	1 (4.3)
Fludarabine + Cytarabine + Daunorubicine liposomale +/- IT puis allogreffe - n patients (%)	2 (8.6)
Fludarabine + Cytarabine + Gemtuzumab ozogamicine puis allogreffe phénoïdétique - n patients (%)	1 (4.3)
Soins palliatifs - n patients (%)	5 (21.7)
Évènements post-rechute ou état réfractaire - n patients (%)	
Autre rechute - n patients (%)	2 (8.6)
Décès post rechute ou état réfractaire - n patients (%)	10 (43.5)
Sarcome d'Ewing - n patients (%)	1 (4.3)

Table 12 – Traitements au moment des rechutes et/ou des états réfractaires et les possibles évènements survenus après les rechutes ou échecs de traitement. Les injections intrathécales sont composées de méthotrexate, corticoïdes et cytarabine. Abréviations : CSH, cellules souches hématopoïétiques ; IT, intrathécale

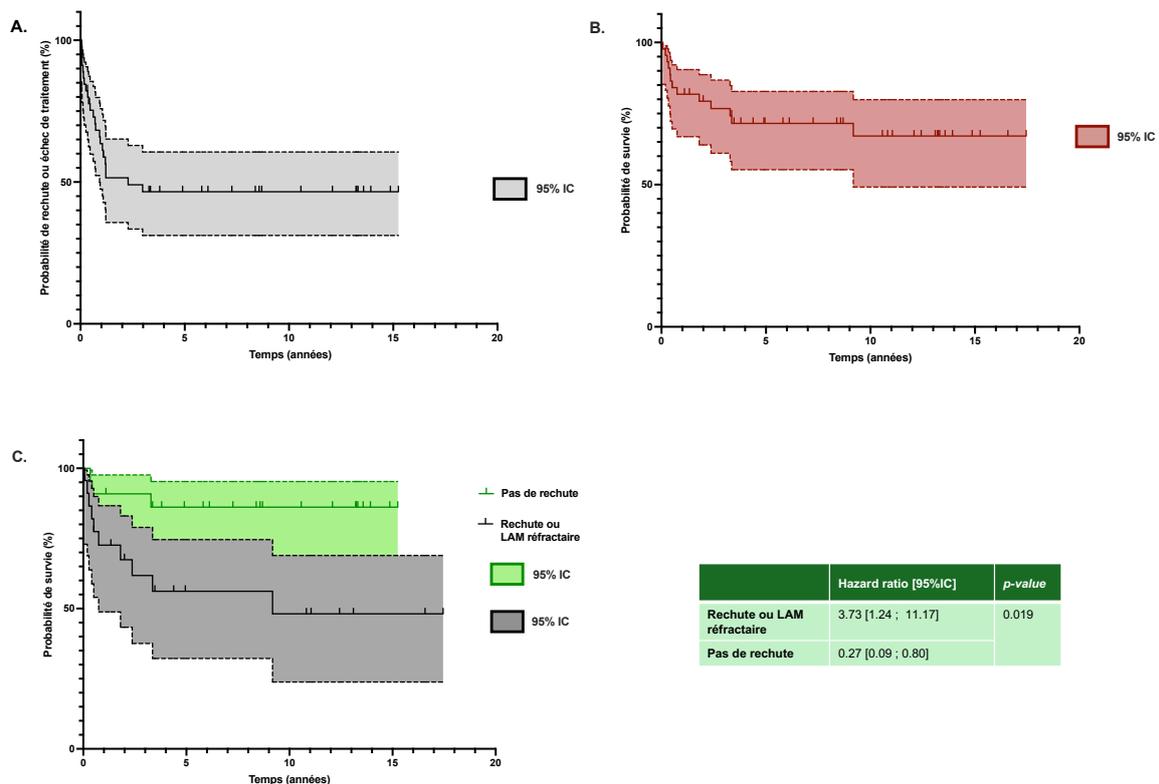


Figure 9 – Analyse Kaplan-Meier de la survie sans évènements et survie globale dans les LAM CD19+ ; (A), Survie sans évènements (rechute et/ou état réfractaire) des patients LAM CD19+ ; **(B),** Survie globale des patients LAM CD19+ ; **(C),** Survie globale des patients LAM CD19+ ayant connu une rechute comparée à celle des patients sans rechute. Abréviations : IC, intervalle de confiance

L'analyse univariée réalisée est représentée Table 13 et permet d'identifier les paramètres suivants comme étant significativement impactants sur la survie sans évènements : antécédents personnels et familiaux hématologiques (HR = 3.78 ; *p-value* = 0.002) ; anomalies cytogénétiques autres que la translocation t(8 ;21)(q22 ;q22.1) (HR = 2.50 ; *p-value* = 0.012) ; anomalies moléculaires autres que *RUNX1 ::RUNX1T1* (HR = 2.86 ; *p-value* = 0.012) ; surexpression *WT1* (HR = 2.90 ; *p-value* = 0.026) et pronostic évalué intermédiaire ou défavorable au diagnostic (HR = 2.87 ; *p-value* = 0.012). Comme le pronostic au diagnostic est évalué par rapport aux données de cytogénétique et de biologie moléculaire, il est préférable d'inclure

l'évaluation du pronostic au diagnostic plutôt que les anomalies moléculaires et chromosomiques pour l'analyse multivariée. L'âge, en analyse univariée a été analysé de deux manières différentes dans cette étude : premièrement, en tant que variable continue puis, de façon catégorielle suivant différentes classes d'âge (strictement inférieur à 18 ans, âge compris entre 18 et 45 ans et strictement supérieur à 45 ans). Cette catégorisation repose sur les recommandations de l'ELN 2022 (23), qui suggèrent qu'un âge supérieur à 45-55 ans peut être un facteur pronostique de survie sans événements réduit. En variable continue, l'analyse univariée révèle une légère augmentation du risque de survenue d'un événement (comme une rechute) avec l'âge. Cependant, cette relation n'est pas statistiquement significative avec une *p-value* de 0.074 et un HR à 1.02. En variable catégorielle, l'âge entre 18 et 45 ans est utilisé comme groupe de référence, car les LAM sont souvent considérées comme ayant un mauvais pronostic chez les patients très jeunes ou âgés. L'analyse montre que les patients de plus de 45 ans ont un risque accru de rechute de la LAM (HR = 2,47) par rapport au groupe de référence, mais cette augmentation du risque n'est pas statistiquement significative, avec une *p-value* de 0,071. En résumé, bien que les résultats suggèrent une augmentation du risque avec l'âge, ils ne sont pas statistiquement significatifs, que l'âge soit analysé comme une variable continue ou catégorielle. Cependant, la classe d'âge correspondant aux plus de 45 ans sera intégrée à l'analyse multivariée en raison d'une *p-value* inférieure à 0.10. En analyse multivariée, la variable correspondant aux antécédents familiaux et personnels hématologiques est le facteur de risque indépendant ayant un impact négatif sur la survie sans événements (HR = 3.17, *p-value* = 0.018).

Variables	Analyse univariée		
	Hazard ratio	95% IC	p-value
Caractéristiques des patients			
Âge			
Âge au diagnostic (années)	1.02	[1.00 ; 1.04]	0.074
<i>Par classes d'âges</i>			
Âge < 18 ans	1.41	[0.41 ; 4.70]	0.569
Âge compris entre [18 et 45] ans		Groupe référence	
Âge > 45 ans	2.47	[0.96 ; 7.10]	0.071
Sexe			
Hommes	1.98	[0.86 ; 4.78]	0.115
Clinique			
Antécédents personnels et familiaux hématologiques	3.78	[1.59 ; 8.73]	0.002
Localisations extra-médullaires	1.88	[0.82 ; 4.41]	0.135
Paramètres biologiques			
<i>Hématogramme au diagnostic</i>			
Hyperleucocytose (GB > 10 G/L)	0.73	[0.31 ; 1.68]	0.471
<i>Myélogramme au diagnostic</i>			
Blastes (%)	1.00	[0.98 ; 1.02]	0.748
<i>Cytométrie en flux au diagnostic</i>			
CD19 (%)	0.99	[0.97 ; 1.02]	0.658
Expression d'un autre marqueur aberrant associé (CD2, CD56 ou/et CD7)	1.43	[0.62 ; 3.34]	0.401
<i>Cytogénétique au diagnostic</i>			
t(8;21)(q22;q22.1)		Groupe référence	
Autre que t(8;21)(q22;q22.1)	2.50	[1.25 ; 6.62]	0.012
<i>Biologie moléculaire au diagnostic</i>			
<i>Marqueur moléculaire de diagnostic</i>			
Présence de RUNX1::RUNX1T1 seul ou associé		Groupe référence	
Autres variations génétiques que RUNX1::RUNX1T1	2.86	[1.25 ; 6.62]	0.012
<i>Autre marqueur moléculaire important utile pour la MRD</i>			
Surexpression WT1	2.90	[1.20 ; 8.06]	0.026
Pronostic			
<i>Évaluation du pronostic au diagnostic</i>			
Pronostic favorable		Groupe référence	
Pronostic intermédiaire ou défavorable	2.87	[1.25 ; 6.64]	0.012
Variables	Analyse multivariée		
	Hazard ratio	95% IC	p-value
Caractéristiques des patients			
Âge > 45 ans	1.41	[0.55 ; 3.63]	0.467
Clinique			
Antécédents personnels et familiaux hématologiques	3.17	[1.21 ; 8.33]	0.018
Paramètres biologiques			
<i>Biologie moléculaire au diagnostic</i>			
Surexpression WT1	2.35	[0.87 ; 7.12]	0.105
Pronostic			
<i>Évaluation du pronostic au diagnostic</i>			
Pronostic intermédiaire ou défavorable	1.39	[0.45 ; 3.94]	0.552

Table 13 – Analyse de l'impact pronostique sur la survie sans évènement (rechutes et états réfractaires) dans cette population de LAM CD19+. Abréviations : GB, globules blancs ; IC, intervalle de confiance.

L'analyse univariée réalisée et représentée Table 14 a identifié les paramètres suivants comme étant significativement impactant sur la survie globale : âge au diagnostic (variable continue) (HR = 1.06 ; *p-value* = 0.002), âge > 45 ans (HR = 3.78 ; *p-value* = 0.047), sexe masculin (HR = 7.74 ; *p-value* = 0.009), antécédents personnels et familiaux hématologiques (HR = 3.90 ; *p-value* = 0.019) ; temps écoulé entre la RC et la rechute (HR = 0.86 ; *p-value* = 0.039), le fait de ne pas avoir eu une RC (HR = 28.38 ; *p-value* < 0.0001), le temps écoulé sans évènement entre la RC et la rechute inférieur à 1 an (HR = 13.70 ; *p-value* = 0.0002), anomalies cytogénétiques autres que la translocation t(8 ;21)(q22 ;q22.1) (HR = 5.42 ; *p-value* = 0.005) ; anomalies moléculaires autres que RUNX1 ::RUNX1T1 (HR = 5.42 ; *p-value* = 0.005) et pronostic évalué intermédiaire ou défavorable au diagnostic (HR = 4.48 ; *p-value* = 0.009). Contrairement à la survie sans évènements, la relation entre l'âge et la survie globale

est statistiquement significative, avec une *p-value* inférieure à 0,05, tant en considérant l'âge comme une variable continue que pour la catégorie des patients de plus de 45 ans. Selon les recommandations de l'ELN 2022 (23), un délai de moins d'un an entre la RC et la rechute constitue également un facteur de risque pour la survie globale. Dans cette étude, ce paramètre montre aussi un impact négatif significatif sur la survie globale (HR = 13.70 ; *p-value* = 0.0002). Le groupe de référence correspondait aux patients ayant présenté un délai de plus d'un an entre la RC et la rechute. De plus, il est intéressant de voir que les trois paramètres communs à la survie sans événements correspondent au pronostic intermédiaire ou défavorable, aux anomalies moléculaires et cytogénétiques autres que t(8 ;21)(q22 ;q22.1)/*RUNX1 ::RUNX1T1*. Cependant, il apparaît que le sexe influence la survie globale. Dans cet échantillon de patients, les hommes présentent un risque significativement plus élevé que les femmes d'avoir une survie globale plus courte (HR = 7.74 ; *p-value* = 0.009).

En analyse multivariée, le délai de moins d'un an entre la RC et la rechute et le fait de ne pas avoir atteint de RC ont eu un impact négatif sur la survie globale (*p-value* = 0.006, HR = 238.50 et *p-value* = 0.002, HR = 64.29 respectivement) dans les LAM CD19+ de cette étude, en plus du sexe masculin (*p-value* = 0.045, HR = 16.02). Cependant, bien qu'il y ait une tendance à un risque accru avec l'âge supérieur à 45 ans, les antécédents personnels et familiaux hématologiques, et le fait d'avoir un pronostic intermédiaire ou défavorable sur la survie globale, ces facteurs ne sont pas statistiquement significatifs (Table 14).

Les LAM CD19+ sont des hémopathies rares présentant des phénotypes aberrants, avec un potentiel de rechute ou d'état réfractaire relativement élevé, avoisinant un peu plus de 50 %. Les analyses univariées et multivariées ont révélé que certaines variables peuvent avoir un impact significativement négatif sur la survie sans événements et sur la survie globale. La principale limite de cette étude réside dans le nombre restreint de patients inclus. Un échantillon plus large permettrait d'obtenir des résultats plus précis et pertinents concernant les LAM CD19+. En identifiant mieux les facteurs de risque chez ces patients, il serait intéressant de leur proposer un traitement plus personnalisé et ciblé, capable de réduire le taux de rechute et d'éviter autant que possible une issue fatale. L'objectif dans cette étude est donc d'envisager des traitements ciblant l'expression aberrante de CD19 à la surface de ces blastes myéloïdes, tels que des anticorps monoclonaux ciblant le CD19 ou des cellules CAR-T anti-CD19. Cette thèse ouvre particulièrement la voie à l'utilisation des cellules CAR-T anti-CD19 dans le traitement des LAM CD19+ réfractaires ou en rechute, et à l'étude de la cytotoxicité de cette thérapie dans cette indication particulière.

Variables	Analyse univariée		
	Hazard ratio	95% IC	p-value
Caractéristiques des patients			
<i>Âge</i>			
Âge au diagnostic (années)	1.06	[1.03 ; 1.11]	0.002
<i>Par classes d'âges</i>			
Âge < 18 ans	0.69	[0.03 ; 5.44]	0.748
Âge compris entre [18 et 45] ans		Groupe référence	
Âge > 45 ans	3.78	[1.12 ; 17.07]	0.047
<i>Sexe</i>			
Hommes	7.74	[2.03 ; 50.72]	0.009
Clinique			
Antécédents personnels et familiaux hématologiques	3.90	[1.21 ; 12.53]	0.019
Localisations extra-médullaires	2.31	[0.76 ; 7.74]	0.148
Rechutes ou états réfractaires	9.65	[2.67 ; 46.14]	0.0013
Paramètres temporels			
Délai entre la rémission clinique (RC) et la rechute* (mois)	0.86	[0.72 ; 0.94]	0.039
<i>Rémission clinique et temps écoulé sans rechute (entre la RC et la rechute)</i>			
Patients n'ayant pas atteint une rémission clinique	28.38	[5.89 ; 202.50]	<0.0001
Délai de moins d'un an entre la rémission clinique et la rechute	13.70	[2.85 ; 100.50]	0.0002
Délai de plus d'un an entre la rémission clinique et la rechute		Groupe référence	
Paramètres biologiques			
<i>Hématogramme au diagnostic</i>			
Hyperleucocytose (GB > 10 G/L)	0.55	[0.15 ; 1.69]	0.324
<i>Myélogramme au diagnostic</i>			
Blastes (%)	1.00	[0.99 ; 1.03]	0.564
<i>Cytométrie en flux au diagnostic</i>			
CD19 (%)	0.98	[0.94 ; 1.01]	0.168
Expression d'un autre marqueur aberrant associé (CD2, CD56 ou/et CD7)	0.88	[0.28 ; 2.64]	0.812
<i>Cytogénétique au diagnostic</i>			
t(8;21)(q22;q22.1)		Groupe référence	
Autre que t(8;21)(q22;q22.1)	5.42	[1.76 ; 20.09]	0.005
<i>Biologie moléculaire au diagnostic</i>			
<i>Marqueur moléculaire de diagnostic</i>			
Présence de RUNX1::RUNX1T1 seul ou associé		Groupe référence	
Autres variations génétiques que RUNX1::RUNX1T1	5.42	[1.76 ; 20.09]	0.005
Autre marqueur moléculaire important utile pour la MRD			
Surexpression WT1	3.54	[1.08 ; 15.83]	0.056
Pronostic			
<i>Évaluation du pronostic au diagnostic</i>			
Pronostic favorable		Groupe référence	
Pronostic intermédiaire ou défavorable	4.48	[1.49 ; 14.87]	0.009
Variables			
Analyse multivariée			
	Hazard ratio	95% IC	p-value
Caractéristiques des patients			
<i>Âge</i>			
Âge > 45 ans	4.19	[0.96 ; 29.15]	0.082
<i>Sexe</i>			
Hommes	16.02	[1.67 ; 507.90]	0.045
Clinique			
Antécédents personnels et familiaux hématologiques	1.21	[0.22 ; 6.47]	0.814
Rechutes ou états réfractaires	0.66	[0.10 ; 5.52]	0.676
Paramètres temporels			
<i>Rémission clinique et temps écoulé sans rechute (entre la RC et la rechute)</i>			
Patients n'ayant pas atteint une rémission clinique	64.29	[6.24 ; 1706.00]	0.002
Délai de moins d'un an entre la rémission clinique et la rechute	66.87	[4.81 ; 2410.00]	0.006
Délai de plus d'un an entre la rémission clinique et la rechute		Groupe référence	
Pronostic			
<i>Évaluation du pronostic au diagnostic</i>			
Pronostic intermédiaire ou défavorable	3.71	[0.53 ; 34.75]	0.199

Table 14 - Analyse de l'impact pronostique sur la survie globale dans cette population de LAM CD19+. * dans le cas de non-rémission clinique, le temps moyen entre le début du traitement et la rechute/état réfractaire sera considéré. Abréviations : GB, globules blancs ; IC, intervalle de confiance.

II. Les cellules CAR-T

L'utilisation des immunothérapies dans le traitement du cancer a émergé grâce à une meilleure compréhension de l'implication de l'immunologie en oncologie. La modulation de l'immunosuppression induite par le cancer est devenue la principale cible des futurs traitements. Par conséquent, les projets de recherche, les essais cliniques et l'administration de médicaments issus de l'immunothérapie en oncologie se sont multipliés. De plus, les travaux sur les anticorps monoclonaux anti-CTLA4 et anti-PD1 ont même conduit les chercheurs, James Allison et Tasuku Honjo, à recevoir le prix Nobel de Physiologie ou Médecine en octobre 2018. En parallèle, un autre versant de l'immunothérapie est aussi en train de prendre de l'ampleur exploitant les propriétés cellulaires des lymphocytes T. En effet, au cours de la dernière décennie, des milliers d'articles scientifiques, médicaux, ainsi que des articles dans des journaux quotidiens d'actualité ont été publiés à travers le monde, mettant en lumière la révolution thérapeutique que représente l'administration de cellules CAR-T dans le traitement du cancer et des maladies du sang. Cet engouement ne cesse de croître, suscitant un intérêt croissant pour ce nouveau traitement.

A) Histoire et généralités

C'est en 2010 qu'a eu lieu la toute première administration au Monde de cellules CAR-T chez un patient atteint de lymphome folliculaire (122), mais revenons sur le chemin parcouru avant cette première injection.

Tout commence dans les années 1980 où une prise de conscience s'est opérée avec une meilleure compréhension de l'action exercée par les lymphocytes T infiltrant la tumeur sur le microenvironnement tumoral. Ce sont les travaux du Docteur Rosenberg et son équipe qui ont ouvert la voie sur l'utilisation de lymphocytes T dans le traitement du cancer (123). C'est le début de l'immunothérapie adoptive où les cellules anti-tumorales prélevées préalablement sont activées et modifiées *in vitro* pour ensuite les réinjecter aux patients. Ceci permet une administration de traitements plus personnalisés pour certains types de cancers. Ces travaux ont ainsi posé les bases des thérapies cellulaires impliquant les lymphocytes T.

Néanmoins, la complexité du système immunitaire soulève également quelques questions concernant le développement des cellules CAR-T. Le premier problème qui se pose est lié à l'activité du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH), ce qui a conduit au développement du concept de récepteur chimérique. En effet, le concept d'un récepteur de cellules T (TCR) chimérique a été pour la première fois cité en 1987 par une équipe japonaise dans une publication de Kuwana et al.(124) associant des

régions variables d'anticorps avec des régions dérivées des récepteurs des cellules T. Ce récepteur chimérique permettait de déclencher l'activation des cellules T en réponse à un antigène seul sans l'intervention des molécules du CMH (124). Eshhar et al., deux ans plus tard, à l'institut Weizmann des Sciences en Israël, utilisent une approche similaire de TCR chimérique cytotoxique via l'action de l'IL-2 (125). Cette méthode nécessitait une double transfection virale entraînant une faible efficacité de la co-transduction (126). Par conséquent, ces travaux ont amené cette même équipe à perfectionner leur méthode dans le but de détecter au mieux la cellule cible. Eshhar et al, ont alors conçu un récepteur chimérique à chaîne unique composé du fragment variable (scFv, *single-chain Fv domain* comprenant les régions variables d'une chaîne légère VL et d'une chaîne lourde VH d'immunoglobuline) d'un anticorps spécifique d'un antigène. Ce scFv est fusionné soit avec un domaine de signalisation intracellulaire des lymphocytes T provenant de la chaîne ζ du complexe CD3, soit de la chaîne γ du récepteur Fc d'immunoglobuline (Fc ϵ R1 γ)(127). Ainsi, le résultat de ce produit chimérique était la formation de scFvR exprimé par les lymphocytes T comme un récepteur spécifique et pouvant détecter les antigènes tumoraux (127). Par conséquent, cette méthode d'édition génique permet une activation des lymphocytes T qui est à la fois spécifique de l'antigène et indépendante du TCR endogène, éliminant ainsi la nécessité de la présentation du complexe CMH/peptide. Il s'apparente au CAR de première génération. En effet, les cellules CAR-T sont, par définition, des lymphocytes T avec un TCR génétiquement modifié appelé CAR. Le CAR de première génération est composé d'une partie extracellulaire (scFv) impliquée dans la reconnaissance d'un antigène spécifique, connectée à un domaine de signalisation intracellulaire CD3 ζ , permettant l'activation des cellules T, via un domaine transmembranaire (127)(Figure 10A). Cependant, une limite aux CAR de première génération s'est vite présentée à son utilisation en clinique, en raison de sa stimulation faible et de courte durée envers les lymphocytes T modifiés (128,129). Des évolutions dans la structure du CAR ont été par conséquent réfléchies pour permettre une amplification du signal d'activation des cellules T (130). Ainsi, la nécessité d'ajouter un domaine de costimulation (CD28(131–133) ou 4-1BB(134,135) le plus souvent) a été prise en compte. Une amélioration de l'efficacité a été relevée ainsi qu'une persistance prolongée et une expansion accrue des cellules génétiquement modifiées avec ces domaines supplémentaires (122,133,135–137). Les CAR de deuxième (122,133,135,136) et troisième (138,139) générations se sont alors développés avec l'ajout respectif d'un (CD28 ou 4-1BB) et de deux (CD28 et 4-1BB le plus souvent) domaines de costimulation. Les CAR-T de deuxième et troisième générations

constituent une révolution dans le traitement des hémopathies malignes en ciblant le CD19 à la surface des lymphocytes B malins ou le BCMA dans le myélome multiple. Ils ont amélioré la survie des patients atteints. Néanmoins, cette thérapie cellulaire présente des effets indésirables, ce qui amènent les chercheurs à vouloir améliorer également la sécurité de ce médicament. De plus, élargir et diversifier le nombre d'indications des CAR-T constituent des voies de progression vers laquelle la recherche s'oriente. Néanmoins l'infiltration des CAR-T dans le microenvironnement tumoral dans certains cancers reste parfois difficile. La conception d'une quatrième génération correspond à la combinaison d'un CAR de seconde génération avec une cytokine ou un ligand de costimulation ou une enzyme ou un gène suicide ou un élément qui améliore la fonction anti-tumorale des cellules T (140–143). En effet, le transgène juxtapose un promoteur inductible avec la séquence d'une cytokine, de ce fait, cette quatrième génération de CAR est nommée également TRUCK (*T cells Redirected Universal Cytokine product*) ou CAR armés (143). Par exemple, le plus connu est le modèle où la sécrétion d'IL-12 par les cellules CAR-T stimule ainsi la cytotoxicité et augmente l'activité anti-tumorale par renforcement de la fonction des macrophages et diminution des lymphocytes T régulateurs (144–146). De plus, plus récemment l'incorporation d'un gène de la caspase-9 inductible (147,148) et l'intégration d'une SNIP (*signal neutralization by an inhibitable protease*)(149) se sont aussi présentées comme des possibilités pour augmenter l'efficacité des CAR et diminuer leur toxicité. La structure des cellules CAR-T est en perpétuelle amélioration. Une cinquième génération commence à être décrite, avec notamment l'ajout d'un récepteur tronqué de cytokine (IL-2R par exemple)(150) en intracellulaire, avec un motif de liaison (STAT-3 notamment) pour permettre une activation de la voie JAK/STAT de manière dépendante de l'antigène (151). Cette nouvelle génération de CAR améliorerait et renforcerait la prolifération et la survie des lymphocytes T modifiés (152) (Figure 10B).

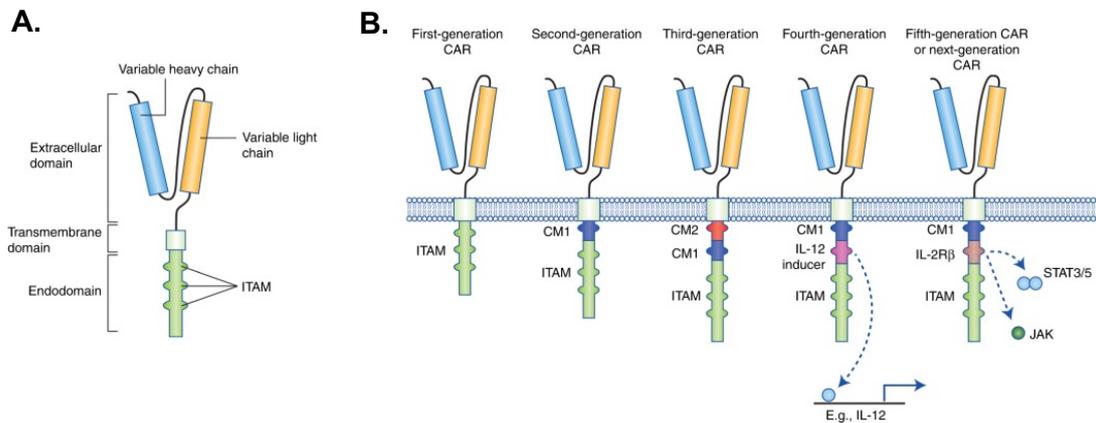


Figure 10 – Structure des différentes générations de CAR. (A), Structure de base d'un CAR avec les différents domaines le composant ; **(B),** Évolution du développement structurel des CARs de la première à la cinquième génération (Extraite de Tokarew et al., *Br J Cancer*, 2019)(152). Abréviations: CAR, *Chimeric antigen receptor*; CM, *co-stimulatory molecule* ; ITAM, *Immunoreceptor tyrosine-based activation motif*

Néanmoins, la problématique du coût élevé d'une injection de CAR-T est aussi à prendre en compte. Le concept de « CAR universel » est une possibilité intéressante pour une production à plus grande échelle et permettrait de réduire le coût du traitement. Cela représenterait une nouvelle génération de cellules CAR-T avec la greffe possible d'un système BBIR (*biotin-binding immune receptor*)(153) ou SUPRA (*split, universal and programmable*)(154) en extracellulaire permettant une polyvalence du CAR pour reconnaître plusieurs antigènes cibles. La programmation de cellules T à partir de donneurs sains pour une utilisation de cellules CAR-T allogéniques en clinique constitue aussi une stratégie potentielle dans la production de cellules CAR -T universelles (155). Néanmoins, des modifications génétiques supplémentaires dans l'édition du CAR seront nécessaires pour prévenir une maladie du greffon contre l'hôte(141,156).

Des méthodes d'optimisation des cellules CAR-T sont en cours d'investigation dans de nombreux essais précliniques et cliniques. Les deux objectifs principaux sont : d'augmenter la sélectivité des CAR-T par une stratégie de reconnaissance de plusieurs antigènes (Multi-CAR, *Dual-CAR*, CAR en tandem, CAR/SynNotch, CAR inhibiteur) mais aussi de contrôler leur activation par diminution de la toxicité des cellules CAR-T, ou élimination spécifique des cellules génétiquement modifiées (*Split CAR* et *Suicide switch*) (144)(Figure 11).

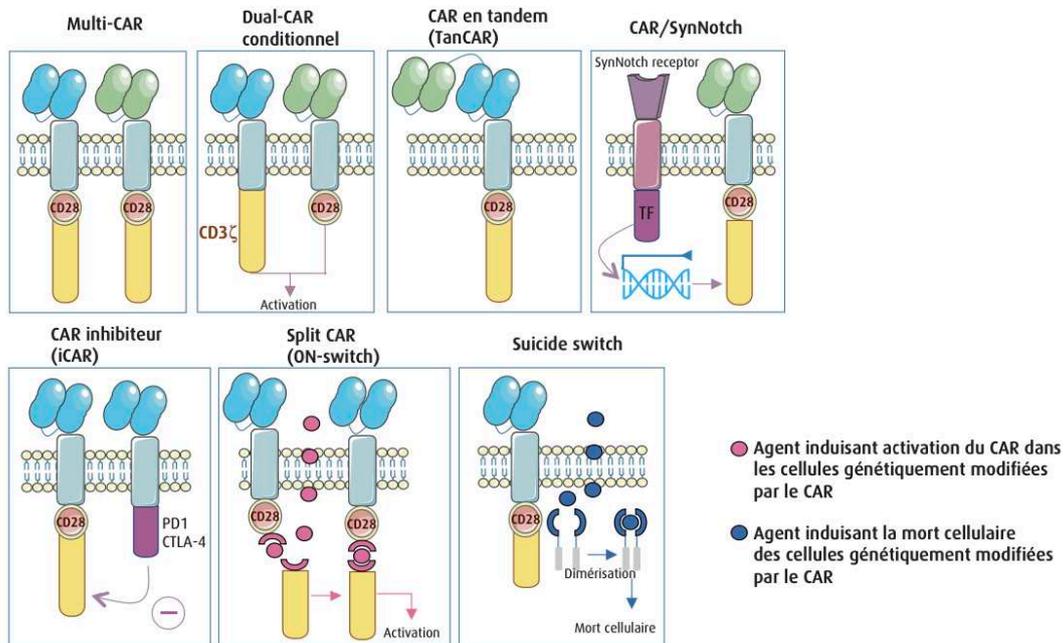


Figure 11 – Méthodes d’optimisation des cellules CAR-T : « Smart T cells » (Extraite de Rubio et al., *Bull Cancer*, 2018) (144) Abréviation : TF, facteur de transcription

Aujourd’hui, il est effectivement possible de décrire de nombreuses évolutions dans la structure et l’ingénierie des cellules CAR-T promettant une production universelle d’une thérapie polyvalente unissant une meilleure efficacité et sécurité à un moindre coût. Or, actuellement, en clinique, ce sont principalement des cellules CAR-T de deuxième génération qui sont utilisés.

En effet, le traitement par cellules CAR-T est une révolution dans le domaine de la prise en charge des hémopathies malignes. D’abord autorisé dans le traitement des LAL-B pour le CAR-T anti-CD19 tisagenlecleucel (Kymriah®)(157), cela s’est très vite enchaîné avec l’approbation dans d’autres indications comme le lymphome B diffus à grandes cellules (DLBCL)(158) et le lymphome folliculaire (159). Cependant, d’autres spécialités à base de cellules CAR-T se sont également développées pour des indications différentes en hématologie telles que le lymphome du manteau (160), et le myélome multiple. Les spécialités administrées dans le myélome multiple ont pour cible l’antigène de maturation des cellules B (BCMA)(161,162). De plus, aujourd’hui, les spécialités à bases de CAR-T intéressent d’autres pathologies (tumeurs solides, maladies auto-immunes, infections virales...), et constituent le principal élément de nombreux essais cliniques en cours partout dans le Monde avec l’utilisation de cibles et de systèmes de production différents. Un résumé des essais cliniques actuels ainsi que les médicaments autorisés, à base de cellules CAR-T, sont détaillés dans des sections ultérieures. Par ailleurs, d’autres types de cellules ont été étudiés pour intégrer la protéine CAR dans le but d’infiltrer de façon plus efficace les tumeurs et leur

microenvironnement immunosuppresseur telles que les cellules NK (163,164) et les macrophages (165).

En France, le statut des cellules CAR-T s'inscrit dans la catégorie des médicaments de thérapie innovante (MTI) conformément au règlement européen CE 2007-1394 en raison de la modification génétique de lymphocytes T permettant l'expression à leur surface d'un récepteur chimérique à l'antigène appelé CAR (166). Ce sont effectivement des médicaments de thérapie génique étant donné que l'effet thérapeutique résulte de l'intégration d'une séquence d'ADN recombinant, codant pour le CAR, responsable à la fois de la reconnaissance spécifique de l'antigène tumoral et de l'activation cytotoxique des lymphocytes T modifiés (167). Les MTI ont également intégré le droit français d'après la loi n°2011-302 (168). Les exigences réglementaires de ces thérapies sont établies en France par l'Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé (ANSM), l'*European medicines agency* (EMA) en Europe et la *Food and drug administration* (FDA) aux États-Unis. Les cellules CAR-T doivent obtenir une autorisation de mise sur le marché, délivrée via une procédure centralisée par l'EMA, sur avis du «*Committee for Medicinal Products for Human Use*» (CHMP)(167). Actuellement, seules les cellules CAR-T dites «autologues», produites à partir des cellules du patient lui-même, sont autorisées par ces agences réglementaires. Leur fabrication et leur délivrance relèvent respectivement d'un établissement pharmaceutique et de la pharmacie d'usage intérieur.

B) Production des cellules CAR-T

Le processus de fabrication des cellules CAR-T suit plusieurs étapes dont les principales sont exposées Figure 12. Tout d'abord, la leucaphérèse est réalisée dans un centre spécialisé pour collecter les cellules mononucléées périphériques (PBMC) du patient. Ce produit est ensuite envoyé au service de thérapie cellulaire de l'Établissement Français du sang (EFS) puis transféré au laboratoire de production des cellules CAR-T. Un immunophénotypage lymphocytaire de la poche de leucaphérèse est réalisé au laboratoire d'immunologie pour déterminer le nombre de lymphocytes T (CD3) et les différentes sous-populations lymphocytaires. Les lymphocytes T CD3+ sont sélectionnés et activés avant d'être transduits à l'aide d'un vecteur viral inactivé (lentivirus ou gammarétrovirus) portant le transgène du CAR. Une fois, ce transgène intégré dans leur génome, les lymphocytes T expriment la protéine CAR à la surface de leur membrane, capable de reconnaître un antigène cible spécifique. S'ensuit la mise en culture *in vitro* de ces lymphocytes T génétiquement modifiés favorisant leur expansion jusqu'à obtenir une quantité de cellules CAR-T

suffisant pour garantir une efficacité optimale après réinjection. Une semaine avant la réinjection des cellules CAR-T, le patient sera hospitalisé en service clinique pour recevoir une chimiothérapie lymphodéplétive. Cette étape est suivie d'une période de repos de 2 jours avant la réinjection afin d'éviter la destruction des cellules CAR-T réinjectées. Cette étape améliore l'efficacité du traitement (amplification de l'expansion des cellules CAR-T et une persistance accrue *in vivo*) en optimisant l'environnement cytokinique et en diminuant la population cellulaire lymphocytaire présente au préalable de la réinjection.

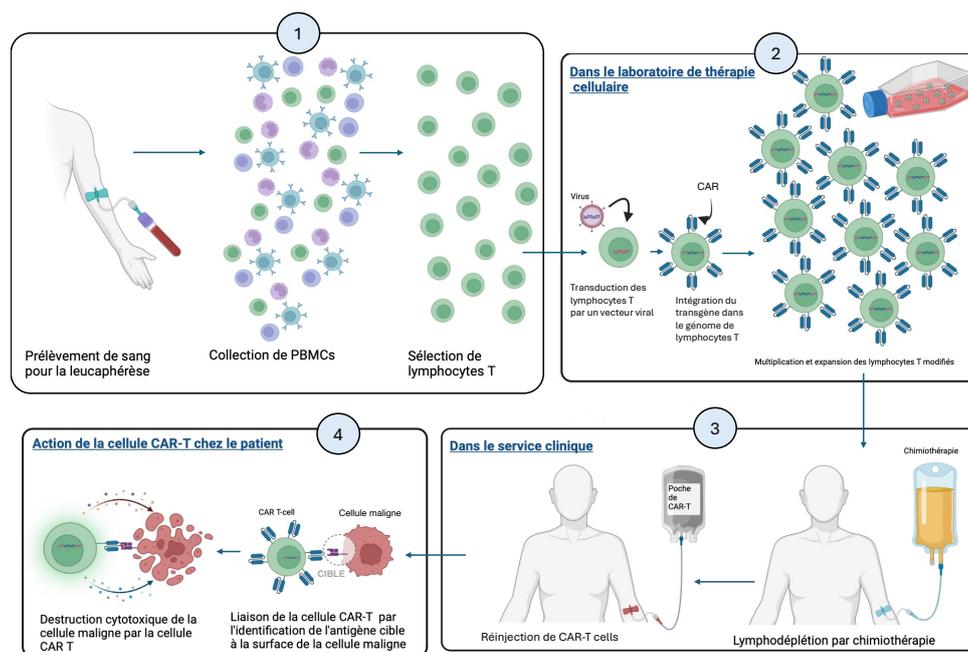


Figure 12 – Les différentes étapes principales de la production de CAR-T jusqu'à l'administration au patient. Le produit de leucaphérèse subit une sélection positive des lymphocytes T. Ensuite, ces lymphocytes T sont ensuite transduits par un vecteur viral inactivé (gammaretrovirus ou lentivirus) ayant intégré le gène du CAR, puis une phase de multiplication et expansion cellulaire a lieu. Enfin, le patient après sa lymphodéplétion par chimiothérapie pourra se voir administrer une poche de cellules CAR-T. Abréviation : CAR, *Chimeric antigen receptor*

C) Mode d'action général des cellules CAR-T

Les cellules CAR-T sont des lymphocytes T génétiquement modifiés pour cibler spécifiquement les cellules tumorales, en exploitant leurs capacités de destruction des cellules anormales. Le CAR reconnaît un antigène spécifique présent à la surface des cellules malignes. Cette reconnaissance est indépendante des molécules du CMH ce qui confère une certaine efficacité des cellules CAR-T dans des environnements tumoraux où les cellules cancéreuses échappent à la détection immunitaire classique. Après reconnaissance et interaction des cellules CAR-T avec les cellules exprimant l'antigène spécifique cible, cela déclenche leur activation. Par ailleurs, les cellules CAR-T peuvent être CD4+ ou CD8+ et leurs mécanismes d'action correspondent aux mécanismes physiologiques des lymphocytes T CD4+ et CD8+. En effet, d'une part, les cellules CAR-T vont proliférer pour augmenter leur nombre et renforcer la réponse

anti-tumorale et d'autre part, libérer des cytokines (interféron gamma (IFN- γ) et IL-2 notamment) pour stimuler le système immunitaire et favoriser l'élimination des cellules tumorales. Les mécanismes de destruction des cellules tumorales sont de 3. Tout d'abord, les cellules CAR-T libèrent de la perforine et des granzymes (protéines cytotoxiques) par dégranulation cytotolytique. La perforine forme des pores dans la membrane de la cellule cible, permettant aux granzymes de pénétrer et de déclencher l'apoptose(169). Une action médiée par Fas ligand (FasL) peut être synergique ou additive à cet axe perforine/granzyme dans la dégranulation et l'action lytique. Cependant, FasL agit plus généralement de façon retardée (170). L'axe Fas/FasL constitue une voie alternative par laquelle les cellules CAR T peuvent médier la lyse des cellules tumorales dans un environnement tumoral hétérogène (169). Enfin, la production de cytokines par les cellules CAR-T activées améliore leurs capacités antitumorales tout en induisant l'expression de récepteur d'IFN- γ sur le stroma tumoral (169)(Figure 13).

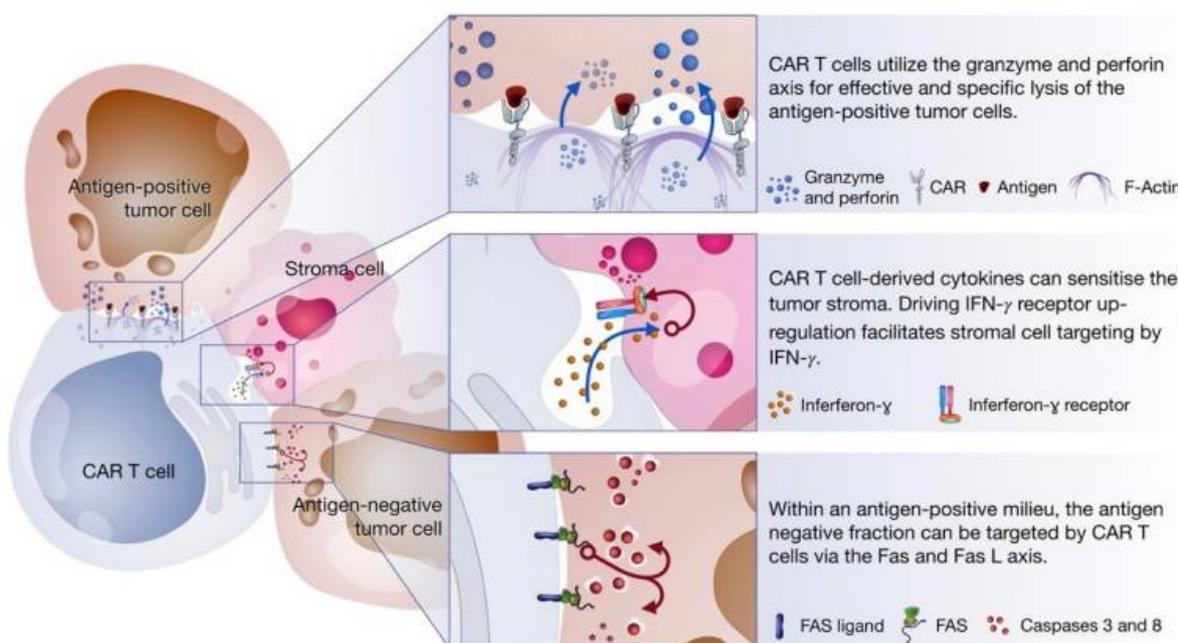


Figure 13 - Mécanisme d'action des cellules CAR-T (Extraite de Benmebarek et al., Int J Mol Sci, 2019)(169). Abréviations : CAR, *Chimeric antigen receptor* ; IFN- γ , Interféron gamma

D) Médicaments commercialisés et leurs indications

Au 1^{er} août 2024, 6 spécialités de cellules CAR-T ont été approuvées au niveau européen et sont alors disponibles pour les patients français. Quatre ciblent le CD19 dans les hémopathies malignes de la lignée B et deux le BCMA dans le myélome multiple. Les cellules CAR-T sont présentées dans l'ordre chronologique de leur approbation par la FDA (Figure 14A) et par l'EMA (Figure 14B). Chronologiquement, les spécialités, dont la cible est le CD19, ont toutes reçu l'approbation par la FDA avant les spécialités anti-BCMA (Figure 14A). Il est intéressant de remarquer que

l'approbation de la FDA est toujours effectuée avant celle de l'EMA. Le temps entre ces deux approbations peut varier entre environ 5 mois et 2 ans. Pour l'EMA, au sujet du Breyanzi®, l'autorisation de mise sur le marché a été un peu plus tardive que celle pour la FDA. En effet, l'approbation par l'EMA a été obtenue en avril 2022 alors que celle par la FDA date de février 2021. Dans la Figure 14, on peut remarquer que l'Abecma® qui a été approuvé aux États-Unis plus tard que le Breyanzi® est toutefois autorisé en Europe plus tôt que le Breyanzi®. Il est intéressant de noter également que Carvykti® a obtenu son autorisation par l'EMA deux ans après celle de la FDA.

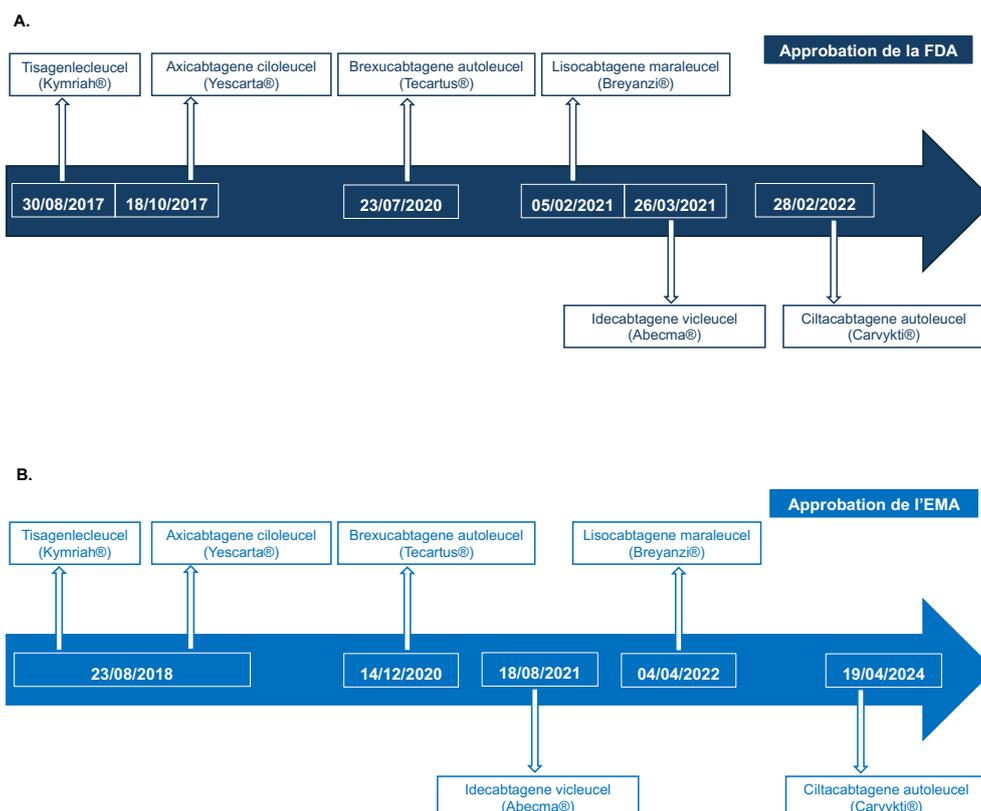


Figure 14 – Chronologie des approbations des différentes spécialités composées de cellules CAR-T (A), par la Food and drug administration (FDA) ; (B), par l'European Medicines Agency (EMA).

La table 15 résume toutes les spécialités thérapeutiques à base de cellules CAR-T qui ont reçu une autorisation de mise sur le marché par les autorités américaines et européennes. La présentation des différentes spécialités se fera par ordre chronologique de la date d'autorisation de la FDA.

DCI (Spécialités)	Tisagenlecleucel (Kymriah®)	Axicabtagene ciloleucel (Yescarta®)	Brexucabtagene autoleucel (Tecartus®)	Lisocabtagene maraleucel (Breyanzi®)	Idecabtagene vicleucel (Abecma®)	Ciltacabtagene autoleucel (Carvykti®)
Cible	CD19				BCMA	
Indications	Lymphome folliculaire (R/R), DLBCL (R/R), LAL-B (R/R)	Lymphome folliculaire (R/R), DLBCL (R/R), PMBCL (R/R), HGBCL (R/R)	Lymphome du manteau (R/R), LAL-pré B (R/R)	DLBCL (R/R), HGBCL (R/R), PMBCL (R/R), Lymphome folliculaire (R/R), LLC (R/R), Lymphome du manteau (R/R)	Myélome multiple (R/R)	
Populations concernées	Adulte LAL-B (R/R) (enfants et jeunes adultes [18;25])	Adulte	Adulte (LAL-pré B ≥ 26 ans)	Adulte	Adulte	Adulte
Laboratoire	Novartis Pharmaceuticals Corporation	Kite Pharma (Gilead Sciences)	Kite Pharma (Gilead Sciences)	Celgene Corporation (Bristol-Myers Squibb)	Celgene Corporation (Bristol-Myers Squibb)	Janssen-Cilag International NV
Génération de CAR-T	2 ^{ème}	2 ^{ème}	2 ^{ème}	3 ^{ème}	2 ^{ème}	2 ^{ème}
Virus de transduction	Lentivirus	Gammaretrovirus	Gammaretrovirus	Lentivirus	Lentivirus	Lentivirus
Domaine de costimulation	4-1BB	CD28		CD28 et 4-1BB	4-1BB	
Domaine de signalisation (et autre domaine coexprimé)	CD3-zêta			CD3-zêta (et récepteur non fonctionnel et tronqué du facteur de croissance épidermique (EGFRt))	CD3-zêta	

Table 15 – Spécialités à base de cellules CAR-T approuvées actuellement sur le marché européen, américain et français. Abréviations : DCI, dénomination commune internationale ; DLBCL, lymphome B diffus à grandes cellules ; HGBCL, lymphome à cellules B de haut grade ; LAL-B, leucémie aiguë lymphoblastique B ; PMBCL, lymphome primaire médiastinal à grandes cellules B ; R/R, en rechute et réfractaire.

Tisagenlecleucel (Kymriah®) était la première spécialité de cellules CAR-T, autorisée par la FDA en août 2017 puis en août 2018 par l'EMA. Cette spécialité a pour cible le CD19 et a été développée par *Novartis Pharmaceuticals Corporation* (East Hanover, New Jersey (*United States of America* (USA))). Ce traitement était initialement développé par une équipe de l'Université de Pennsylvanie dirigée par Carl H. June. Il s'agit d'un CAR de deuxième génération avec 4-1BB comme domaine de costimulation et transduit par un vecteur lentiviral. Le CAR constitué d'un fragment d'anticorps d'origine murine à chaîne unique reconnaît le CD19 à la surface des lymphocytes B et des cellules malignes lymphoïdes issue de la lignée B. Ainsi, ceci explique son indication pour les hémopathies malignes impliquant la lignée B. La première indication dans laquelle il a été approuvé est la leucémie aiguë lymphoblastique B (LAL-B) (R/R) dans la population pédiatrique et du jeune adulte (jusqu'à 25 ans inclus). Grâce à l'essai clinique de phase II multicentrique ELIANA (NCT02435849) sur 79 patients de 3 à 24 ans, le taux de rémission global dans les 3 mois était de 82.3% correspondant à 65 patients de cet échantillon dont 64 avec une MRD totalement négative à 3 mois. La survie sans évènement était de 44.4% après 3 ans (avec une médiane à 24 mois environ) alors que la survie globale était de 62.8%(171). Il est intéressant de noter aussi que le taux sans rechute après 1 an a été évalué à 59.0%(157). Ensuite, l'essai clinique C2201 ou JULIET (NCT02445248) de phase II multicentrique concernant des

patients atteints de DLBCL (R/R) a été mené par l'équipe de Gilles Salles et Richard Maziarz (158,172,173). Parmi les 115 patients inclus dans cette étude, 45 (39.1%) présentaient une réponse complète et 16 (13.9%) une réponse partielle représentant un taux de réponse globale à 53.0% (n = 61 patients). Ainsi, ces résultats mettaient en avant l'avantage d'utiliser Kymriah® dans cette indication plutôt que l'association de chimiothérapie à haute dose et d'une autogreffe de CSH en raison du taux de réponse rapporté beaucoup plus faible (7.0%)(158,174). L'EMA a approuvé en 2022 une extension d'indication du Kymriah® pour le lymphome folliculaire R/R du fait des résultats de l'essai clinique de phase II multicentrique ELARA ou E2202 (NCT03568461)(159,173). Un suivi plus actuel des patients ELARA sur 29 mois a montré que les taux de réponse complète et de réponse globale ont été évalués respectivement à 68.1% et 86.2% (175). Pour cette thérapie, des améliorations peuvent être apportées notamment sur le traitement d'attente (ou également dit de *bridging*) entre la perfusion de CAR-T et la récurrence en utilisant par exemple le blinatumomab (176).

Axicabtagene ciloleucel (Yescarta®) est une spécialité pharmaceutique à base également de cellules autologues modifiées constituée de cellules T. Contrairement au Kymriah®, les lymphocytes T ont été transduits par un vecteur gammaretroviral exprimant un CAR anti-CD19 composé d'un fragment variable à chaîne simple murin anti-CD19 relié au domaine de costimulation CD28 et au domaine de signalisation CD3-zêta. Le titulaire de l'autorisation de mise sur le marché est Kite Pharma EU B.V. en Europe (Hoofddorp, Pays-Bas), appartenant au groupe Gilead Sciences. L'EMA a approuvé sa mise sur le marché européen à la même date que Kymriah® en 2018. Les indications sont relativement identiques (DLBCL et lymphome folliculaire) sauf que Yescarta® est aussi indiqué dans le lymphome à cellules B de haut grade (HGBCL) (R/R) et le lymphome primaire médiastinal à grandes cellules B (PMBCL) (R/R). L'EMA a toutefois accordé une dérogation à l'obligation de soumettre les résultats d'études réalisées avec Yescarta® dans la population pédiatrique dans le traitement des néoplasies à cellules B matures (177). L'approbation du Yescarta® dans le DLBCL, PMBCL et HGBCL (R/R) par la FDA fait suite aux premiers résultats de l'essai clinique multicentrique de phase II, ZUMA-1 (NCT02348216)(178). Il avait été observé un taux de réponse de 82% avec un taux de réponse complète à 54%. Le taux de survie globale était évalué à 18 mois de 52% (178). Comme mentionné précédemment avec Kymriah®, ces résultats mettent également en évidence un intérêt notable pour l'utilisation de Yescarta® dans le DLBCL, en comparaison avec la chimiothérapie

associée à une autogreffe de CSH, où seulement 7% des patients avaient atteint un taux de réponse complète (174). Ensuite, à partir des résultats du protocole clinique ZUMA-5 (NCT03105336)(179), le lymphome folliculaire est devenu une nouvelle indication de Yescarta®. Avec une médiane de suivi d'environ 41.7 mois (minimum 32.7 et maximum 57.4 mois) chez des patients souffrant de lymphome folliculaire (R/R), le taux de réponse globale a été évalué à 94% avec un taux de réponse complète à 79%. De plus, la survie globale sur 36 mois a été estimée à 76%(180). Puis, grâce à l'essai clinique ZUMA-7 (NCT03391466)(181) Yescarta® a montré une certaine évolution de l'utilisation des cellules CAR-T anti-CD19 dans le DLBCL. En effet, Locke et al. ont permis de montrer pour la première fois que les cellules CAR-T anti-CD19 de la spécialité Yescarta® peuvent être utilisées en deuxième ligne de traitement dans cette indication avec une réponse complète améliorée par rapport au groupe de patients ayant reçu un traitement standard (65% vs 32% respectivement). De plus, la survie sans évènement à 24 mois était supérieure chez les patients ayant reçu Yescarta® par rapport aux patients traités de façon standard (41% avec Yescarta® vs. 16% avec le traitement standard), de même que pour la survie globale (61% vs 52%)(181). Les résultats à 4 ans suivent une tendance similaire avec une survie globale égale à 54% pour le groupe de patients traités par Yescarta® et à 46% pour les patients ayant reçu un traitement standard(182). Ainsi, ces résultats permettent l'approbation de Yescarta® en deuxième ligne de traitement des DLBCL, ce qui lui confère un atout considérable comparativement au Kymriah®. L'étude rétrospective française DESCAR-T (NCT 04328298) compare l'utilisation du Kymriah® et de Yescarta® dans le DLBCL (R/R) en troisième ligne de traitement. Ces premiers résultats suggèrent que Yescarta® offre une efficacité supérieure mais également une toxicité plus élevée par rapport au Kymriah® dans cette indication. En effet, en termes d'efficacité, Bachy et al. retrouvent une différence statistiquement significative entre les résultats de taux de réponse globale et complète ($p\text{-value} < 0.001$) pour Yescarta® en comparaison avec Kymriah® (80.4% de taux de réponse globale avec 60.3% de réponse complète avec Yescarta® alors que pour Kymriah, les résultats sont respectivement de 66.0% et 42.1%). De plus, la survie globale serait meilleure pour les patients traités par Yescarta® (63.5% en survie globale d'un an vs 48.8% pour Kymriah®)(183) (Figure 15). Néanmoins, le nombre d'effets indésirables tels que le syndrome de relargage cytokinique (CRS) de bas grade (1-2) et l'*Immune Effector Cell-Associated Neurotoxicity syndrome* (ICANS) de haut grade (≥ 3) est apparu significativement plus important chez les patients ayant reçu Yescarta® par rapport à Kymriah ($p\text{-value} < 0.001$)(183). Une hypothèse supposerait le rôle du domaine de

costimulation utilisé étant donné qu'une activation plus importante peut être observée avec le CD28 en préclinique(184).

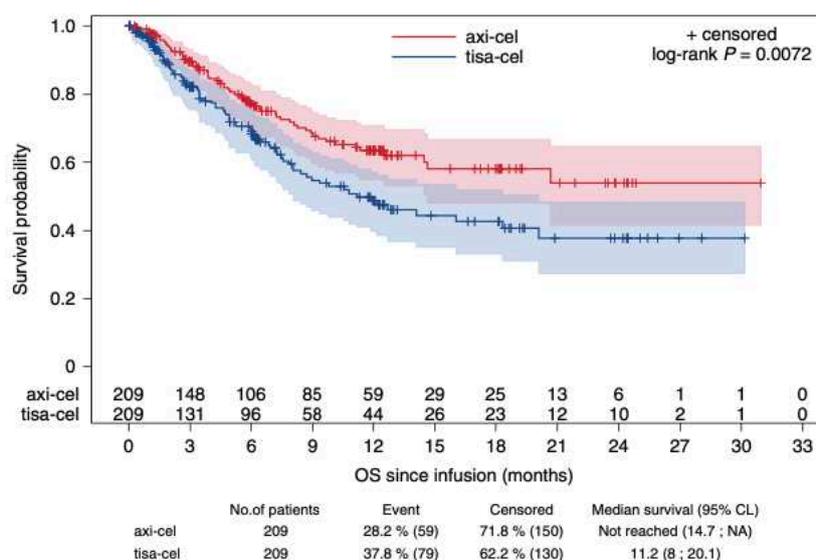


Figure 15 – Survie globale suivant le produit CAR-T utilisé (p -value = 0.0072) d'après l'étude rétrospective française DESCAR-T comparant Yescarta® et Kymriah® (Extraite de Bachy et al., *Nat Med*, 2022)(183). Les aires colorées et ombrées correspondent à l'intervalle de confiance 95% utilisant la méthode de Hall-Wellner. Abréviations : CL, limites de l'intervalle de confiance ; OS, survie globale.

Brexucabtagene autoleucel (Tecartus®) est la deuxième spécialité pharmaceutique à base de cellules CAR-T développée par Kite Pharma, filiale de Gilead Sciences. Le domaine de costimulation (CD28) et le virus de transduction (gammarétrovirus) restent similaires à Yescarta®. Cependant, la différence réside dans le processus de fabrication où une étape supplémentaire d'enrichissement des lymphocytes T est nécessaire, ce qui permettrait d'éliminer plus efficacement les cellules malignes circulantes. En 2020, grâce aux premiers résultats de l'essai clinique ZUMA-2 (NCT02601313) dans le lymphome du manteau, Tecartus® a reçu l'approbation par la FDA puis l'EMA dans cette indication avec une survie globale à 1 an de 83%(185). Après un suivi médian de presque 36 mois, un taux de réponse globale a été évalué sur 68 patients égal à 91% dont 68% de taux de réponse complète. La médiane de survie globale est estimée à 46.6 mois(186). Ensuite, l'essai clinique de phase II multicentrique ZUMA-3 (NCT02614066) montrait un taux de réponse globale à 71% et complète avoisinant les 56% ce qui a permis l'autorisation de mise sur le marché du Tecartus® pour la LAL-B pré B (R/R) chez l'adulte âgé de plus de 26 ans(187). Après un suivi médian des patients de 53.6 mois, la survie globale médiane a été estimée à 25.6 mois pour tous les patients traités et de 47.0 pour ceux qui ont connu une rémission complète(188). Néanmoins, Wang et al. ont rapporté des effets indésirables toxiques importants pouvant impacter la vie du patient(185). Par ailleurs, dans la LAL-

pré B R/R, un nombre élevé de lymphoblastes circulants peut constituer un facteur de risque d'échec thérapeutique(189).

Lisocabtagene maraleucel (Breyanzi®) est la dernière spécialité pharmaceutique à base de cellules CAR-T avec pour cible le CD19 ayant reçu l'autorisation de mise sur le marché par la FDA et l'EMA. C'est un CAR de troisième génération qui comprend deux domaines de costimulation le CD28 et 4-1BB. De plus, il inclue le récepteur tronqué non fonctionnel du facteur de croissance épidermique (EGFRt) à la surface des cellules avec le CAR spécifique au CD19. L'ajout de l'EGFRt dépourvu d'activité tyrosine kinase et de domaines de liaison aux ligands facilite *in vivo* la détection des lymphocytes T transduits et administrés. En cas d'effets indésirables graves, ce domaine supplémentaire est utile étant donné qu'il serait alors possible d'induire une élimination des cellules par une réponse de cytotoxicité dépendante des anticorps via le cétuximab pour ainsi favoriser l'élimination des cellules CAR-T. La composition et l'administration du Breyanzi sont différentes comparativement aux autres spécialités. En effet, après sélection des lymphocytes T CD4+ et CD8+, ces cellules sont purifiées, activées, transduites par un vecteur lentiviral, cryopréservées et injectées séparément suivant un ratio cible de composants cellulaires CD4+ et CD8+ 1/1. Cette spécialité a été développée par Celgene Distribution B.V. (Utrecht, Pays-Bas), appartenant à Bristol-Myers Squibb Pharma. Breyanzi® a été approuvé en 2021 par la FDA puis en 2022 par l'EMA. L'essai clinique TRANSCEND-NHL-001 (NCT02631044) multicentrique chez des patients adultes souffrant de DLBCL (R/R) (évoluant à partir d'un lymphome folliculaire, d'un lymphome, de la zone marginale, d'une leucémie lymphoïde chronique/lymphome lymphocytaire à petites cellules, d'une macroglobulinémie de Waldenström, ou autre) ou d'un HGBCL ou lymphome médiastinal primitif à grandes cellules B (PMBCL) et lymphome folliculaire de grade 3B a montré un taux de réponse globale de 72.7% et 53.1% de réponse complète. La survie globale à 1 an est évaluée à 57.9%(190) et celle à 2 ans à 50.5%(191). Concernant le lymphome du manteau, le taux de réponse complète est tout aussi satisfaisant atteignant 72.3%. De plus, pour ces patients ayant obtenu une RC, la survie globale médiane a été évaluée à 36.3 mois(192). Ensuite, l'étude clinique de phase III multicentrique TRANSFORM (NCT03575351) a permis l'autorisation du Breyanzi® en deuxième ligne de traitement du DLBCL en raison notamment d'une amélioration significative de la survie médiane sans évènement comparée à celle du groupe ayant reçu le traitement standard (10.1 mois vs 2.3 mois avec une *p-value* < 0.0001)(193). De plus, le taux de réponse globale est nettement supérieur dans le

groupe de patients ayant reçu du Breyanzi (86% vs.48%) avec un taux de réponse complète évaluée à 66%(193). Par ailleurs, un essai clinique européen TRANSCEND WORLD (NCT03484702) est en cours pour fournir une expérience clinique avec Breyanzi® dans le traitement des patients adultes en troisième ligne de traitement ou plus atteints de DLBCL ou HGBCL ou lymphome folliculaire (194). Un essai clinique de phase II, TRANSCEND FL (NCT04245839), a également montré des résultats prometteurs en deuxième ligne de traitement dans le lymphome folliculaire (R/R) pour des patients même avec un risque défavorable. Effectivement, un taux de réponse globale était égal à 96% avec tous les répondeurs ayant atteint une réponse complète(195).

Idecabtagene vicleucel (Abecma®) est le premier médicament à base de cellules CAR-T autorisé dans le myélome multiple. Contrairement aux autres spécialités déjà citées auparavant, il cible BCMA, une protéine de la superfamille des récepteurs du TNF (*Tumor necrosis factor*)(196), présent à la surface des plasmocytes normaux et surexprimé au niveau des plasmocytes tumoraux (197–200). Celgene du groupe Bristol-Myers Squibb a produit ces cellules CAR-T de deuxième génération avec un domaine de costimulation 4-1BB transduits par un vecteur lentiviral. Son autorisation de mise sur le marché européen et américain date de 2021 suite à la publication des résultats de l'étude multicentrique KarMMa (NCT03361748) chez des patients adultes présentant un myélome multiple (R/R). Le taux de réponse a été évalué à 73% avec 33% de réponses complètes ainsi qu'une MRD négative acquise pour 26% des patients traités. De plus, le taux de survie sans progression médian a été calculée à 8.8 mois(201) ce qui est favorable comparativement aux stratégies de traitement déjà précédemment approuvées comme le selinexor associé au dexaméthasone (3.7 mois)(202) et le belantamab mafodotin (2.9 mois)(203). Par ailleurs, une étude française multicentrique, DESCAR-T (NCT04328298), a montré des résultats d'efficacité transposables à KarMMa tant en termes de taux de réponses que de survie sans progression. C'est aussi comparable en termes de sécurité(204). Ensuite, l'essai clinique multicentrique KarMMa-3 (NCT03651128) évaluant l'efficacité et la sécurité d'Abecma® par rapport à celles des traitements standards dans le myélome multiple a pu démontrer que le taux de réponse (partielle ou complète) entre les deux groupes était significativement différent (71% pour l'Abecma® et 42% pour ceux avec un traitement standard (p -value < 0.001)). Les stratégies de traitements standards considérées dans cette étude étaient les suivantes [daratumumab, pomalidomide et dexaméthasone]; [daratumumab, bortezomib et dexaméthasone]; [ixazomib,

lenalidomide et dexaméthasone] ; [carfilzomib et dexaméthasone] ou [elotuzumab, pomalidomide et dexaméthasone] et sont comprises dans le groupe « traitement standard » comparé à Abecma®. En outre, la survie médiane sans progression est bien plus élevée dans le groupe Abecma® (13.3 mois vs 4.4 mois pour le groupe avec traitements standards, *p-value* <0.001). Cette étude montre ainsi qu'Abecma® a un réel intérêt thérapeutique pour ces patients comparativement aux traitements standards avec une amélioration du taux de réponse et une prolongation de la survie sans progression(205). De plus, une étude récente a également souligné que, selon les témoignages et les résultats rapportés par les patients, Abecma® pourrait améliorer la qualité de vie par rapport aux traitements standards(206).

Ciltacabtagene autoleucl (Carvykti®) est le deuxième médicament de thérapie innovante à base de cellules CAR-T dirigées contre le BCMA qui a été autorisée par l'EMA et la FDA. Il s'agit d'un CAR-T de seconde génération où les cellules ont été transduites à l'aide d'un vecteur lentiviral. Le titulaire de l'autorisation de mise sur le marché pour cette spécialité est Janssen-Cilag International NV (Beerse, Belgique) sur la base de l'étude pivot MMY2001 (ou CARTITUDE-1)(NCT03548207) où, avec une médiane de suivi égale à 12.4 mois, un taux de réponse atteignait 97% dont 67% avec un réponse complète(162). De plus, le taux de survie globale à 1 an était de 89% avec un taux de survie sans progression à 1 an de 77%(162). Avec une médiane de suivi égale à 28 mois, les taux de réponse globale et complète sont encore supérieurs (98% et 83% respectivement)(207). Le taux de survie globale à 27 mois était égal à 70.4% et sans progression à 54.9%(208). Cette étude permet de mettre en évidence la possibilité d'obtenir une réponse satisfaisante durable chez des patients souffrant de myélome multiple (R/R) avec de surcroît, des effets indésirables qui pouvaient être facilement pris en charge(162,207,208). Une étude multicentrique de phase 3, CARTITUDE-4 (MMY3002)(NCT04181827), a pour objectif d'évaluer et de comparer la réponse des patients souffrant de myélome multiple réfractaire au lenalidomide ayant reçu soit le traitement standard (daratumumab, pomalidomide, dexaméthasone ou bortézomib) soit Carvykti®(209). Le taux de survie sans progression à 1 an était de 75.9% dans le groupe ayant reçu Carvykti® tandis que celui pour le groupe avec le traitement standard était de 48.6%. De plus, les taux de réponse globale et complète ont été plus élevés pour les patients ayant reçu Carvykti® (84.6% et 73.1% respectivement) comparativement au groupe de patients traités avec les médicaments standards (67.3% et 21.8% respectivement)(209,210). Carvykti® réduirait également de 74% le risque de progression/décès(211). Ces résultats sont renforcés par le fait

que les patients ressentent un réel impact positif sur leur qualité de vie après avoir reçu Carvykti®(212).

Une publication de Martin et al. en 2021(213) puis une mise à jour en 2023(214) permettaient de comparer de façon indirecte et ajustée les paramètres appariés pouvant donner des informations sur l'efficacité des traitements Abecma® et Carvykti® pour le traitement du myélome multiple (R/R). Les résultats trouvés par les études CARTITUDE-1 et KarMMa ont été rassemblés pour permettre cette étude comparative. La population de l'essai clinique CARTITUDE-1 a été ajustée pour appairer avec les critères d'éligibilité et de distribution des facteurs pronostiques qu'utilise l'étude KarMMa. Ainsi, cela permet de prédire les résultats qu'aurait obtenu la population de l'étude KarMMa s'ils avaient reçu Carvykti®. Dans la dernière mise à jour de 2023, les taux de réponse globale et complète sont supérieurs pour Carvykti® en comparaison de ceux avec Abecma® quelle que soit la méthode d'ajustement utilisée (Figure 16A). La différence des taux de réponse (globale et complète) est statistiquement significative en faveur de Carvykti® concernant tous les cas comparatifs mentionnés (ajustés avec la méthode A ou B ou non ajustés) dans cette mise à jour, avec une *p-value* très faible (< 0.05). Pour les comparaisons ajustées et non ajustées, les courbes de survie sans progression et de survie globale sont respectivement représentées par les figures 16B et 16C. Après ajustement, la probabilité de survie sans progression sous Carvykti® était significativement plus importante que sous Abecma® (HR : 0.38, $p < 0.0001$) (Figure 16B), de même pour la survie globale (HR : 0.43, $p = 0.02$) (Figure 16C).

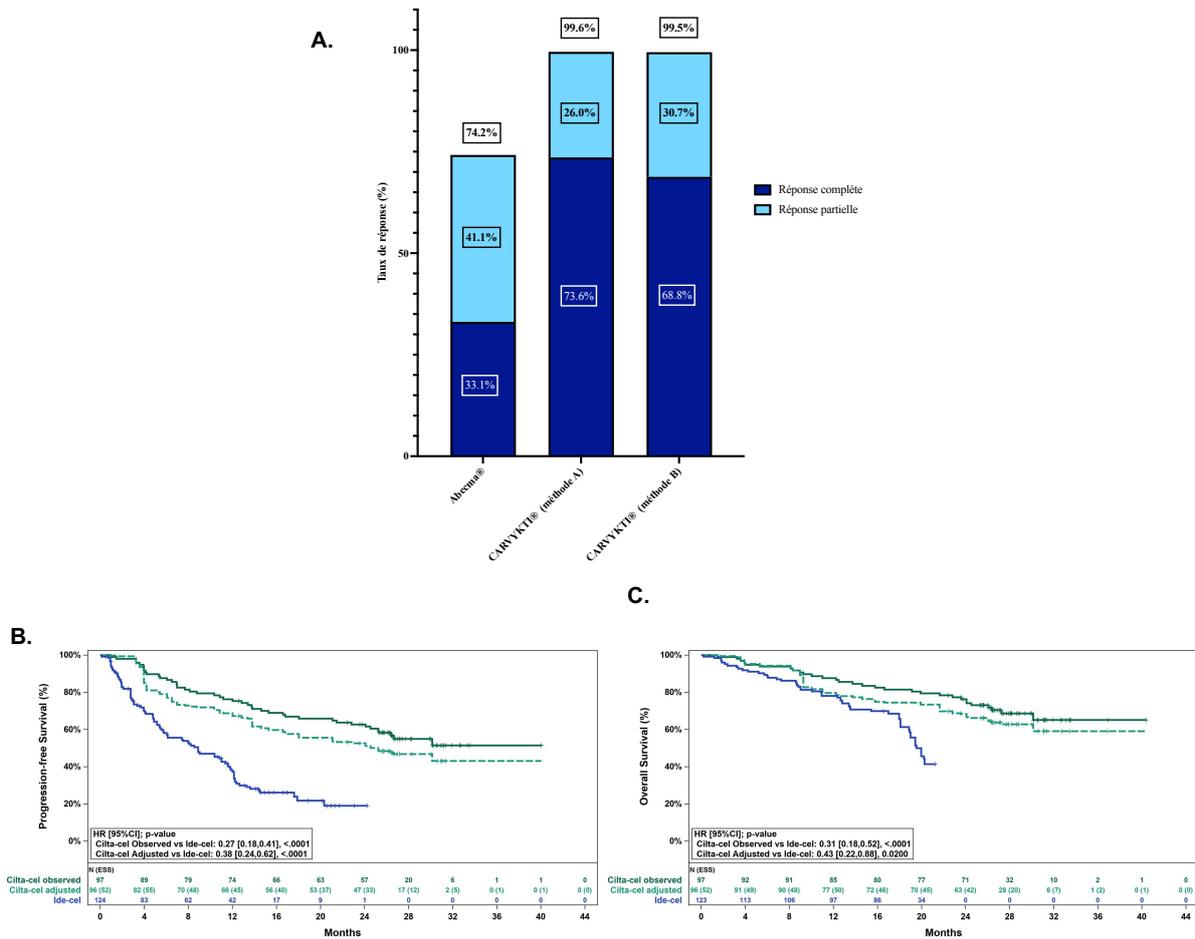


Figure 16 – Efficacité et survie de Carvykti® (A), Taux de réponses globale après ajustement pour Carvykti® en comparaison avec ceux d’Abecma® (Adaptée de Martin et al., *Current Medical Research and Opinion*, 2023) ; **(B)**, Courbes ajustées et observées (non ajustées) de Kaplan-Meier de la survie sans progression ; **(C)**, Courbes ajustées et observées (non ajustées) de Kaplan-Meier de la survie globale (les figures B et C sont extraites de Martin et al., *Current Medical Research and Opinion*, 2023)(214). Méthode A correspond à l’ajustement des patients de l’étude CARTITUDE-1 qui répondaient aux critères d’éligibilité de l’étude KarMMa, en fonction de leur statut réfractaire, de leur profil cytogénétique, de leur stade selon le système de classification international révisé, et de la présence de plasmocytomes dans l’analyse de base. Méthode B correspond à l’ajustement des patients de l’étude CARTITUDE-1 qui répondaient aux critères d’éligibilité de l’étude KarMMa, en fonction de leur statut réfractaire, de leur profil cytogénétique, de leur stade selon le système de classification international révisé, de la présence de plasmocytomes, du nombre de lignes de traitement antérieures, des années depuis le diagnostic du myélome multiple, de l’âge, de la greffe de cellules souches antérieure, du statut selon l’Eastern Cooperative Oncology Group, et du sexe dans l’analyse de sensibilité. Abréviations : CI, intervalle de confiance ; ESS, taille d’échantillon effective ; HR, *hazard ratio*.

E) Effets indésirables

L’administration de cellules CAR-T peut entraîner divers effets indésirables, certains étant spécifiques à ce traitement. Parmi les plus notables, on retrouve le CRS ainsi que l’ICANS. D’autres effets secondaires, fréquemment observés et similaires à ceux d’autres médicaments, incluent les cytopénies (215), l’hypogammaglobulinémie (216,217), les infections, les troubles métaboliques, les affections gastro-intestinales, les éruptions cutanées, les douleurs musculaires, les réactions au site d’administration et les atteintes rénales aiguës. Par ailleurs, bien que plus rares, certains effets

secondaires peuvent être graves, notamment ceux susceptibles de déclencher des processus tumoraux (Figure 17)(218)

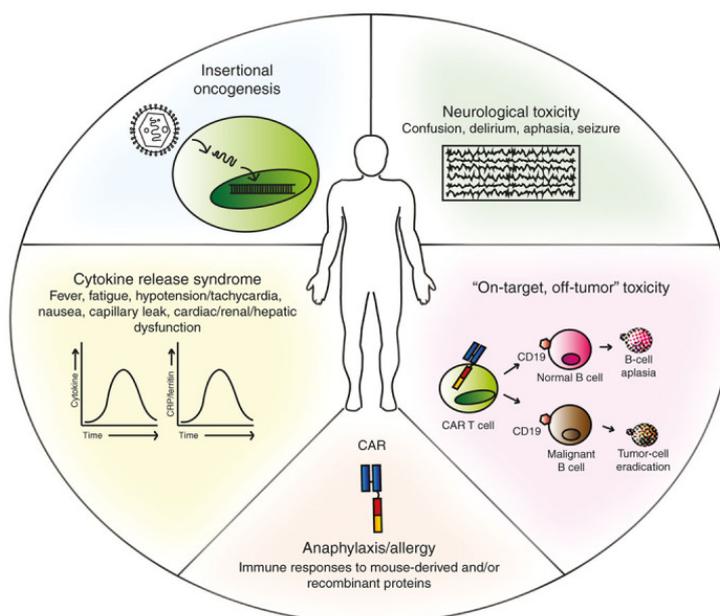


Figure 17 – Effets indésirables possibles du traitement par cellules CAR-T : oncogène d'insertion (théorique), « on-target, off-tumor » toxicité (responsabilité d'un antigène cible sur du tissu non pathogène), anaphylaxie/allergie (réaction de l'hôte contre l'antigène étranger exprimé sur les cellules CAR-T), syndrome de relargage de cytokines (CRS) (réponse du système inflammatoire après activation des cellules CAR-T), neurotoxicité (Extrainte de Bonifant et al., *Mol Ther Oncolytics*, 2016)(218). Abréviations : CRP, protéine C réactive

a) Syndrome de relargage de cytokines

Le CRS est l'effet indésirable le plus caractéristique et le plus fréquent qui apparaît quelques heures ou jours après l'injection de cellules CAR-T (219,220) (les premiers signes apparaissent le plus souvent dans les 14 premiers jours (221)). La survenue du CRS peut dépendre de quelques facteurs de risque tels que l'agressivité de l'hémopathie traitée (LAL par exemple)(222,223), la structure du CAR, la charge tumorale(219,224,225), une dose injectée importante de cellules CAR-T (224,226), un pic élevé de cellules CAR-T (221,224,227), une lymphodéplétion incluant la fludarabine (221,222,228), la présence du CD28 comme domaine de costimulation (222,229).

Le CRS correspond à une activation initiale du système immunitaire, entraînant une augmentation de la production de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IFN- γ et le *tumor necrosis factor alpha* (TNF α)(230), ainsi qu'à la sécrétion de molécules pyroptotiques comme la perforine et le granzyme B. D'une part, la perforine forme des pores dans les cellules malignes, favorisant le granzyme B à s'introduire dans ces cellules pour ensuite faciliter l'activation de la cascade des caspases via la gasdermine E (231). Ainsi, ceci déclenche leur mort cellulaire sous une forme hautement inflammatoire, nommée la pyroptose accompagnée de la libération de motifs

moléculaires associés aux dégâts (DAMP, *Damage Associated Molecular Pattern*)(232). La sécrétion de DAMPs active les cellules présentatrices d'antigènes (CPAs) de l'immunité innée telles que les macrophages(232) et les cellules dendritiques, qui les engagent, ensuite, dans la réponse inflammatoire. Cela accroît sévèrement la libération de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-1 β et IL-6 (220,224,233,234) étant donné que les principales sources sont les macrophages (235,236) et les monocytes (237,238). D'autre part, la sécrétion d'IFN- γ et de TNF α stimule également l'arrivée des CPAs exacerbant et amplifiant ainsi la synthèse de cytokines pro-inflammatoires (IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12). Par ailleurs, les interactions entre le CD40, exprimé par les cellules tumorales (239) et les CPAs, et son ligand CD40L, exprimé par les cellules CAR-T (240), renforcent le relargage important de cytokines (IL-1 β , IL-6, TNF α). Ces cytokines libérées se lient, ensuite, à leurs récepteurs présents sur les cellules endothéliales, induisant une lésion endothéliale médiée par le système immunitaire. L'endothélium, alors activé par une libération importante de facteurs procoagulants tels que le facteur von Willebrand et l'angiopoietine 2, entraîne principalement une fuite capillaire (226,234,241) mais également une hypotension (240). (Figure 18)

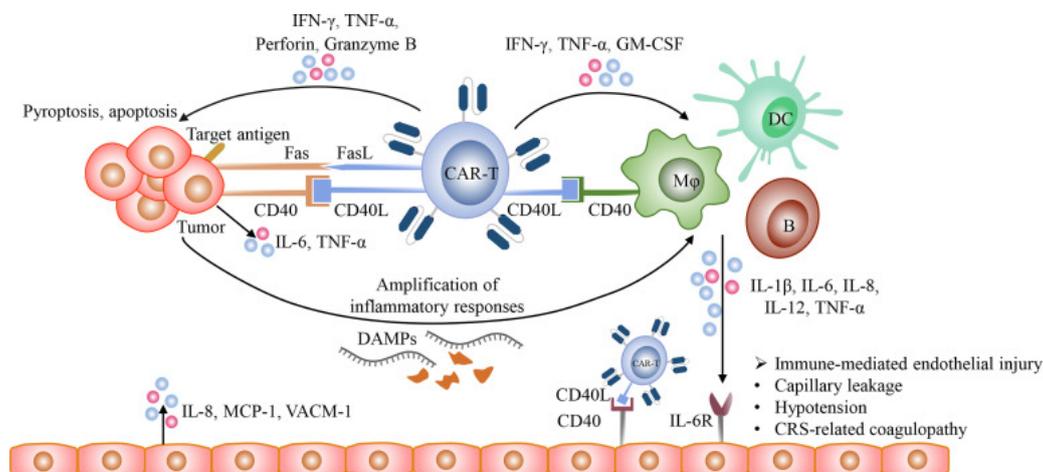


Figure 18 – Les différents mécanismes physiopathologiques du syndrome de relargage de cytokines (Extraite de Zhang et al., *Front Immunol*, 2022)(240).

En lien avec ces divers mécanismes physiopathologiques à l'origine du CRS, différents symptômes retentissent au niveau clinique pouvant toucher plusieurs organes (Figure 19)(219). Cependant, les signes cliniques à surveiller sont la fièvre, les signes d'hypoxémie et l'hypotension artérielle. D'autres symptômes cliniques sont également à prendre en compte comme les frissons, la tachycardie, les myalgies, la tachypnée, les signes de détresse respiratoire, le malaise, la fatigue, les nausées, l'anorexie, les troubles rénaux et cardiaques, l'insuffisance hépatique et la CIVD (218–220). Les symptômes du CRS peuvent être considérés non spécifiques et peuvent se confondre avec ceux d'un choc septique.

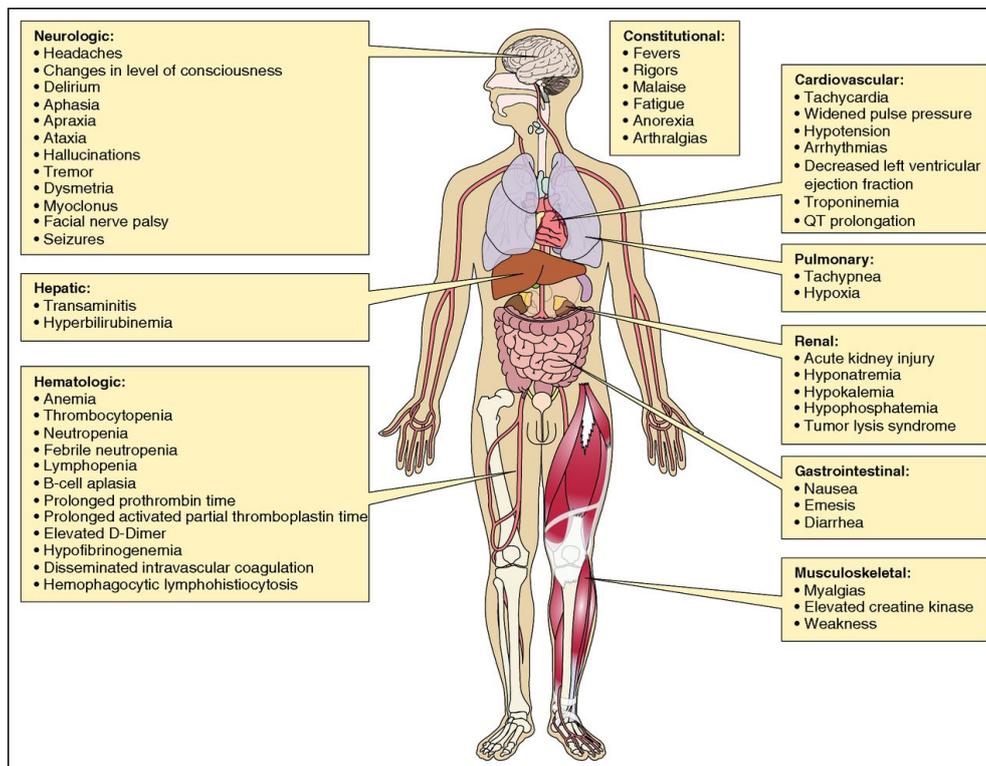


Figure 19 - Les toxicités du syndrome de relargage de cytokines par organe (Extrait de Brudno et al., *Blood*, 2016)(219)

Étant donné que le CRS est l'effet indésirable le plus fréquent, affectant divers organes avec des conséquences potentiellement réversibles ou irréversibles, il est devenu essentiel de grader le CRS observé chez chaque patient traité par cellules CAR-T. Cette évaluation permet de déterminer la gravité du syndrome et d'adapter en conséquence la prise en charge thérapeutique (220). La classification consensuelle de l'ASTCT (*American Society for Transplantation and Cellular Therapy*), établie en 2019, évalue la sévérité du CRS de grade 1 à 4 dans le contexte des thérapies par cellules CAR-T (242). Un grade 5 peut toutefois être attribué dans le cas d'un décès directement lié au CRS sans autre cause identifiée (242). Plus un CRS survient précocement plus il est considéré comme sévère. La stratégie thérapeutique en fonction des différents grades est présentée dans la Figure 20 (243). La SFGM-TC (*Francophone Society of Bone Marrow Transplantation and Cellular Therapy*) avait publié des recommandations en 2019 (244,245) qui montraient déjà la place importante des corticostéroïdes, tels que la dexaméthasone ainsi que d'un anticorps monoclonal humanisé anti-récepteur de l'IL-6, le tocilizumab dans la prise en charge du CRS (218,233,242,244–246). De même, l'importance d'une coordination assurée avec la réanimation avait déjà été mise en évidence lorsque des premiers signes d'hypotension ou d'hypoxémie avaient été observés chez les patients souffrant de CRS. De plus, le CRS est un effet secondaire sévère des thérapies par cellules CAR-T, mais ses symptômes, tels que la fièvre, la détresse respiratoire et l'hypotension,

sont également communs à d'autres affections, y compris les infections virales et bactériennes. Pour différencier le CRS de ces autres affections, il est essentiel de réaliser des tests diagnostiques tels que les hémocultures, les examens cyto bactériologiques des voies respiratoires et des urines, ainsi que des PCR virales. Ces tests permettent d'exclure la présence d'infections concomitantes. Si une infection est présente en même temps que le CRS, il est crucial de prendre en compte le paramètre temporel, en particulier le délai entre l'injection des cellules CAR-T et l'apparition des symptômes, pour une gestion clinique appropriée (242,245). Concernant l'administration du tocilizumab, il est important de prendre en considération la présence concomitante d'un ICANS étant donné qu'il peut possiblement en être responsable. En cas d'ICANS de grade au moins égal à celui du CRS, il est recommandé de ne pas injecter de tocilizumab (243,247) (Figure 20).

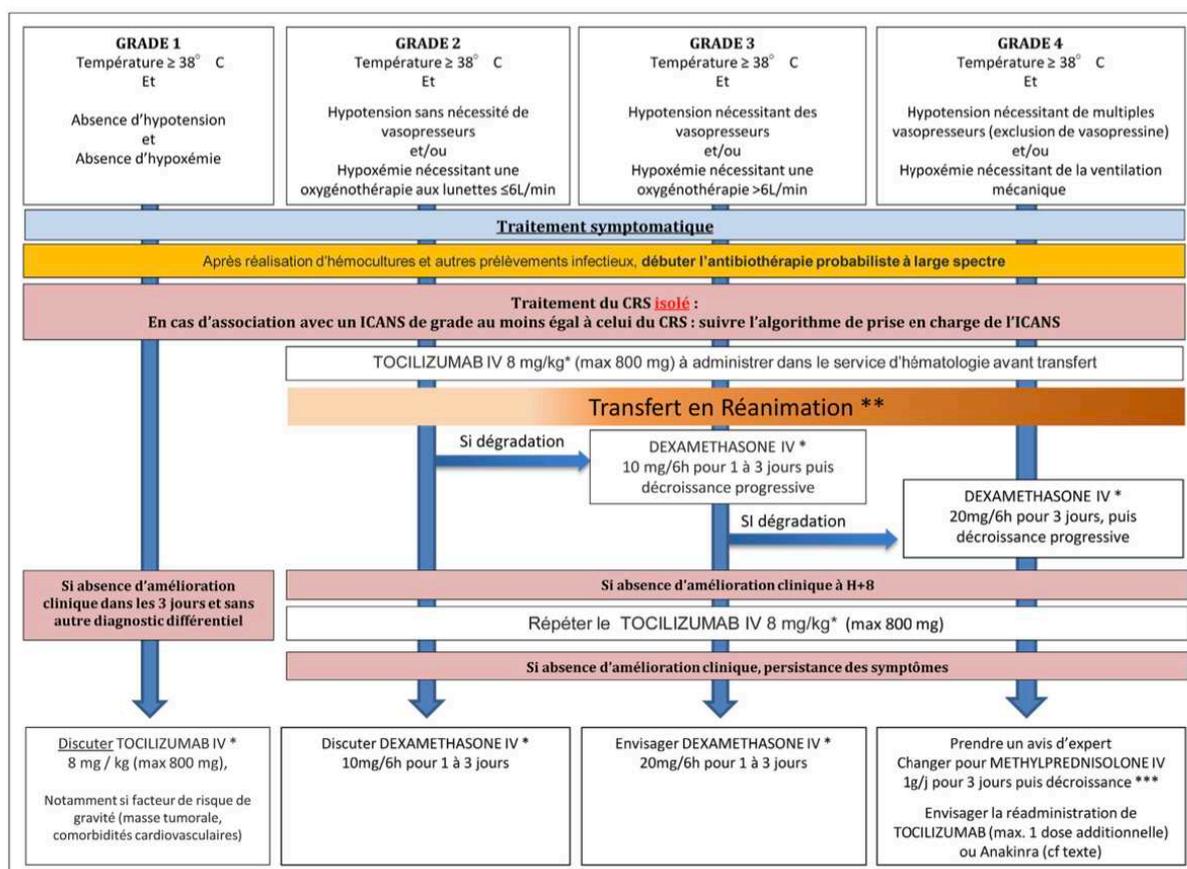


Figure 20 - Gestion de la prise en charge du syndrome de relargage de cytokines en fonction des différents grades de sévérité déterminés par Lee et al., *Biol Bone Marrow Transplant*, 2019(242) (Extrait Tudesq et al., *Bull Cancer*, 2023(243)). L'association du CRS avec un ICANS de grade égal ou supérieur impose le choix d'immunomodulation selon les recommandations de prise en charge de l'ICANS(247). * Chez l'enfant, le tocilizumab est prescrit à la dose de 12 mg/kg (max 800 mg), la dexaméthasone est prescrite à la dose de 6 mg/m² (max 10 mg), la méthylprednisolone en bolus de 1 g/1,73 m² (max 1 g). **Dans les centres expérimentés disposant d'une unité cellules CAR-T adaptée à une surveillance intensive, la prise en charge in situ d'un CRS de grade 2 résolutif peut se discuter. ***Exemple de décroissance rapide : 1000 mg/j pendant 3 jours puis 250 mg 2/j pour 2 jours puis 125 mg 2/j pour 2 jours puis 60 mg 2/j pour 2 jours puis sevrage total sur une semaine. Abréviations : IV, voie intraveineuse.

Si un CRS est réfractaire, un traitement immunomodulateur de troisième ligne peut être envisagé tel qu'un anticorps anti-IL6 direct (siltuximab) ou un anticorps anti-récepteur de l'IL1 (anakinra)(248). La destruction des cellules CAR-T par chimiothérapie sera le moyen de dernier recours (243).

En 2023, les recommandations de la SFGM-TC ont permis d'intégrer la possible survenue concomitante, consécutive ou associée, du syndrome d'activation macrophagique (SAM) avec le CRS après un traitement par cellules CAR-T et ainsi d'identifier les malades à risque de cette complication. Le SAM post-CRS est rare et peut être suspecté en cas de résistance aux corticostéroïdes et tocilizumab (il sera détaillé dans une partie dédiée). En effet, il est souvent détecté lorsque les symptômes cliniques persistent malgré une prise en charge optimale. Il faut prêter particulièrement attention lorsqu'il est combiné avec des paramètres d'hémophagocytose comme l'hyperferritinémie (> 10 000ng/mL), la présence d'hépatosplénomégalie et l'hypofibrinogénémie. Il faut également exclure les autres causes de SAM. La distinction entre un SAM et un CRS est assez complexe à détecter. Ainsi, l'incidence est difficile à énumérer mais serait très faible (249). La prise en charge d'un SAM secondaire au CRS est exposée en Figure 21 et inclue principalement des corticostéroïdes et de l'anakinra par voie intraveineuse (IV)(250). L'administration d'étoposide peut être prescrite en cas de SAM secondaire au CRS au stade avancé(243).

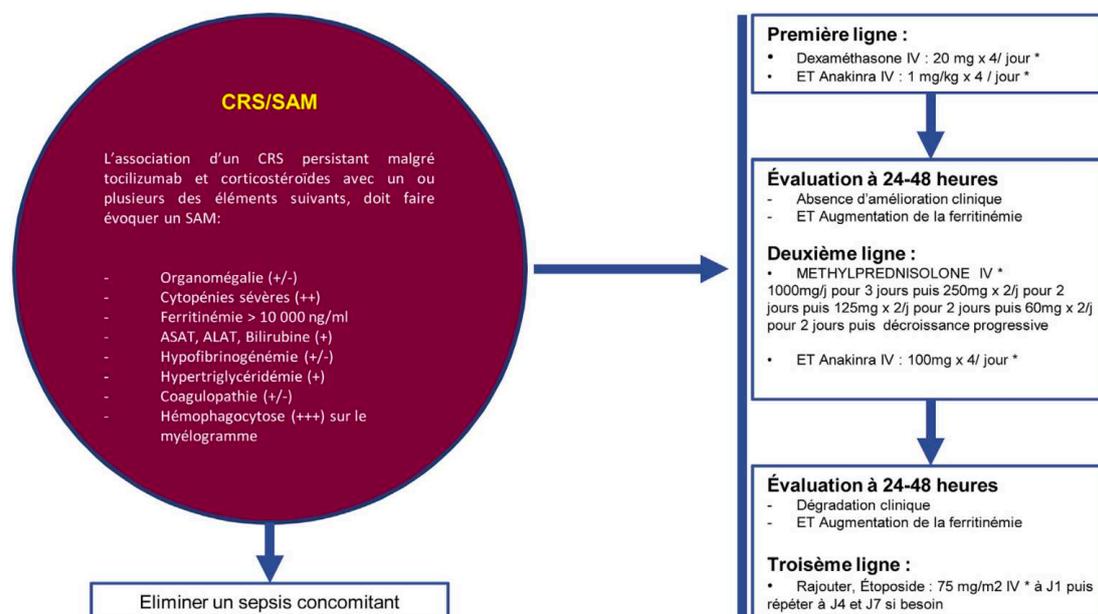


Figure 21 – Prise en charge du syndrome d'activation macrophagique secondaire au syndrome de relargage de cytokines (SAM/CRS) (Extrainte de Tusdeq et al., *Bull Cancer*, 2023)(243). * Chez l'enfant, la dexaméthasone est prescrite à la dose de 6 mg/m2 (max 10 mg), l'anakinra est prescrite à la dose de 2 mg/kg (max 100 mg) maximum toutes les 8 h, la méthylprednisolone en bolus de 1 g/1,73 m2 (max 1 g) puis décroissance progressive, l'étoposide à la dose de 75 mg/m2 (max 150 mg). Abréviation : IV, voie intraveineuse.

b) Neurotoxicité

Le deuxième effet indésirable le plus fréquent et potentiellement grave (car possiblement mortel) d'une injection de cellules CAR-T est l'*Immune effector cell-associated neurotoxicity syndrome* (ICANS ou en français syndrome de neurotoxicité associée au traitement par cellules CAR-T). Il survient souvent après le pic de sévérité du CRS, approximativement 4-5 jours après l'injection de CAR-T (222,251,252) avec l'apparition de signes cliniques tels qu'une aphasie, des troubles de l'attention et de la conscience, des délires, des confusions, des tremblements, des convulsions, des déficiences motrices, une encéphalopathie, un coma...(222,251,253,254). Ces symptômes peuvent durer de 5 à 10 jours (241). Certains patients pour lesquels une neurotoxicité sévère peut être observée ont pu développer un œdème cérébral (255,256). C'est rare mais peut-être fatal (241,257,258). Néanmoins, la neurotoxicité développée post-CAR-T chez des patients traités est souvent de nature aiguë. Elle est, dans la plupart des cas, réversible sans conséquences néfastes neurologiques ou cognitifs à moyen terme (entre 6 et 12 mois)(259). De plus, la neurotoxicité post-cellules CAR-T est souvent associée à un CRS concomitant ou antérieur (222,241,251,254). Par ailleurs, certains facteurs de risque de l'ICANS sont similaires au CRS comme la charge tumorale importante, la dose de cellules CAR-T injectée, un pic élevé de cellules CAR-T et la lymphodéplétion comprenant de la fludarabine et d'autres facteurs sont plus spécifiques de l'ICANS tels que la présence d'un CRS sévère antérieur et la présence de comorbidités neurologiques préexistantes (222,241,251,253,254). Au niveau biologique, des facteurs de risque sont aussi évocateurs de la survenue d'ICANS comme des taux élevés de LDH une thrombopénie avant injection de cellules CAR-T et une concentration élevée de ferritine 72 heures après le traitement (222,251,253,254). En outre, malgré la méconnaissance des mécanismes physiopathologiques de l'ICANS, cette neurotoxicité semble être aussi médiée par les cytokines. En effet, après la liaison du CAR-T avec la cellule blastique présentant le CD19, cela entraîne la libération de GM-CSF (*Granulocyte macrophage colony-stimulating factor*) mais aussi de *myeloid differentiating chemokines* (MDCs) pour activer le recrutement des macrophages et des monocytes. Ainsi, résultera la sécrétion d'IL-1 et l'IL-6 via ces cellules myéloïdes (241). Par ailleurs, comme expliqué précédemment, pendant le CRS, il a pu être observé une activation endothéliale due à la libération de cytokines et causant une fuite capillaire, mais aussi une brèche au niveau de la barrière hémato-encéphalique (BHE) ce qui favorise la libération de ces cytokines inflammatoires dans le liquide

céphalorachidien (LCR) (Figure 22). En effet, une ponction du LCR pouvait mettre en évidence une perméabilité de la BHE par la présence de protéines, de leucocytes et de cytokines sériques (IL-6, TNF α , IFN- γ) dans le LCR (252,253) et même de CAR-T dans certains cas(222) (Figure 23). La perturbation endothéliale entraînant cette instabilité vasculaire est associée à une augmentation de marqueurs sériques de la coagulation, notamment une élévation significative de l'angiopoïétine 2 (Ang-2)(251,260) et du facteur von Willebrand. De plus, un ratio [angiopoïétine 2/angiopoïétine 1] très élevé est observé dans les cas de neurotoxicité sévère, sachant que l'angiopoïétine 1 joue un rôle protecteur pour l'endothélium vasculaire (251,260). Par ailleurs, cette instabilité vasculaire peut être exacerbée si une thrombopénie est présente (253), ce qui se manifeste par une agrégation plaquettaire ainsi qu'une liaison du facteur von Willebrand sur de petits capillaires (Figures 22 et 23).

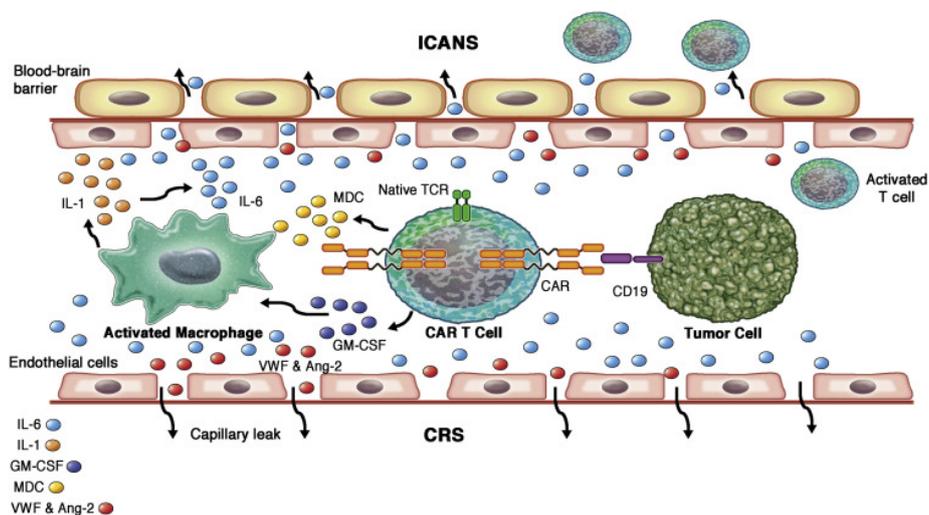


Figure 22 - Pathogénèse couplée du CRS et de l'ICANS (Extraite de Freyer et Porter, *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2020(241)). Après la liaison du CAR-T avec la cellule tumorale, une libération de GM-CSF et de MDCs induit le recrutement des macrophages et des monocytes qui sécréteront de l'IL-1 et l'IL-6. Dans ce contexte inflammatoire, une activation endothéliale est observée après la libération de facteur von Willebrand (VWF) et d'angiopoïétine 2 (Ang-2) ce qui induit une fuite capillaire et une pénétration des cytokines inflammatoires et des leucocytes dans le LCR. Abréviations : CRS, syndrome de relargage de cytokines ; GM-CSF, *Granulocyte macrophage colony-stimulating factor* ; ICANS, *Immune effector cell-associated neurotoxicity syndrome* ; MDC, *Myeloid differentiating chemokines* ; TCR, *T-cell receptor*.

En outre, des résultats *in-vitro* d'incubation de péricytes cérébraux humains (entourant les cellules endothéliales et formant la BHE) avec les cytokines inflammatoires (TNF α , IFN- γ) ont pu également mettre en évidence l'association de production importante de cytokines sériques telles que l'IL-6 mais aussi la sécrétion de VEGF (*vascular endothelial growth factor*) en présence d'IFN- γ induisant un stress des péricytes. En effet, le VEGF favorise l'ouverture de la BHE (261,262) ce qui permet l'infiltration dans le système nerveux central (SNC) des cytokines pro-inflammatoires et d'éléments du système immunitaire, altérant ainsi les astrocytes situés le long de espaces

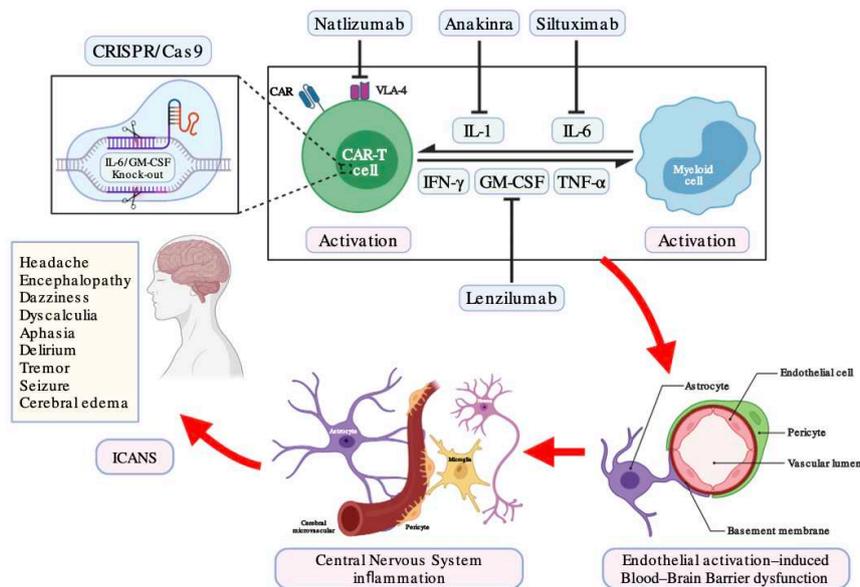


Figure 24 – Synthèse de la pathogénèse de l'ICANS suite à une injection de cellules CAR-T (Extraite de Gu et al., *WIREs Mech Dis*, 2022(264)). Ce schéma montre l'impact symptomatologique de l'ICANS et met en évidence les cibles pouvant être utilisées pour le traiter.

En imagerie (IRM (imagerie par résonance magnétique) ou TDM (tomodensitométrie)), les résultats sont normaux dans la plupart des cas. Certains patients peuvent présenter un effet FLAIR (*Fluid attenuated inversion recovery*) correspondant à des zones d'hyperintensité touchant principalement les thalami bilatéraux et le tronc cérébral (251)(Figure 25). Dans les cas les plus sévères, des microhémorragies par extravasation des globules rouges, destruction de la paroi vasculaire et formation de thrombi multiples localisés sur les petits vaisseaux sanguins peuvent être observés. De surcroît, l'électroencéphalogramme peut montrer un ralentissement diffus chez des patients mais il est principalement utilisé pour exclure une activité épileptique (253).

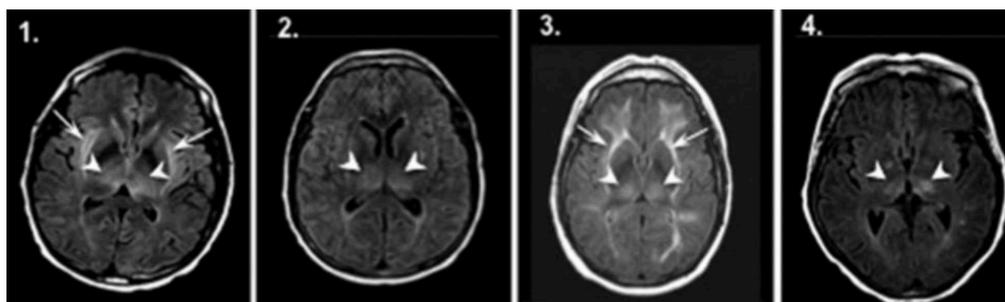


Figure 25 - IRM cérébral de 4 patients avec une neurotoxicité sévère après une injection de cellules CAR-T (Extraite de Santomaso et al., *Cancer Discov*, 2018(251)). Imagerie en coupe axiale montrant l'effet FLAIR au niveau des thalami bilatéraux (désignés par les têtes de flèches). Pour les patients 1 et 3, des signaux d'hyper intensités additionnels ont été observés au niveau de la capsule externe (désignés par les grandes flèches).

Tout comme le CRS, la sévérité de l'ICANS a aussi été gradée de 1 à 4 par l'ASTCT en 2019(242). En 2018, Neelapu et al., a initié la mise en place d'un score objectif permettant le dépistage de la neurotoxicité liée au CAR-T, le CARTOX-10 (*CAR-T-cell-therapy-associated toxicity 10-point neurological assessment*)(256). C'est un score à 10 points, simple d'utilisation, reproductible et répétable plusieurs fois par jour. Il inclue

des éléments du *Mini-Mental State Examination* (MMSE) permettant d'évaluer les compétences cognitives (la personnalité, l'orientation dans l'espace et le temps) mais aussi les capacités de concentration, de parole et d'écriture (242,256). Une version modifiée du CARTOX-10 est aujourd'hui utilisée pour la classification des ICANS par l'ASTCT et est renommée le score ICE (*Immune Effector Cell-Associated Encephalopathy*) avec l'addition d'un meilleur outil de détection des encéphalopathies pour évaluer l'aphasie réceptive observée chez ces patients. L'ASTCT prend également en compte l'évaluation du niveau de conscience, la présence et l'occurrence de symptômes moteurs, de convulsions, de signes d'augmentation de la pression intracrânienne (PIC) et d'œdème cérébral chez ces patients sans ou avec encéphalopathie(222,242). Par ailleurs, l'analyse de la PIC est difficile en clinique et utilise la pression d'ouverture du LCR lors de la ponction lombaire et la présence de papilloedème (242).

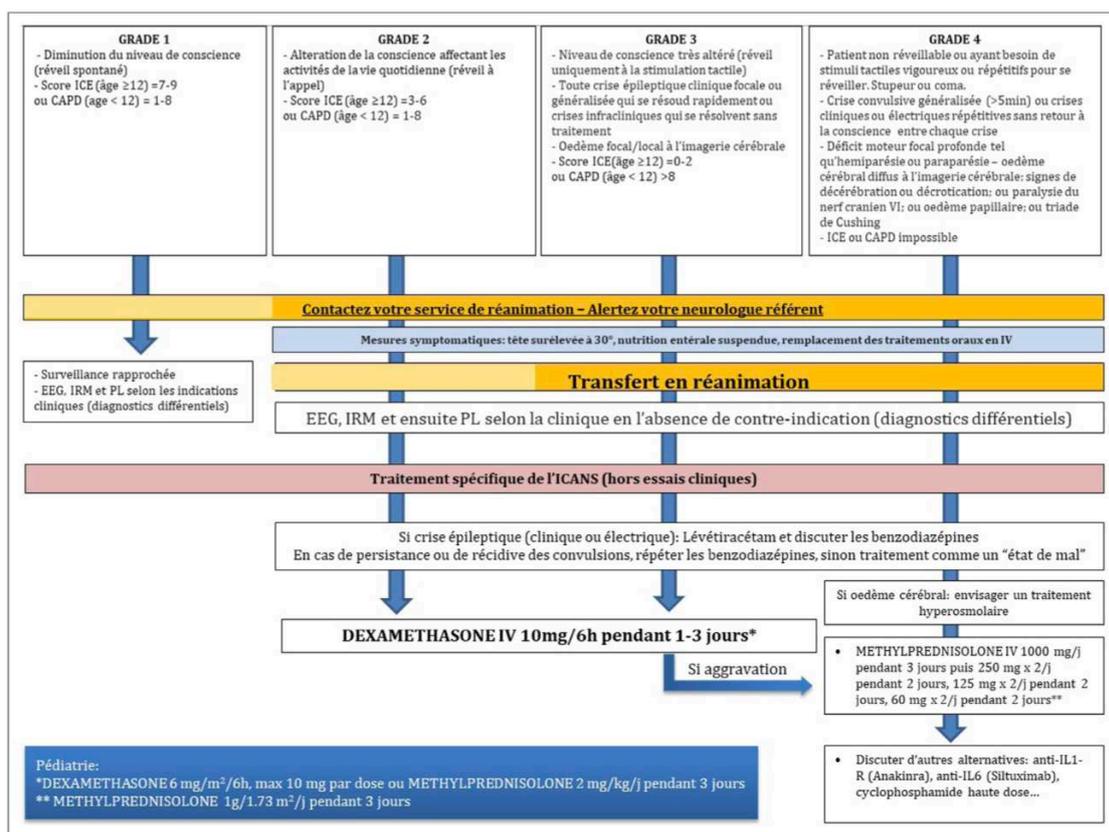


Figure 26 – Prise en charge de l'ICANS en fonction des différents grades de sévérité déterminés par Lee et al., *Biol Bone Marrow Transplant*, 2019(242) (Extraite de Picard et al., *Bull Cancer*, 2023(247)). Abréviations: CAPD, *Cornell Assessment of Pediatric Delirium*; ICANS, *Immune effector cell-associated neurotoxicity syndrome*; ICE, *Immune effector cell encephalopathy*.

La prise en charge de l'ICANS est exposée Figure 26 selon les recommandations de la SFGM-TC. Une première stratégie correspond au traitement symptomatique adapté tel que la position demi-assise ou la mise en place d'un traitement antiépileptique (lévétiracétam par exemple). Puis, les axes suivants montrent l'utilisation principale et

préférentielle de corticostéroïdes aux différents grades (dexaméthasone dès le grade 2 alors qu'en grade 4, la méthylprednisolone en bolus sera préférée). Toutefois, contrairement au CRS, l'utilisation de tocilizumab n'est pas du tout recommandée (237) en raison de sa non-infiltration à travers la BHE pouvant potentiellement majorer le risque de neurotoxicité (251,253). En cas d'ICANS réfractaire, d'autres stratégies thérapeutiques peuvent être envisagées telles que l'anakinra (237,248), le siltuximab mais aussi la chimiothérapie intrathécale (247,269).

c) Diverses complications post-cellules CAR-T

L'injection de cellules CAR-T entraîne également d'autres effets indésirables fréquents tels que l'hypogammaglobulinémie, les infections et les cytopénies.

1. Hypogammaglobulinémie

L'hypogammaglobulinémie est la conséquence de l'aplasie des cellules de la lignée B attendue après traitement par cellules CAR-T (anti-CD19 ou anti-BCMA), ce sont des effets qualifiés « *on-target, off-tumor* ». En effet, les cellules B normales sont également la cible d'attaque des cellules CAR-T via leur expression de CD19 et de BCMA. L'aplasie des cellules de la lignée B peut être considérée comme un paramètre temporel (qui peut perdurer et persister jusqu'à plusieurs années)(216,233)et de pharmacodynamie de la fonctionnalité des cellules CAR-T. Par conséquent, l'hypogammaglobulinémie peut survenir à tout moment et apparaître plus tardivement (> 90 jours après injection de CAR-T). Elle est définie de façon biologique par une quantité faible d'IgG (< 400 mg/dL) et/ou par la nécessité de recourir à une injection en IV d'immunoglobulines au-delà de 90 jours après l'injection des cellules CAR-T (270). Cette complication est plus fréquente chez les enfants en raison de la présence d'un compartiment de plasmocytes plus robustes chez les adultes. La présence d'une hypogammaglobulinémie chez un patient le rend plus susceptible de souffrir d'infections intercurrentes (bactériennes, fongiques ou virales)(271). Après les 6 premiers mois, le critère clinique prime sur la surveillance des patients. Mais pour ceux qui n'avaient pas encore connu d'hypogammaglobulinémie, un suivi semestriel des immunoglobulines (Ig) (les sous-classes d'Ig doivent être suivies annuellement) est préconisé (272). Un traitement de substitution est alors souvent proposé pour pallier cette hypogammaglobulinémie. Cette prise en charge est généralement patient-dépendante en fonction de son statut clinique, sa durée d'aplasie B (> ou non à 6 mois), des infections en cours, de son risque infectieux, de son dosage des sous-classes d'immunoglobulines (déficit ou non) et de ses résultats de séroconversion

après vaccination contre le tétanos, la diphtérie ou le pneumocoque (absence ou présence)(216,272–275).

2. Infections

Les infections post-CAR-T sont fréquentes et de plusieurs natures (bactériennes, fongiques ou virales) bien que les infections bactériennes soient les plus recensées. Les infections des voies respiratoires sont celles qui sont le plus rapportées. La plupart sont bénignes et sont traitées en ambulatoire (270). Les infections surviennent souvent en phase aiguë après l'injection des cellules CAR-T (271,275) (Figure 27). Les facteurs de risque des infections post-CAR-T sont l'hémopathie traitée du patient (LAL), une hypogammaglobulinémie, une aplasie de la lignée cellulaire B, une neutropénie, un nombre important de lignes de traitements antitumorales précédant l'injection de cellules CAR-T (plus il y a de lignes, plus le risque infectieux augmente), une dose élevée de cellules CAR-T injectée ou un CRS sévère (272). Ceci souligne l'importance de la mise en place d'un traitement de prophylaxie adaptée (276). De plus, il est important de connaître le statut infectieux initial du patient pour voir ensuite son évolution et intercepter l'étiologie infectieuse. Ainsi, plusieurs tests et analyses sérologiques sont à effectuer au préalable de l'injection des cellules CAR-T (par exemple herpès, hépatites, virus de l'immunodéficience humaine (VIH)...)(275). Si le patient présente des symptômes infectieux ou de la fièvre, il est recommandé de prélever les échantillons microbiologiques nécessaires pour permettre une identification de l'agent en cause afin de traiter ensuite spécifiquement l'infection. En attendant les résultats des tests, une antibiothérapie probabiliste (ou empirique) basé sur des protocoles locaux des hôpitaux est alors initiée (272).

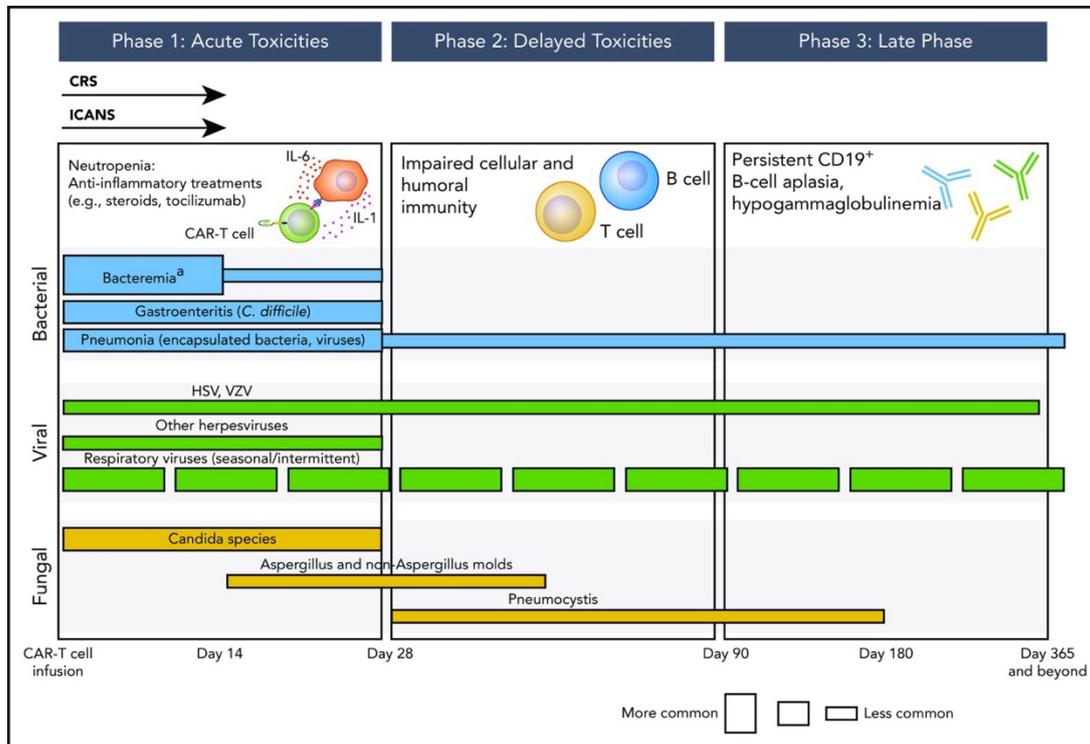


Figure 27 – Frise chronologique d'apparition des infections opportunistes après traitement par cellules CAR-T anti-CD19 (Extraite de Hill and Seo., *Blood*, 2020(275)). ^a, autant d'épisodes bactériens causés par des organismes à gram positif que des organismes à gram négatif.

3. Cytopénies

Les cytopénies sont les complications les plus sévères mais aussi les plus fréquentes après un traitement par cellules CAR-T. Leur apparition mais aussi leur persistance chez les patients traités constituent un intérêt important à considérer et à évaluer en clinique. Ainsi, elles sont redéfinies sous le terme d'ICAHT (*Immune effector cell-associated hematoxicity*) permettant de décrire l'hématotoxicité observée après la réinjection de cellules CAR-T. Après une conférence tenue à Lille pendant 2 jours en mars 2023, des experts de l'EHA (*European Hematology Association*) et de l'EBMT (*European Society for Blood and Marrow Transplantation*) ont statué sur des recommandations de bonnes pratiques pour évaluer et grader cet effet indésirable comme l'ICANS et le CRS (215,277). La classification de l'ICAHT est basée sur la profondeur et la durée de la neutropénie en cours. Deux catégories de cytopénies se distinguent suivant la durée et la survenue de l'ICAHT. L'*early* ICAHT ou cytopénie précoce correspond à une cytopénie qui est apparue au cours des 30 premiers jours après traitement par CAR-T. Et, le *late* ICAHT ou cytopénie tardive représente une cytopénie dont la survenue est observée à partir de 30 jours post-CAR-T (277). Les cytopénies précoces sont les plus évidentes à expliquer car elles sont secondaires à la chimiothérapie (composée classiquement de fludarabine et de cyclophosphamide) administrée pour la lymphodéplétion et réalisée avant l'injection de cellules CAR-T (278). Les cytopénies, en général, seraient de nature biphasique avec une phase

précoce corrélée à la lymphodéplétion puis une deuxième phase tardive apparaissant environ au moins 21 jours après l'administration de CAR-T plutôt liée au contexte pro-inflammatoire du CRS et la présence d'une moelle osseuse de richesse pauvre (279). Les facteurs favorisant la survenue de cytopénies post-CAR-T sont nombreux. Parmi eux, certains sont présents chez le patient avant la lymphodéplétion, comme l'hémopathie pour laquelle le patient est traité (LAL > lymphome)(280), la masse tumorale avant l'administration de cellules CAR-T (281,282)(augmentation des LDH, présence d'un infiltrat tumoral au niveau médullaire), le nombre de lignes de traitements antitumorales précédents cette injection (280), des antécédents de cytopénies (en particulier des thrombopénies)(283), un contexte inflammatoire préexistant (CRP (protéine C réactive) et ferritine augmentées (283) mais aussi une élévation des cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-6 (284)). D'autres facteurs sont dépendants du produit cellulaire injecté. En effet, le domaine de costimulation choisi (CD28 > 4-1BB) ainsi que le type de construction du CAR-T administré (cible double > cible simple) en font partie (279,280). Les derniers facteurs de risque pouvant influencer sur la survenue de cytopénies sont la sévérité du CRS, un taux élevé de marqueurs inflammatoires (279,284,285), les infections concomitantes (virale surtout (286) ou sepsis) et la présence d'un SAM (287).

Un score nommé CAR-HEMATOTOX a été développé pour identifier les patients à bas et à haut risque de développer une hématotoxicité post-CAR-T et est réalisé avant la lymphodéplétion (283). Le score inclue des paramètres liés à la réserve hématopoïétique (tels que le nombre absolu de neutrophiles (ANC), le taux d'hémoglobine et la numération plaquettaire) et des marqueurs de l'inflammation (CRP et ferritine) (Figure 28). Ce score a été validé pour suspecter une neutropénie sévère (< 0.5 G/L) perdurant pendant plus de 14 jours dans les 60 premiers jours après l'injection de cellules CAR-T. Ce score peut être calculé en ligne sur le site de la *German Lymphoma Alliance* : (<https://www.german-lymphoma-alliance.de/Scores.html>). Les cytopénies prédisposent aux infections, par conséquent, ce score peut également détecter les patients à risque de développer des infections sévères (277).

Features	0 Point	1 Point	2 Points
Platelet count	> 175.000/ μ l	75.000 - 175.000/ μ l	< 75.000/ μ l
Absolute neutrophil count (ANC)	> 1200/ μ l	\leq 1200/ μ l	-
Hemoglobin	> 9.0 g/dl	\leq 9.0 g/dl	-
C-reactive protein (CRP)	< 3.0 mg/dl	\geq 3.0 mg/dl	-
Ferritin	< 650 ng/ml	650-2000 ng/ml	> 2000 ng/ml
Low: 0-1 High: \geq2			

Figure 28 - CAR-HEMATOTOX score (Extraite de Rejeski et al., *Blood*, 2023(277), adaptée de Rejeski et al., *Blood*, 2021(283)). Un risque d'hématotoxicité est considéré comme élevé quand le score CAR-HEMATOTOX \geq 2.

L'ICAHT est une complication importante à considérer. En effet, cet effet indésirable aurait un réel impact clinique car les patients présentant une cytopénie prolongée auraient une survie globale significativement plus courte que ceux sans (survie évaluée à 28 mois avec cytopénie prolongée vs. non atteinte sans cytopénie, *p-value* = 0.048)(288). Cependant, la pathogénèse de l'ICAHT serait multifactorielle (289) et la compréhension du mécanisme physiopathologique sous-jacent demeure encore obscure. Certaines pistes sont explorées et détaillées Figure 29 pouvant expliquer la survenue de cytopénies tardives. Tout d'abord, Kitamura et al. ont mis en évidence une concentration faible de cellules CD271+ au niveau médullaire avant injection de CAR-T associée à une altération de la niche hématopoïétique (290). Une hypothèse possible serait une transmigration des cellules CAR-T vers les cellules cibles à l'intérieur de la moelle osseuse formant une hyperinflammation locale et une sécrétion de cytokines à proximité des cellules progénitrices hématopoïétiques. Cela entraînerait des cytopénies prolongées via des perturbations du microenvironnement médullaire (215). Ensuite, l'acquisition de variations génétiques somatiques en raison entre autres de l'âge et de la chimiothérapie antérieure peut favoriser le développement d'une hématopoïèse clonale de potentiel indéterminé (CHIP ou *clonal hematopoiesis of indeterminate potential*), amplifiant la réponse inflammatoire de l'hôte aux cellules CAR-T (215). Par ailleurs, un CRS sévère et la présence de marqueurs de l'inflammation (IFN- γ et pic d'IL-6 (284)) seraient également impliqués dans le développement d'hématotoxicité sévère. Mais, les patients en aplasie peuvent également montrer une altération de l'endothélium (augmentation d'Ang-2), la présence d'inhibiteurs de lymphocytes T (*PD-L2* ou *Gal-9*) responsables d'une dysrégulation immunitaire suppressive des lymphocytes T et l'élévation au niveau sérique de marqueurs d'activation des macrophages (IL-15, IL-18 et MCP-1 (*monocyte chemoattractant protein 1*) par exemple)(291). Enfin, il a été observé une population assez importante dans la moelle osseuse de lymphocytes T CD8+ CX3CR1^{high} exprimant fortement les gènes liés à la production d'IFN- γ et à la signalisation des cytokines (résistants à la chimiothérapie de lymphodéplétion et qui se développeraient de manière clonale dans un contexte inflammatoire)(288). Toutefois, le taux de SDF-1 (*stromal cell-derived factor 1*), la chimiokine entre autres essentielle au développement des cellules B, est perturbé chez les patients présentant une cytopénie prolongée (279) due à une possible récupération précoce des cellules B post-cellules CAR-T réduisant la sortie des neutrophiles de la moelle osseuse. En outre l'association entre les cellules CAR-T et la neutropénie a été liée à l'expansion clonale des lymphocytes T probablement en raison d'interactions cellulaires T et B diminuées, L'analyse

transcriptomique du TCR d'un patient avec une insuffisance médullaire acquise post-cellules CAR-T a montré une expansion oligoclonale des cellules T, en particulier des cellules T CD8+ CD57+, ainsi qu'une transition d'une utilisation multiclonale du TCR vers un profil oligoclonal (215).

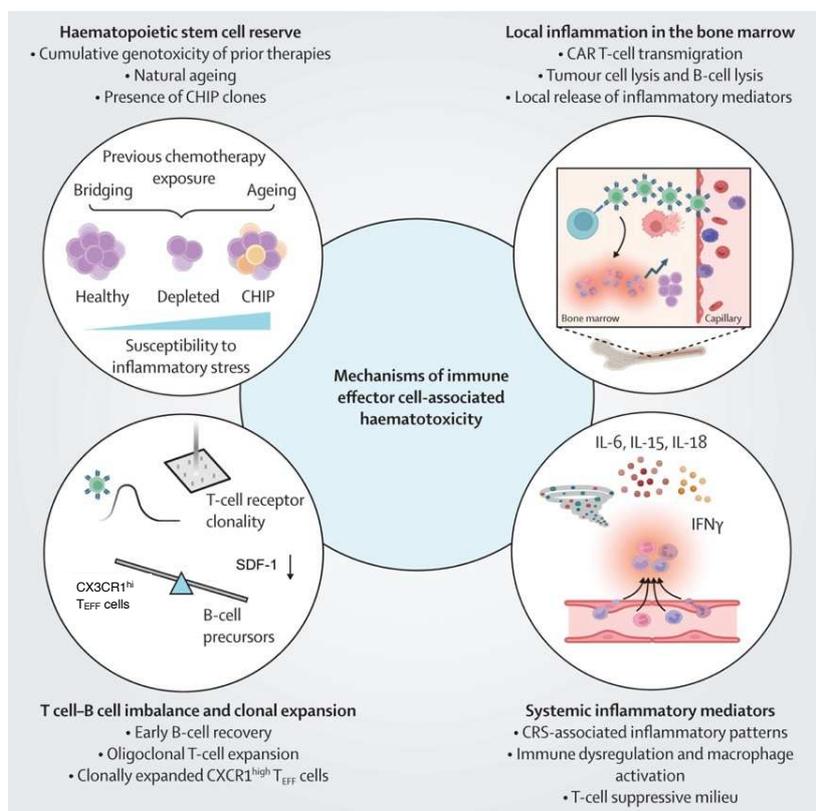


Figure 29 - Mécanismes possibles de la pathogénèse de l'ICAHT (Extraite de Rejeski et al., *Lancet Haematol*, 2024(215)) Abréviations : CAR, *chimeric antigen receptor* ; CHIP, *clonal haematopoiesis of indeterminate potential* ; CRS, syndrome de relargage cytokinique ; CX3CR1^{hi}, *high gene expression of CX3CR1* ; ICAHT, *immune effector cell-associated haematotoxicity* ; T_{EFF}, lymphocyte T effecteur

Par ailleurs, des étiologies différentielles d'ICAHT prolongées sont possibles. Par conséquent, des examens complémentaires doivent être réalisés pour les exclure et confirmer le diagnostic d'ICAHT (292). Si suspicion d'une cause médullaire sous-jacente de ces cytopénies, un myélogramme devra être réalisé pour faire des analyses cytologique, d'immunophénotypage, de cytogénétique et de biologie moléculaire. En effet, quelques cas de SMD ou d'autres néoplasmes myéloïdes (LAM par exemple) ou de leucémie à grands lymphocytes à grains (LGL) ont été rapportés (278,293). Cependant, les CHIPs (294) sont possiblement associées à l'étiologie immuno-médiée des cytopénies donc dans certains cas, il ne faut pas les compter comme diagnostic différentiel (292). Ensuite, les cytopénies auto-immunes, le SAM, les pathologies infectieuses sous-jacentes, les carences vitaminiques et les causes toxiques médicamenteuses sont des causes possibles de cytopénies prolongées et doivent être exclues pour poser le diagnostic d'ICAHT. Les examens complémentaires à réaliser en conséquence sont résumés Table 16 (292).

Étiologies différentielles	Examens complémentaires
Hémopathies myéloïdes, cytopénie à signification indéterminée, et infiltration médullaire	Myélogramme : - Immunophénotypage, - Cytogénétique, - Biologie moléculaire
Cytopénie auto-immune	- Bilan d'hémolyse - Test de Coombs - Dosage d'anticorps anti-plaquettes - Dosage d'anticorps anti-granuleux - Dosage d'agglutinines froides
Syndrome d'activation macrophagique	- Dosage des triglycérides - Dosage de la ferritine - Myélogramme
Pathologies infectieuses sous-jacentes (virales surtout)	PCR virales sanguines (CMV, EBV, HHV-6, adénovirus, parvovirus B19)
Carences vitaminiques	Vitamines B6, B9, B12
Causes toxiques médicamenteuses	Dosage de médicaments possiblement responsables

Table 16 – Diagnostic différentiel des ICAHT et les examens complémentaires à réaliser en conséquence (Adaptée d'Alsuliman et al., *Bull Cancer*, 2024(292))

La prise en charge des cytopénies précoces est différente de celle des cytopénies tardives.

Le traitement des cytopénies précoces est symptomatique et basé principalement sur des transfusions de concentrés plaquettaires et de culots érythrocytaires. Le facteur de croissance granulocytaire (G-CSF) est utilisé soit en prophylaxie, soit dans les cas de neutropénies sévères (ANC < 0.5 G/L) avec ou sans complications infectieuses. Une prophylaxie antivirale (via valaciclovir ou aciclovir) et anti-pneumocystose (par cotrimoxazole) est prescrite pour tous les patients mais une prophylaxie antibactérienne et antifongique systémique seulement en cas de neutropénie sévère (277). Le traitement des cytopénies tardives doit se référer aux résultats de l'analyse du myélogramme pour ne pas passer à côté d'une hémopathie causale. Des agonistes de la thrombopoïétine, de l'érythropoïétine (293) ou du G-CSF peuvent être administrés dans ces cas de cytopénies tardives. Les patients non-répondeurs et/ou réfractaires au G-CSF 14 jours après l'injection de cellules CAR-T peuvent se voir administrer un *boost* de CSH préalablement cryoconservées (auto- ou allo-CSH). Si toutes les options sont récusées ou le grade 4 d'ICAHT persiste plus de 30 jours après l'injection de cellules CAR-T, il est recommandé d'initier une recherche de donneur en vue d'une allogreffe de CSH (Figure 30)(277).

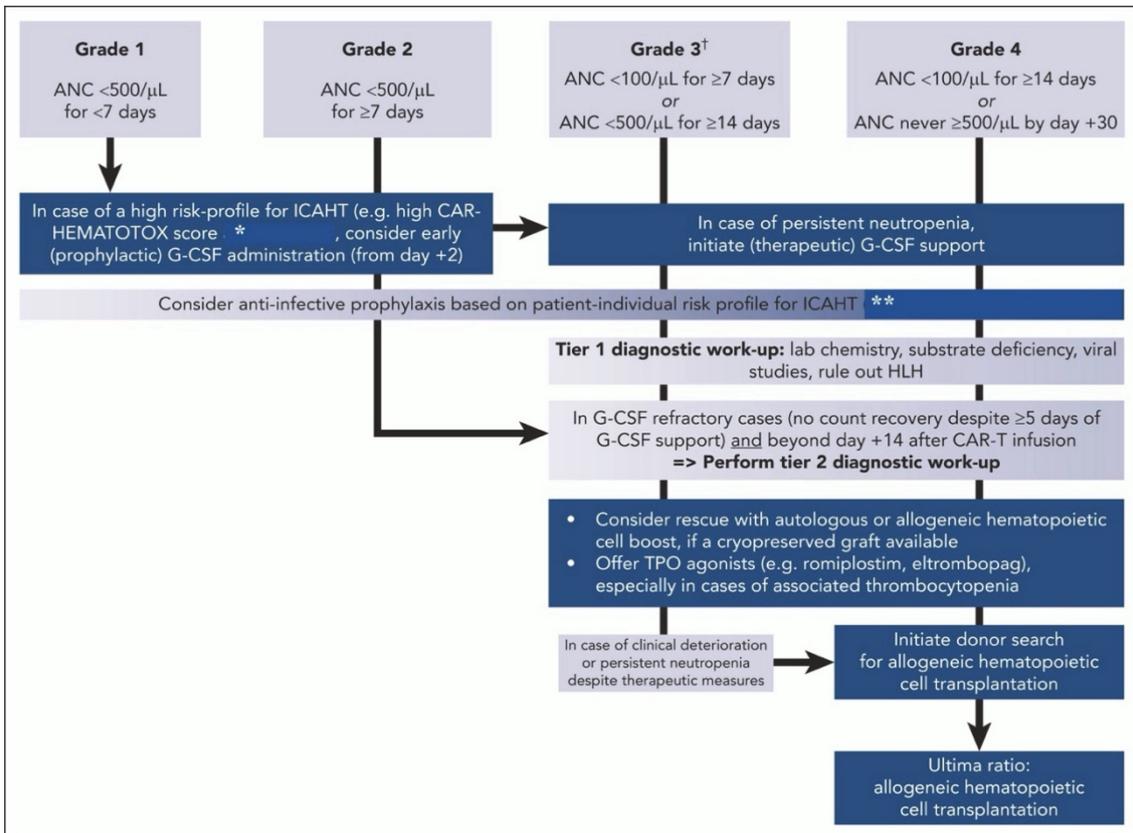


Figure 30 - Algorithme de traitement des ICAHT (Extraite de Rejeski et al., *Blood*, 2023(277)).

*Les patients à haut risque sont définis par leurs antécédents d'allo ou autogreffe de cellules souches hématopoïétiques, leur cytopénie de base, la charge tumorale importante, leur état inflammatoire systémique et la présence d'une infiltration de la moelle osseuse. **Prophylaxie antifongique particulièrement recommandée pour les patients avec des antécédents fongiques, d'allogreffe de CSH et sous corticostéroïdes à long terme ou à fortes doses. La décision d'une prophylaxie antibactérienne devrait intégrer la composante de l'épidémiologie locale (par exemple la prévalence des bactéries gram négatif multirésistantes) mais n'est pas recommandée pour les patients à faible risque d'ICAHT. †S'applique également aux ICAHT tardives si les critères coordonnent. Abréviations : ANC, Nombre absolu de neutrophiles ; G-CSF, *Granulocyte colony-stimulating factor*; ICAHT, *Immune effector cell-associated hematoxicity*; TPO, thrombopoïétine

Une figure de synthèse concernant l'ICAHT après une injection de cellules CAR-T est présentée Figure 31.

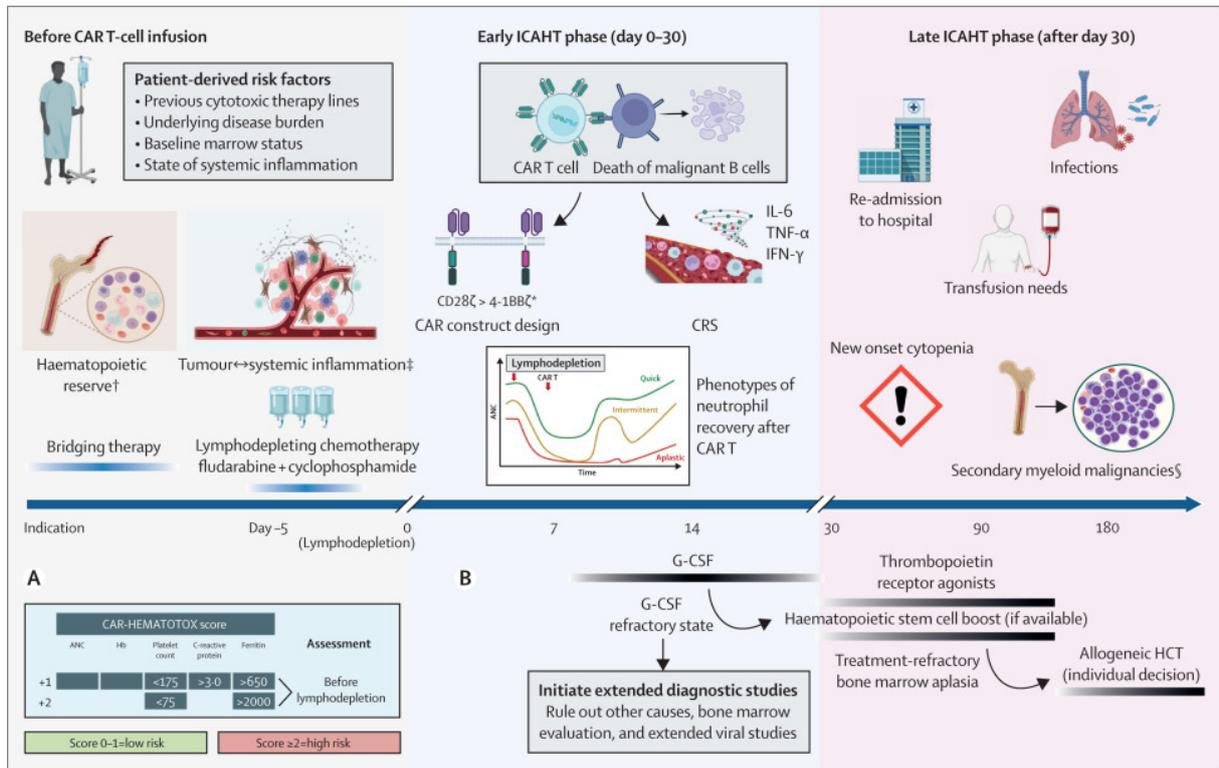


Figure 31 - ICAHT au cours du temps après injection de cellules CAR-T (Extraite de Rejeski et al., *Lancet Haematol*, 2024(215)) Abréviations : ANC, nombre absolu de neutrophiles ; CAR, *chimeric antigen receptor* ; CRP, protéine C réactive ; CRS, syndrome de relargage cytokinique ; Hb, hémoglobine ; HCT, *haematopoietic cell transplantation* ; ICAHT, *immune effector cell-associated haematotoxicity* ; G-CSF, *granulocyte colony-stimulating factor*.

4. Syndrome d'activation macrophagique

Le SAM est un effet indésirable pouvant également survenir post-CAR-T mais reste moins fréquent que les autres complications citées précédemment. Toutefois, le SAM représente un effet secondaire sous-diagnostiqué et est associé à un risque de surmortalité (250). Il s'agit d'une réaction inflammatoire systémique déclenchée par l'activation démesurée des macrophages sécrétant de façon exacerbée des cytokines pro-inflammatoires. Les principaux symptômes sont aspécifiques et communs à d'autres syndromes comme le sepsis ou le CRS. Les patients présentent principalement une fièvre mais il est également possible d'observer une hépatosplénomégalie et certaines dysfonctions d'organes. Il est alors difficile de rendre un diagnostic. La réalisation d'un myélogramme est ainsi fortement recommandée pour rechercher une hémophagocytose (243). La prise en charge du SAM est la même qu'évoquée précédemment lorsqu'il est associé au CRS (Figure 21).

d) Complications hématologiques post-cellules CAR-T

La thérapie par cellules CAR-T peut induire l'apparition d'hémapathies. La survenue de CHIP, de pathologies myéloïdes (SMD ou LAM) ou de lymphomes à cellules CAR-T est possible et est très redoutée. En novembre 2023, la FDA annonce une enquête sur plusieurs cas signalés de tumeurs malignes à cellules T secondaires (lymphomes

CAR-positifs inclus) chez des patients traités par cellules CAR-T (295). La FDA a alors exigé, en janvier 2024, aux fabricants de cellules CAR-T d'ajouter une mention spéciale de sécurité avertissant les patients et l'équipe médicale du risque d'apparition de tumeurs malignes secondaires post-cellules CAR-T, bien que le lien de causalité n'ait pas encore été démontré.

1. Cancérisation des cellules CAR-T

En novembre 2023, la FDA lance un signalement national qui fait l'effet d'une bombe dans le milieu pharmaceutique et de l'hématologie au sujet de cas de tumeurs malignes à cellules T secondaires à une injection de cellules CAR-T. Une investigation à la recherche de ces cas démarre. En effet, dans un premier temps, une hypothèse est émise concernant l'intégration du vecteur viral au niveau d'un proto-oncogène et la possibilité de développer un cancer post-CAR-T (218). Deux cas de lymphomes à cellules CAR-T ont été décrits en 2021 suite à une administration de cellules CAR-T allogéniques anti-CD19 produites avec le système à transposon et non viral *piggyBac* (296). Ces patients ont montré un nombre important de copies du transgène mais sans insertion typique oncogène. Par ailleurs, un des deux patients est décédé (297). Ces résultats soulignent la nécessité d'une prudence et d'un suivi régulier des patients traités par cellules CAR-T, en particulier lorsque de nouvelles méthodes de transfert de gènes sont utilisées en production. Dans un second temps, l'administration de cellules CAR-T modulerait le micro-environnement tumoral et de nouvelles anomalies génétiques et cytologiques apparaîtraient, ce qui favoriserait l'apparition de lymphome T à CAR+. Un premier cas de lymphome par des CAR-T commerciaux a été publié en novembre 2023, décrivant un cas de lymphome T survenu 5 mois après une injection de ciltacabtagene autoleucel (Carvykti®). Plus de 90% des cellules de la biopsie des ganglions lymphoïdes sont CAR+. D'ailleurs, une nouvelle expansion des cellules CAR-T était observée 162 jours après l'injection, indépendamment de l'antigène BCMA. Une insertion dominante dans le 3'UTR (*untranslated regions*) de *PBX2* du CAR provenant de la biopsie suggère une certaine monoclonalité tumorale mais son rôle contributif reste flou. Cependant, le séquençage de l'exome entier à partir de la biopsie a révélé une variation génétique de perte de fonction au niveau du gène *TET2* sans rapport avec l'insertion du CAR, ni du gène *PBX2* (298). Un deuxième cas de lymphome T a ensuite été publié mais cette fois après une thérapie par cellules CAR-T anti-CD19 et plus précisément axicabtagene ciloleucel (Yescarta®) présentant un variant de signification indéterminée du gène *JAK3* et un phénotype CD8+. Toutefois,

l'implication d'une intégration du transgène CAR dans ce lymphome reste incertaine (299).

D'autres mécanismes sous-jacents de la thérapie par cellules CAR-T pourraient expliquer les cancers secondaires à cellules T. Zhou et al. évoquent une première hypothèse où les cellules CAR-T seraient directement ou indirectement impliquées dans le processus d'oncogenèse (300). Pour cette hypothèse, deux mécanismes sous-jacents peuvent être en cause. Le premier consiste en la mutagenèse par insertion qui évoque la transduction virale aléatoire dans le génome des cellules T du patient et qui peut entraîner la prolifération incontrôlée de cellules cancéreuses (par exemple, si l'insertion est faite à proximité d'un gène favorisant la tumorigénèse)(300). Le deuxième concerne l'inflammation provoquée par des taux élevés de cytokines après injection de cellules CAR-T, ce qui favoriserait le développement potentiel de cellules tumorales (301,302). Zhou et al. émettent une deuxième hypothèse suggérant que l'incidence des tumeurs à cellules T n'est pas significativement associée à la thérapie par cellules CAR-T (300). Cela pourrait s'expliquer en partie par une prédisposition à une malignité secondaire créée par les traitements antitumoraux administrés avant les cellules CAR-T. Un *pool* de cellules pré-malignes aurait été formé et par l'immunosuppression consécutive de la thérapie par cellules CAR-T, cela favoriserait leur transformation en cellules cancéreuses (303). Le processus de développement tumoral reste encore peu clair. En effet, Steffin et al. ont analysé une cohorte de plus de 300 patients et 11 auraient développé un cancer secondaire dont la biopsie révélait l'absence du transgène CAR au niveau de la tumeur (304). Ghilardi et al ont également réalisé une étude retrospective de leur cohorte de patients traités par CAR-T et sur une durée de suivi de 5 ans, et le risque de développer une tumeur secondaire a été estimé à 17.0% avec un CAR-T commercial. Dans l'analyse multivariée effectuée comprenant l'âge, le sexe, le nombre de lignes de chimiothérapies antérieures, le produit CAR-T utilisé, le domaine de costimulation, une précédente autogreffe de CSH ; le seul paramètre significatif qui ressortait était l'âge à plus de 65 ans. Ceci montre ainsi une certaine influence de l'âge sur la survenue de lymphomes T après l'administration de cellules CAR-T (299). La présence d'une prédisposition génétique via des variations germinales pourrait également accentuer le développement d'une tumeur secondaire mais ce n'est pas cellules CAR-T dépendant(300). De plus, d'autres facteurs indépendants de l'injection de CAR-T peuvent être associés à la survenue de ces syndrome néoplasiques secondaires notamment la chimiothérapie de lymphodéplétion (fludarabine (305,306) et cyclophosphamide principalement), les traitements anti-tumoraux précédents

l'injection de CAR-T (la thérapie de *bridging* que certains patients peuvent recevoir en attendant les cellules CAR-T, la chimiothérapie, la radiothérapie) et le statut réfractaire, agressif et avancé de la maladie traitée. Tous ces facteurs peuvent créer un environnement immunitaire très perturbé favorisant une génotoxicité par des cassures de brins d'ADN par exemple favorisant le développement de cancers secondaires à un traitement (300). Par conséquent, il est effectivement difficile d'établir le lien de causalité des cellules CAR-T avec la survenue de lymphome à cellules T.

Toutefois, la FDA serait au courant d'environ 20 cas de tumeurs malignes à cellules T chez des patients préalablement traités par cellules CAR-T (307). Cependant, cela représenterait 20 cas parmi des dizaines de milliers de patients traités (303). En mars 2024, 33 cas de lymphomes ont été rapportés pour 33 000 patients traités (303) et 13 hémopathies malignes à cellules T par axicabtagene ciloleucel (Yescarta®)(308) dont la survenue médiane de lymphome T a été estimée à un peu plus d'1 an après injection (308). Néanmoins, deux cas anecdotiques d'expansion clonale associée aux cellules CAR-T dus à l'intégration d'un transgène via un vecteur lentiviral ont déjà été publiés dans la littérature ; l'un impliquant une insertion dans le gène *TET2* (309) et le deuxième dans le gène *CBL* (310). Cette expansion clonale, dans les deux cas, était cliniquement apparente.

Ainsi, toute lésion suspecte post-cellules CAR-T doit être biopsiée pour évaluer la recherche de cellules T malignes puis signalée et analysée pour évaluer la présence du transgène, effectuer des tests de clonalité et d'intégration du CAR (307). D'autres analyses pourraient par exemple être réalisées comme le séquençage du génome entier de la biopsie maligne et le produit de la leucaphérèse non manipulée.

2. *Hématopoïèse clonale, CHIP, SMD, LAM*

L'apparition d'hémopathies malignes myéloïdes peut être due à l'acquisition de variations génétiques pathogènes spécifiques responsables d'une hématopoïèse clonale. Cette hématopoïèse clonale est définie de telle sorte qu'une fréquence d'allèles variants (VAF) est supérieure à 2% dans le sang périphérique (311). Elle correspond à la surreprésentation de cellules sanguines issues d'un seul et même clone pouvant être à l'origine notamment de néoplasmes myéloïdes. Les CHIPs sont déterminées par la présence de ces variations génétiques somatiques associées aux hémopathies malignes en l'absence de critère diagnostique prouvant une hémopathie maligne sous-jacente. De plus, une CHIP est caractérisée par une absence de cytopénie, de dysplasie de moelle osseuse et par un pourcentage de blastes inférieur à 5% (311). Par ailleurs, l'hématopoïèse clonale est un phénomène lié à l'âge et est

même observée chez des personnes en bonne santé. Par conséquent, même si des variations génétiques ont été détectées, il faut interpréter avec précaution ces résultats en l'absence d'anomalies cytologiques dans le sang ou la moelle (312). Toutefois, les SMD et les LAMs sont classés comme des hémopathies malignes d'origine myéloïde par l'OMS nécessitant la mise en place d'un traitement à la différence des CHIPs (311). Certains auteurs ont pu montrer que des patients avant injection pouvaient fréquemment présenter une CHIP avant injection de cellules CAR-T (294,313). Des variations au niveau des gènes *DNMT3A*, *TET2*, *TP53*, *PPM1D* et *ASXL1* sont les plus communément retrouvées. Certains d'entre eux (*TET2*, *DNMT3A* et *ASXL1*) ont même été impliqués dans une neurotoxicité accrue chez des patients atteints de lymphomes ayant reçu des CAR-T anti-CD19. Mais des analyses plus approfondies devront être menées pour conclure d'un possible impact de l'hématopoïèse clonale sur la toxicité liée aux cellules CAR-T (314). De même, la présence antérieure d'une CHIP était associée avec un taux élevé de réponse complète mais également avec l'apparition d'un CRS sévère chez des patients âgés de moins de 60 ans (313). Une étude menée par Saini et al. a montré qu'une incidence cumulative après 24 mois d'une néoplasie myéloïde liée à une thérapie suivant une injection de cellules CAR-T était significativement différente chez les patients présentant une CHIP préalablement (19% vs. 4.2%, *p-value* = 0.028)(314). Cependant, aucune différence significative a été mise en évidence sur les taux de réponses (globales et complètes) et sur les résultats de survie (sans progression et globale) pour cette même cohorte entre les patients présentant une CHIP ou non (314). Une cohorte plus importante et des analyses plus détaillées sont requises pour comprendre les mécanismes biologiques sous-jacents par lesquels la CHIP pourrait affecter les toxicités liées au système immunitaire et associées aux cellules CAR-T.

De rares cas de LAM et de SMD ont été rapportés après une injection de cellules CAR-T anti-CD19 (182,315–318) et anti-BCMA (162,208,319). Une étude de Vainstein et al. accentue le fait que l'apparition d'hémopathies malignes après l'injection de cellules CAR-T chez des patients atteints de myélome multiple serait plutôt associée à une prolifération de clones malins myéloïdes préexistants qu'à un développement *de novo* par les cellules CAR-T (320).

F) L'utilisation des cellules CAR-T au CHU de Lille

a) Les essais cliniques en cours

Les cellules CAR-T constituent aujourd'hui un médicament de thérapie innovante utilisé dans le monde entier. Au 1^{er} juillet 2024, près de 1652 essais cliniques dans toutes les régions du Monde sont inscrits dans la base de données *ClinicalTrials.gov* (321). Leur sujet ou les participants de l'étude sont en lien avec les cellules CAR-T. Les Etats-Unis et la Chine sont les deux pays où le nombre d'essais cliniques avec cellules CAR-T est supérieur à 100 (Figure 32 et Table 17). L'Europe se situe en bonne position car plusieurs pays dont la France comptent entre 50 et 100 essais cliniques avec des CAR-T.

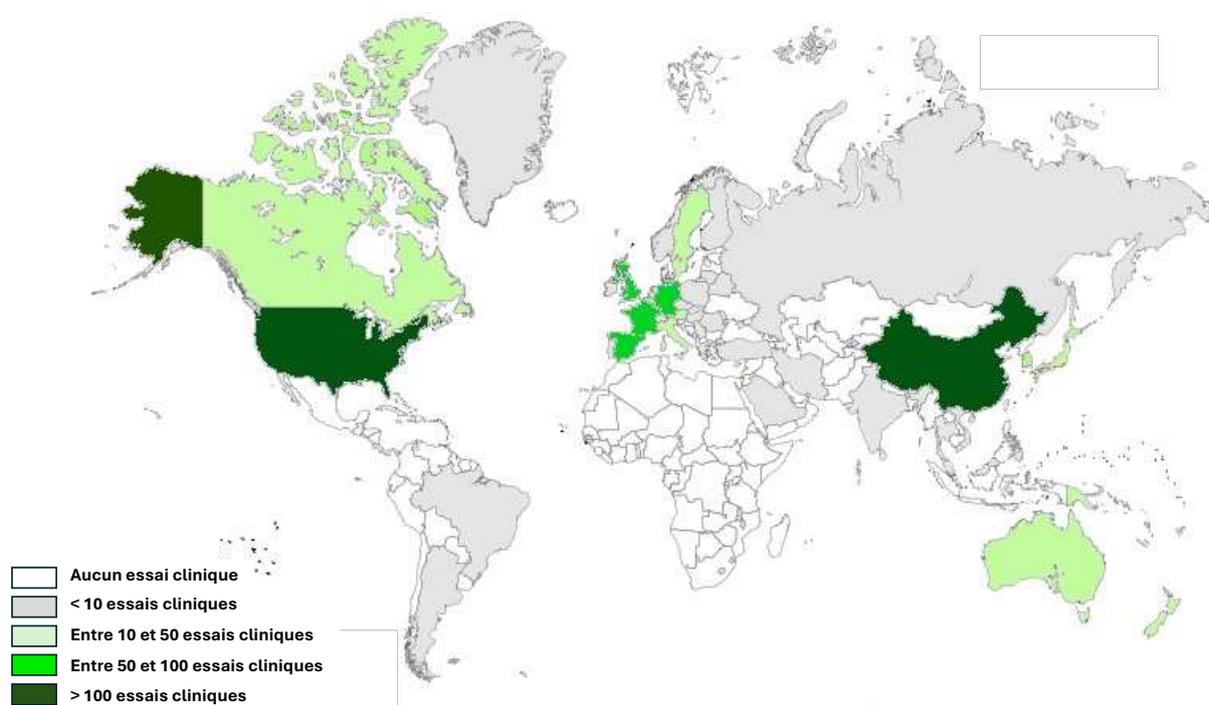


Figure 32 - Carte du monde avec les essais cliniques qui font participer les cellules CAR-T (Réalisée à partir de Biorender®)

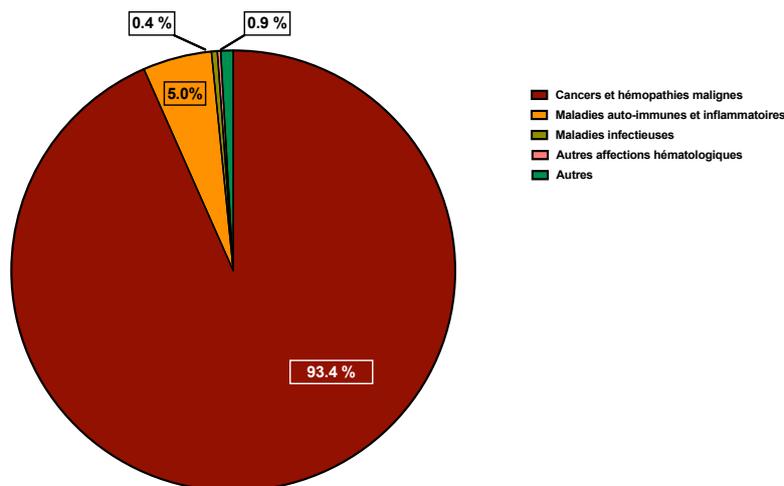
Lieux de l'essai clinique - n essais cliniques (%) (N essais cliniques = 1652)	
<i>Amérique - n essais cliniques (%)</i>	527 ()
Américaine du Nord (Etats-Unis et Canada)	5 (0.3)
Brésil	2 (0.1)
Canada	9 (0.5)
Etats-Unis	511 (30.9)
<i>Asie - n essais cliniques (%)</i>	918 (55.6)
Chine	880 (53.5)
Corée du Sud	6 (0.4)
Inde	1 (0.1)
Iran	1 (0.1)
Israël	7 (0.4)
Japon	3 (0.2)
Malaisie	2 (0.1)
Russie	2 (0.1)
Singapour	6 (0.4)
Taiwan	6 (0.4)
Thaïlande	2 (0.1)
Turquie	1 (0.1)
Vietnam	1 (0.1)
<i>Europe - n essais cliniques (%)</i>	115 (7.0)
Allemagne	16 (1.0)
Belgique	2 (0.1)
Biélorussie	1 (0.1)
Espagne	11 (0.7)
Européenne (Plusieurs pays européens collaborant)	14 (0.8)
France	19 (1.2)
Italie	19 (1.2)
Norvège	1 (0.1)
Pays-Bas	2 (0.1)
République Tchèque	1 (0.1)
Royaume-Uni	22 (1.3)
Slovaquie	1 (0.1)
Suède	3 (0.2)
Suisse	3 (0.2)
<i>Internationale (Collaboration avec plusieurs pays de continents différents) - n essais cliniques (%)</i>	73 (4.4)
<i>Océanie - n essais cliniques (%)</i>	9 (0.5)
Australie	7 (0.4)
Nouvelle-Zélande	2 (0.1)
<i>Inconnue - n essais cliniques (%)</i>	11 (0.7)

Table 17 - Lieux des différents essais cliniques dans le Monde (D'après *ClinicalTrials*(321))

En 2024, la principale indication clinique de ces études avec des CAR-T concerne des hémopathies malignes (69.3%), touchant principalement la lignée lymphocytaire B (Table 18). Cependant, avec le développement des technologies de production des CAR-T, des essais cliniques portent aujourd'hui sur diverses indications avec de nouvelles cibles. En effet, les essais sur les cancers (cancer colorectal, du sein, du pancréas...) représentent la deuxième indication des études cliniques sur les cellules CAR-T (23.6%). De plus, une indication devient de plus en plus au cœur des essais cliniques avec 83 (5.0%) essais inscrits sur la base *ClinicalTrials*. Il s'agit des maladies auto-immunes et inflammatoires (Figure 33), et en particulier le lupus érythémateux systémique (LES) (n = 32). En effet, les premiers résultats dans le traitement des maladies auto-immunes et en particulier le LES sont très concluants, montrant une efficacité et une sécurité des CAR-T utilisés pour les patients traités (322,323) (Table 18).

Indications des CAR-T - n essais cliniques (%) (N essais cliniques = 1652)	
Cancers et hémopathies malignes- n essais cliniques (%)	1543 (93.4)
Cancers - n essais cliniques (%)	390 (23.6)
Hémopathies malignes - n essais cliniques (%)	1145 (69.3)
Les deux indications ensemble (Cancers et hémopathies malignes) - n essais cliniques (%)	8 (0.5)
Maladies auto-immunes et inflammatoires - n essais cliniques (%)	83 (5.0)
Anémie hémolytique auto-immune - n essais cliniques (%)	2 (0.1)
Dermatomyosite et myosite - n essais cliniques (%)	2 (0.1)
Toutes maladies auto-immunes confondues - n essais cliniques (%)	21 (1.3)
Lupus érythémateux systémique - n essais cliniques (%)	32 (1.9)
Maladies auto-immunes rares. - n essais cliniques (%)	1 (0.1)
Maladies inflammatoires chroniques dermatologiques - n essais cliniques (%)	1 (0.1)
Maladies inflammatoires du système nerveux central - n essais cliniques (%)	4 (0.2)
Myasthénies auto-immunes - n essais cliniques (%)	7 (0.4)
Polyarthrite rhumatoïde - n essais cliniques (%)	1 (0.1)
Purpura thrombocytopénique idiopathique - n essais cliniques (%)	2 (0.1)
Sclérodémie systémique - n essais cliniques (%)	4 (0.2)
Sclérose en plaques - n essais cliniques (%)	4 (0.2)
Syndrome de Sjogren - n essais cliniques (%)	1 (0.1)
Vascularites à ANCA - n essais cliniques (%)	1 (0.1)
Maladies infectieuses - n essais cliniques (%)	7 (0.4)
Infection par le VIH-1 - n essais cliniques (%)	7 (0.4)
Autres affections hématologiques - n essais cliniques (%)	4 (0.2)
Amylose AL - n essais cliniques (%)	2 (0.1)
Histiocytose langerhansienne - n essais cliniques (%)	1 (0.1)
Drépanocytose - n essais cliniques (%)	1 (0.1)
Autres - n essais cliniques (%)	15 (0.9)
Développement de produits thérapeutiques cellulaires - n essais cliniques (%)	1 (0.1)
Diminution de cPRA chez les greffés rénaux - n essais cliniques (%)	1 (0.1)
Inconnues - n essais cliniques (%)	1 (0.1)
Patients traités par Cellules CAR-T - n essais cliniques (%)	11 (0.7)
Prévention de rejet chez les greffés hépatiques - n essais cliniques (%)	1 (0.1)

Table 18 - Indications pour lesquelles les cellules CAR-T sont inscrits dans des essais cliniques dans le Monde (D'après *ClinicalTrials*(321))



N essais cliniques total =1652

Figure 33 - Répartition des indications des essais cliniques sur les CAR-T (D'après *ClinicalTrials*(321) et réalisé à l'aide de GraphPad Prism 10® (version 10.3.1))

94.6% des essais cliniques sont de nature interventionnelle montrant ainsi l'engouement mondial pour cette nouvelle thérapie innovante que constituent les cellules CAR-T et ainsi permettre aux patients de bénéficier de plus en plus de ce traitement. Cependant, la plupart des essais cliniques ne sont pas encore approuvés pour la commercialisation. Seulement 2 essais le sont (un pour les DLBCL réfractaires et/ou récidivants et l'autre pour les lymphomes du manteau réfractaires et/ou récidivants). La majorité est en cours de recrutement (42.9%) mais près de 300 essais ne sont pas prêts à recruter bien que 148 sont actifs. Néanmoins 126 études sont

complètes avec des indications variées (VIH, cancers, neuroblastomes, hémopathies malignes des cellules lymphoïdes B...) mais ne sont pas encore approuvées pour permettre la commercialisation de leur produit CAR-T (Table 19).

Caractéristiques des essais cliniques (N essais cliniques = 1652)	
Statut de l'essai clinique - n essais cliniques (%)	
Actif mais ne recrute pas	148 (9.0)
Approuvé pour la commercialisation	2 (0.1)
Complété	126 (7.6)
Disponible	5 (0.3)
En cours de recrutement	709 (42.9)
Inconnu	365 (22.1)
Inscription par invitation	16 (1.0)
Pas encore en train de recruter	152 (9.2)
Plus du tout disponible	3 (0.2)
Retiré	49 (3.0)
Suspendu	10 (0.6)
Terminé	67 (4.1)
Type d'étude - n essais cliniques (%)	
Accès étendu	10 (0.6)
Interventionnel	1563 (94.6)
Observationnel	79 (4.8)

Table 19 - Caractéristiques des essais cliniques dans le Monde (D'après *ClinicalTrials*(321))

La France est en 3^{ème} position mondiale en tant que pays participant à des études impliquant des cellules CAR-T, derrière la Chine et les Etats-Unis (Figure 34 et Table 17). Ainsi, la France est le premier pays d'Europe où les essais cliniques sur les CAR-T sont nombreux. On peut remarquer que la France développe des études nationales mais aussi participe dans la grande majorité à des essais cliniques à l'échelle internationale (Figures 34 et 35).

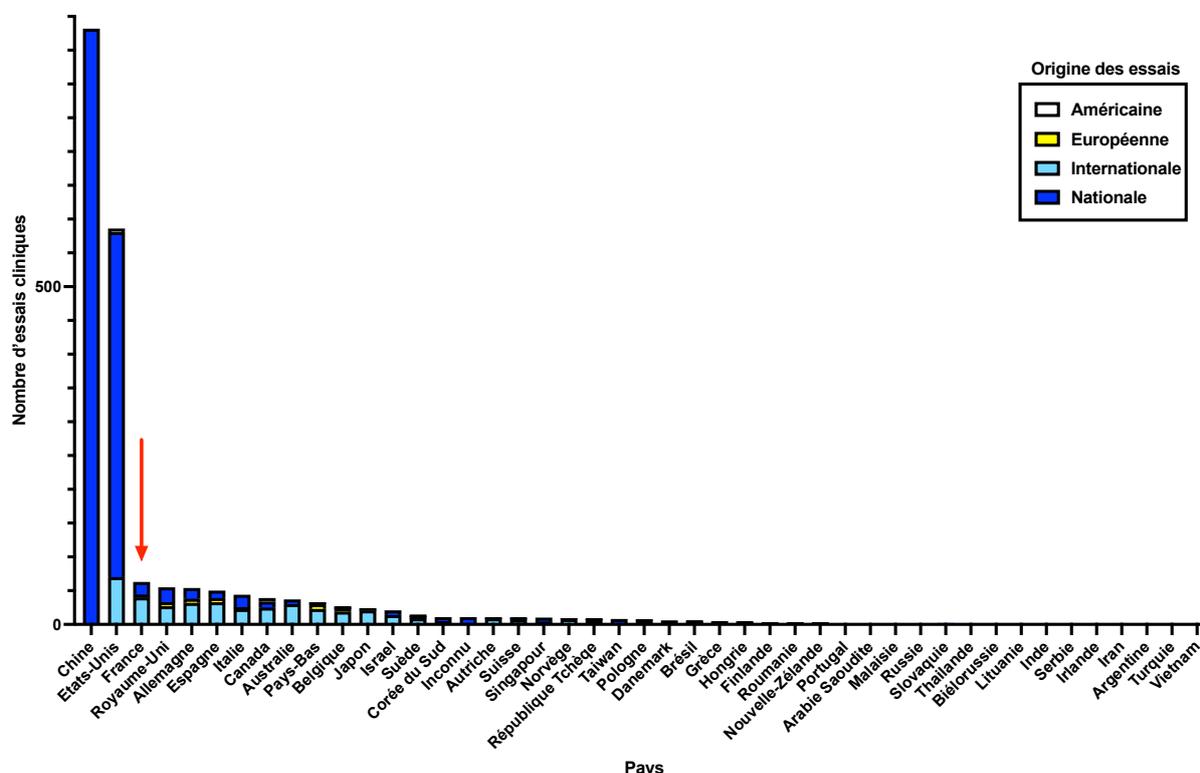


Figure 34 - Histogramme de tous les essais cliniques en cours dans le Monde avec une distinction entre les essais nationaux, internationaux, européens et américains (D'après *ClinicalTrials*(321) et réalisé à l'aide de GraphPad Prism 10® (version 10.3.1))

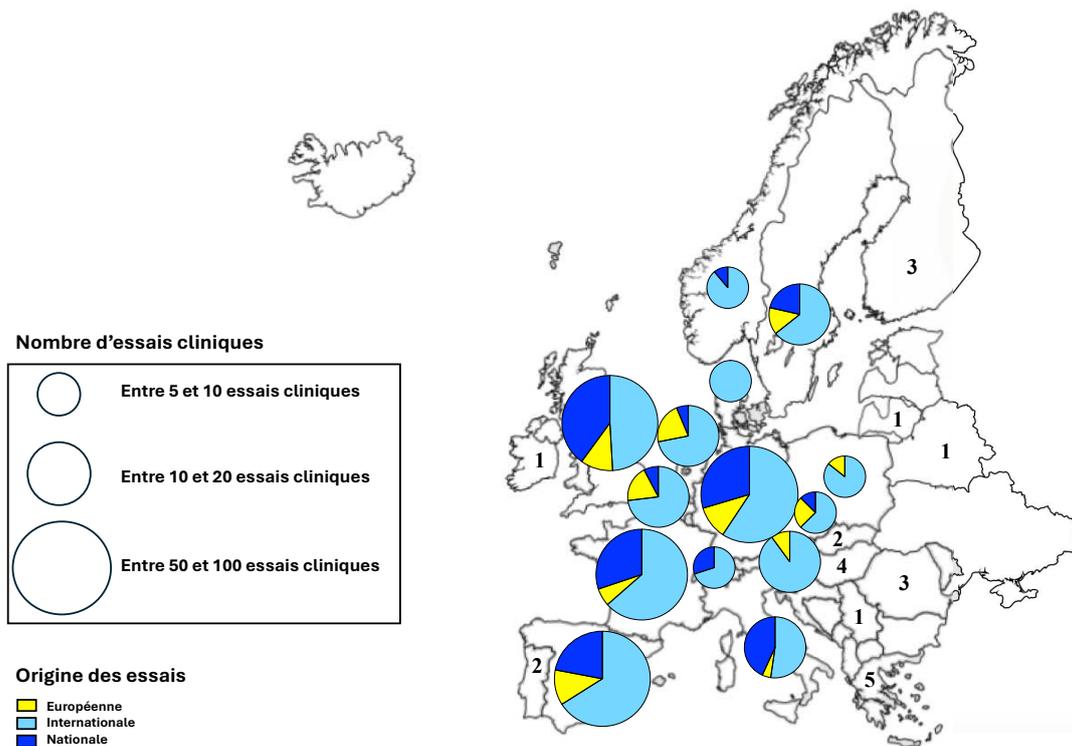


Figure 35 - Carte de l'Europe montrant la répartition des essais cliniques (D'après *ClinicalTrials*(321) et réalisée à l'aide de Biorender®)

En étudiant de plus près les différents essais cliniques incluant la France, Lille est la deuxième ville française la plus active en termes de participation aux essais cliniques (n=25) (Figure 36A). Ces études sont soit d'origine française, soit européenne soit internationale. Ceci montre le rayonnement national ainsi que mondial du CHU de Lille en termes d'avancées thérapeutiques dans le secteur particulier de l'hématologie avec 22 études en cours impliquant des CAR-T (Figure 36B).

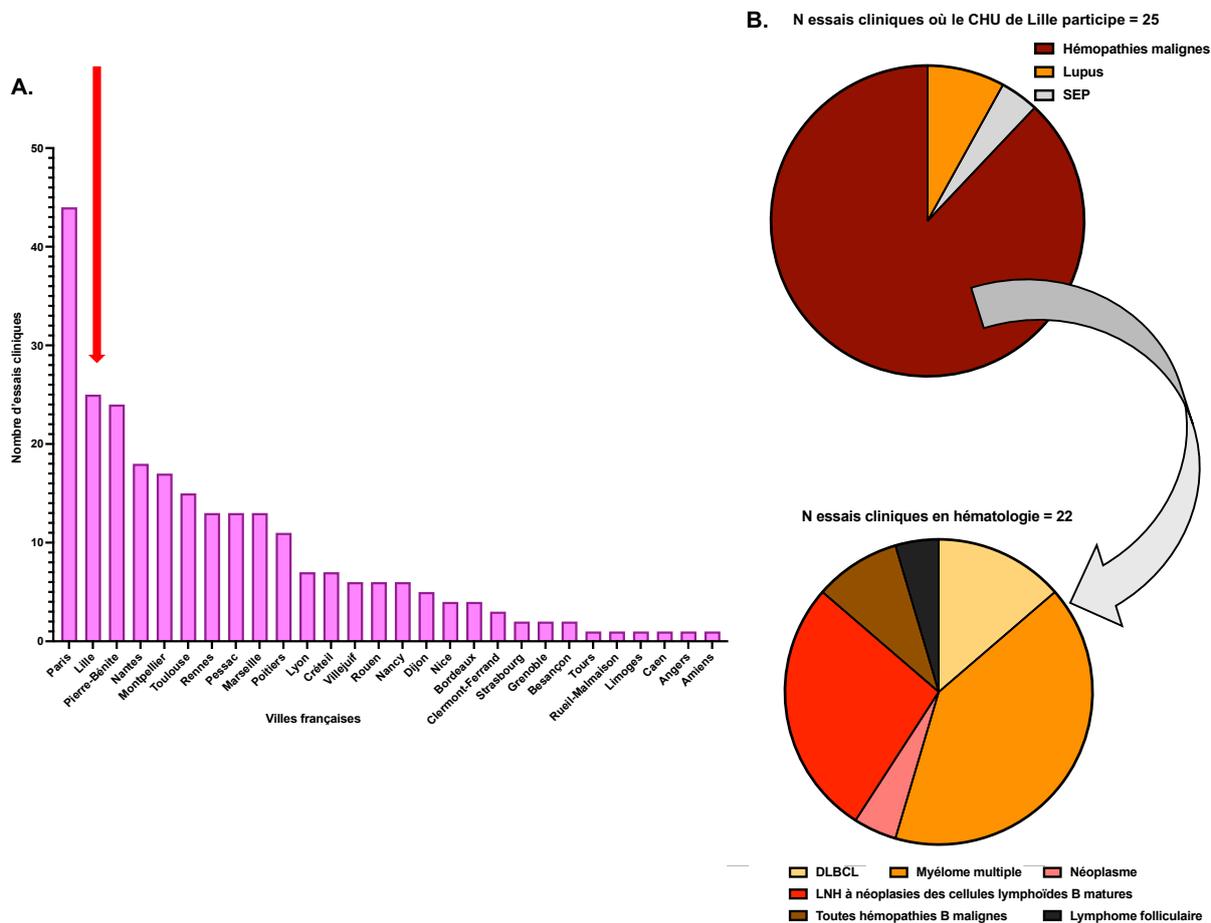


Figure 36– (A), Répartition par ville des essais cliniques sur les CAR-T en cours en France. ; (B), Distribution des différentes indications des essais cliniques avec les CAR-T au CHU de Lille (Réalisées à l'aide de GraphPad Prism 10® (version 10.3.1)). Abréviations : CHU, Centre hospitalier universitaire ; DLBCL, Lymphome diffus à grandes cellules B ; LNH, Lymphomes non Hodgkinien ; SEP, Sclérose en plaques

b) Activité clinique des CAR-T au CHU à Lille

Au CHU de Lille, l'activité autour des cellules CAR-T est multidisciplinaire. Différents professionnels de Santé participent au suivi clinico-biologique pour une bonne coordination entre le prélèvement des cellules du patient jusqu'à leur réinjection.

A Lille, le traitement par cellules CAR-T a débuté en 2018. En examinant l'activité prévisionnelle des CAR-T au CHU de Lille, on peut remarquer que 363 réinjections ont été organisées puis prévues entre 2018 et aujourd'hui (1^{er} juillet 2024). De plus, dans l'utilisation des CAR-T, une hétérogénéité des spécialités thérapeutiques réinjectées envisagées est observée (Table 20 et Figure 37A). Cependant, certaines réinjections n'ont pas eu lieu bien que des secondes réinjections aient été faites chez certains patients. L'activité réelle des CAR-T au CHU de Lille est alors composée de 323 réinjections uniques, 20 initialement prévues mais annulées ou non réalisées, et 10 réinjections doubles pour un total de 353 patients (Table 20 et Figure 37B).

CAR-T - Activité CHU Lille	
Nombre de réinjections prévues	363
Nombre de patients prévus	353
Nombre de réinjections réalisées	343
Réinjections réalisées - n patients (%)	333 (94.3)
1 seule réinjection de CAR-T - n patients (%)	323 (91.5)
2 réinjections de CAR-T - n patients (%)	10 (2.8)
Annulation ou CAR-T non réinjectés - n patients (%)	20 (5.7)

Table 20 – Résumé de l'activité CAR-T au CHU de Lille

Les produits CAR-T les plus administrés sont ceux qui ont pour cible le CD19 (Kymriah®, Yescarta®, Breyanzi® et d'autres produits CAR anti-CD19) représentant un pourcentage total de 76.7% pour N = 343 réinjections réalisées au CHU de Lille. Alors que l'ensemble des spécialités ciblant le BCMA correspond à 22.7% de l'activité CAR-T à Lille (Figure 37B). Sur le *pie-chart* de la figure 37B, 0.6% des réinjections désignent une catégorie de produits CAR-T « autres ». En effet, elle englobe les produits CAR-T ayant une cible autre que le BCMA ou le CD19. Seulement 2 patients ont bénéficié de ces cibles non communes : l'un ciblait le complexe CD19/CD20 et le second une glycoprotéine de surface cellulaire qui s'appelle SLAMF7 exprimée principalement dans le myélome multiple (324).

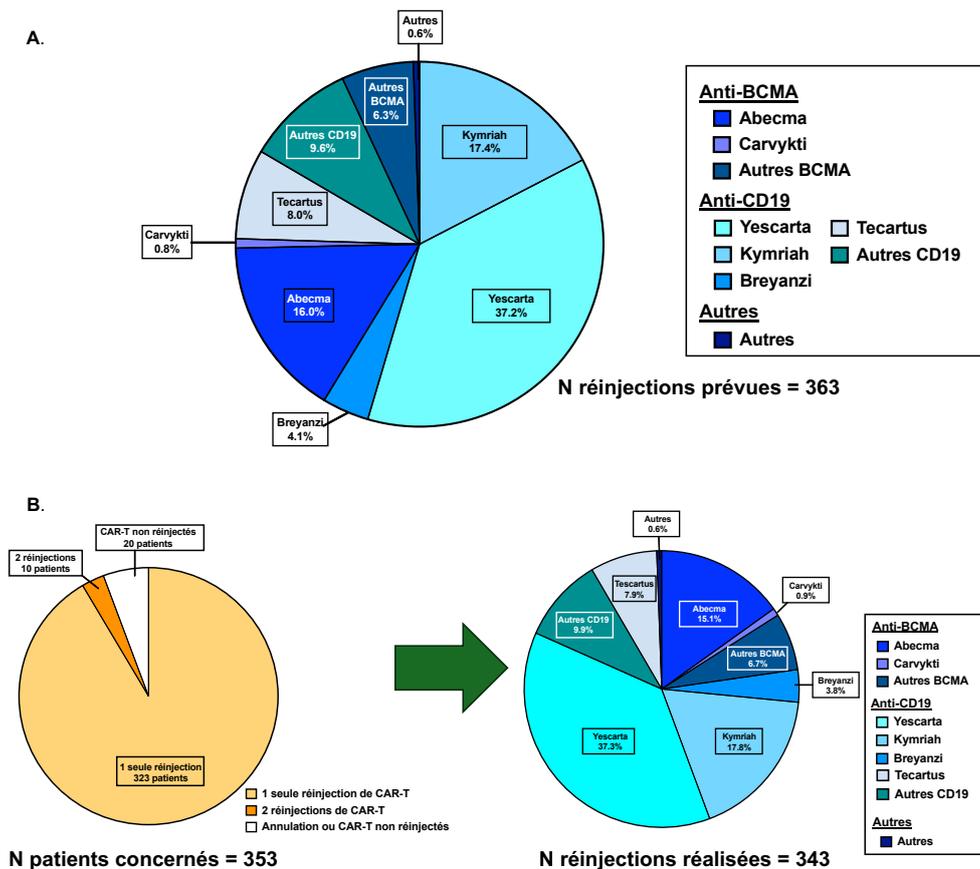


Figure 37 – (A), Activité prévisionnelle des réinjections de CAR-T au CHU de Lille. ; (B), Activité réelle des réinjections de CAR-T au CHU de Lille (Réalisées à l'aide de GraphPad Prism 10® (version 10.3.1)).

c) Population traitée par cellules CAR-T au CHU de Lille

Au CHU de Lille, l'activité réelle actuelle correspond à 343 réinjections (simples et doubles) de cellules CAR-T organisées et réalisées pour un total de 333 patients. Cette population provenait majoritairement du secteur d'hématologie de Lille (40.5%). Cependant, plusieurs patients sont issus des secteurs d'hématologie des centres hospitaliers de la région Nord et Pas-de-Calais comme Saint-Vincent de Paul (14.6%), Dunkerque (8.7%) ou Roubaix (7.9%) où les demandes sont les plus fortes. Des demandes de réinjections de CAR-T proviennent initialement d'autres régions de France comme la Normandie (Caen (2.6%) et Rouen (0.9%)), la Picardie (Saint-Quentin (2.0%) et Amiens (1.6%)) et la région Grand-Est (Charleville-Mézières (1.2%) et Nancy (0.3%)). Par ailleurs, deux réinjections de CAR-T dépendaient de deux pays étrangers, la Belgique (0.3%) et le Liban (0.3%) (Table 21 et Figure 38).

Patients traités par CAR-T (n = 333)	
Activité démographique des CAR-T	
Nombre total de réinjections	343
Nombre de patients ayant eu une deuxième réinjection - n patients (%)	10 (2.8)
Centres demandeurs initiateurs - n réinjections (%)	
Amiens	4 (1.2)
Arras	21 (6.1)
Besançon	1 (0.3)
Boulogne	3 (0.9)
Bruxelles	1 (0.3)
Caen	9 (2.6)
Charleville-Mézières	4 (1.2)
Dunkerque	30 (8.7)
Institut Gustave Roussy (IGR)	2 (0.6)
Lens	23 (6.7)
Liban	1 (0.3)
Lille	139 (40.5)
Limoges	1 (0.3)
Nancy	1 (0.3)
Roubaix	27 (7.9)
Rouen	3 (0.9)
Saint-Quentin	7 (2.0)
Saint-Vincent	50 (14.6)
Valenciennes	16 (4.7)

Table 21 – Activité démographique des cellules CAR-T au CHU de Lille

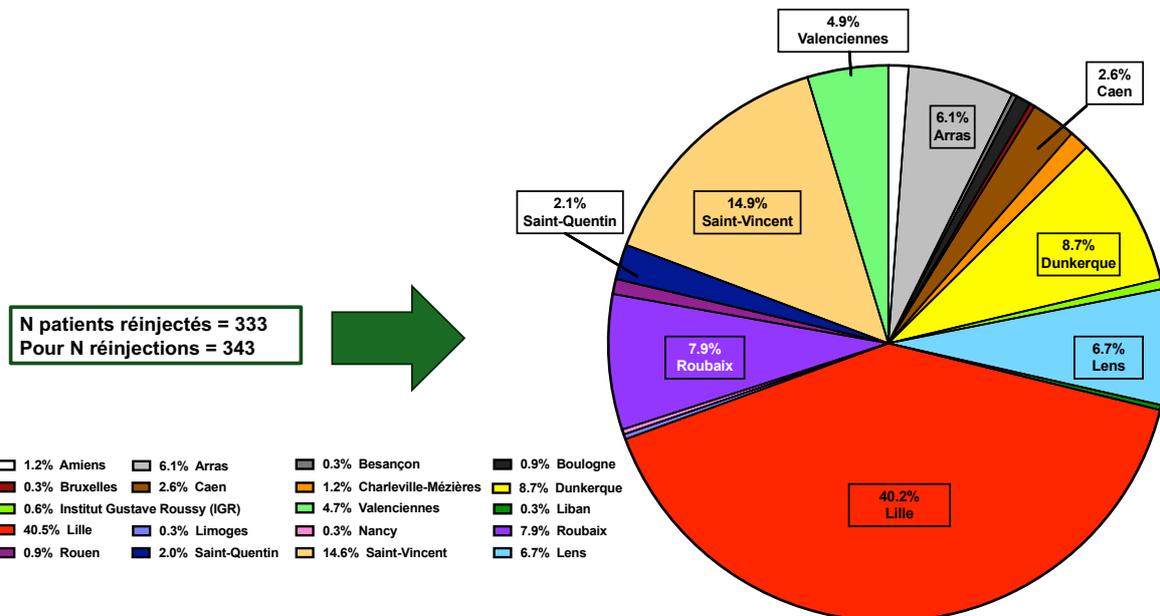


Figure 38 – Répartition graphique des centres initiateurs de demandes pour la réinjection de CAR-T au CHU de Lille (Réalisées à l’aide de GraphPad Prism 10® (version 10.3.1)).

Les patients qui ont reçu une réinjection de CAR-T ont une médiane d’âge de 62 ans. Le plus jeune patient ayant été réinjecté avec des CAR-T avait 4 ans alors que le plus âgé 79 ans. Dans cette population de 333 patients ayant bénéficié de CAR-T, une légère prédominance masculine peut être observée (58.0% d’hommes vs 42.0% de femmes). En effet, les indications hématologiques pour lesquelles les CAR-T sont proposés touchent un peu plus les hommes que les femmes (leucémie lymphoïde chronique (LLC) ou certains lymphomes) (Table 22).

Au CHU de Lille, les CAR-T ont été indiqués majoritairement aux patients souffrant de lymphomes non hodgkiniens à néoplasies des cellules lymphoïdes B matures (66.7%) pour essentiellement des DLBCL (49.8%). De plus en plus, les CAR-T sont administrés pour des patients avec un lymphome folliculaire (9.3%) ou du manteau (3.9%). Le myélome multiple s’inscrit également comme une indication majeure de cette thérapie au CHU de Lille avec 77 patients (23.1%) traités (Table 22). D’autre part, les patients les plus jeunes ayant bénéficié de CAR-T présentaient principalement une LAL-B.

Caractéristique des patients (N patients = 333)	
Age à la réinjection pour les n réinjections = 343 (médiane (années) [min-max])	62 [4 ; 79]
Sexe - n patients (%)	
Féminin	140 (42.0)
Masculin	193 (58.0)
Indications pour la réinjection de cellules CAR-T - n patients (%)	
LAL-B	24 (7.2)
LLC compliquée en syndrome de Richter	10 (2.8)
Lymphomes non Hodgkiniens à néoplasies des cellules lymphoïdes B matures	222 (66.7)
<i>DLBCL ou DLBCL transformant</i>	166 (49.8)
<i>Lymphome du manteau</i>	13 (3.9)
<i>Lymphome B primitif du médiastin</i>	3 (0.9)
<i>Lymphome de la zone grise</i>	2 (0.6)
<i>Lymphome de la zone marginale</i>	7 (2.1)
<i>Lymphome folliculaire</i>	31 (9.3)
Myélome multiple	77 (23.1)

Table 22 – Caractéristiques des patients ayant reçu des cellules CAR-T au CHU de Lille.
Abréviations : DLBCL, Lymphome diffus à grandes cellules B ; LAL-B, Leucémie aiguë lymphoblastique B ; LLC, Leucémie lymphoïde chronique

Les CAR-T occupent maintenant une place de plus en plus importante dans la stratégie thérapeutique des patients à Lille. Par conséquent, une variété de spécialités de CAR-T avec des cibles différentes (CD19, BCMA et autres) est alors proposée aux patients en tant que 3^{ème} ou 4^{ème} ligne de traitement. Pour les 343 réinjections effectuées, 263 étaient réalisées avec des CAR-T anti-CD19 représentant 76.7% de l'activité. La spécialité majoritaire utilisée est axicabtagene ciloleucel (Yescarta®) (37.3% des réinjections). Pour les spécialités anti-BCMA, idecabtagene vicleucel (Abecma®) est la spécialité la plus souvent réinjectée (15.1%). Cependant, une part non négligeable de l'activité CAR-T est consacrée aux protocoles d'essais cliniques (6.7% pour CAR-T anti-BCMA et 9.9% CAR-T anti-CD19 des réinjections totales) (Table 23).

Spécialités de CAR-T utilisées pour les N réinjections = 343	
Types de CAR-T - n réinjections (%)	
Anti-BCMA	
Idecabtagene vicleucel (Abecma®)	52 (15.1)
Ciltacabtagene autoleucel (Carvykti®)	3 (0.9)
Autres anti-BCMA	23 (6.7)
Anti-CD19	
Axicabtagene ciloleucel (Yescarta®)	128 (37.3)
Brexucabtagene autoleucel (Tecartus®)	27 (7.9)
Lisocabtagene maraleucel (Breyanzi®)	13 (3.8)
Tisagenlecleucel (Kymriah®)	61 (17.8)
Protocoles autres anti-CD19	34 (9.9)
Autres cibles	
SLAMF7 comme cible (essai CARAMBA)	1 (0.3)
CD19/CD20 comme cible (essai DALY-2)	1 (0.3)

Table 23 - Différentes spécialités de CAR-T utilisées au CHU de Lille

Suivant les indications, certaines spécialités de CAR-T seront réinjectées. Les anti-BCMA sont utilisés uniquement dans le myélome multiple alors que les anti-CD19 sont administrés pour des indications diverses en hématologie (DLBCL, LAL-B, LLC, ...). Au CHU de Lille, 61.6% des CAR-T anti-CD19 concernent le DLBCL puis secondairement les autres lymphomes non hodgkiniens (LNH) à néoplasies à cellules

B matures (20.5%). Les CAR-T utilisant d'autres cibles font partie d'essais cliniques. L'un a pour cible la protéine SLAMF7, majoritaire dans le myélome multiple et est le sujet de l'essai clinique CARAMBA (324). Le deuxième a pour cible le complexe protéique CD19/CD20, sujet de l'essai clinique DALY-2 (325) pour les DLBCL R/R (Figure 39).

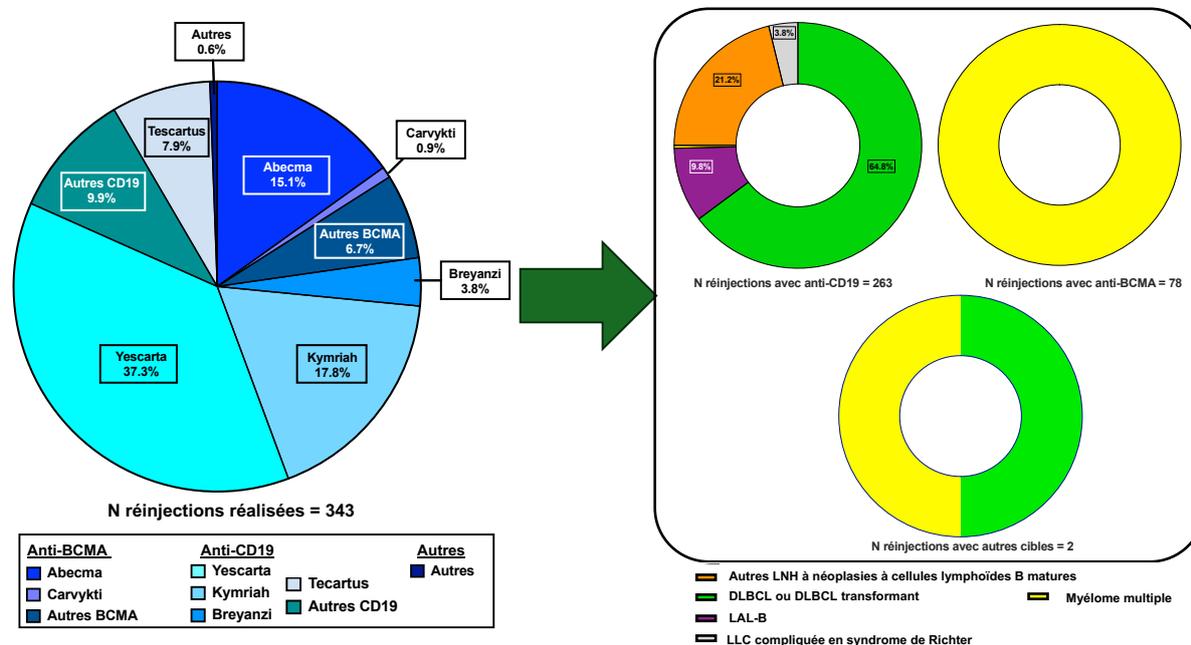


Figure 39 - Indications suivant les CAR-T utilisés (Réalisées à l'aide de GraphPad Prism 10® (version 10.3.1)). Abréviations : DLBCL, lymphome B diffus à grandes cellules ; LAL-B, leucémie aiguë lymphoblastique de type B ; LLC, leucémie lymphoïde chronique ; LNH, lymphome non hodgkinien

d) Les annulations des cellules CAR-T et les secondes réinjections

Sur la totalité du plan prévisionnel de l'activité des CAR-T au CHU de Lille, 20 réinjections ont été annulées ou non faites ou reportées. Diverses raisons ont contraint les équipes CAR-T à annuler ces réinjections. Malheureusement, 50% des réinjections programmées mais annulées concernaient des patients qui sont décédés quelques jours ou semaines avant cette réinjection. Cinq réinjections n'ont pas pu être réalisées en raison d'une rechute de leur hémopathie. Des complications cliniques (pulmonaires ou neurologiques) peuvent également contre-indiquer les patients à un instant t de la réinjection de la poche de cellules CAR-T. En effet, les CAR-T ne sont pas dénués d'effets indésirables dont les principaux sont CRS et l'ICANS. Ainsi, avant toute réinjection de CAR-T, chaque patient est vu préalablement par les équipes cliniques de neurologie et pneumologie pour évaluer l'état avant traitement des patients. Un échec technique au niveau de la leucaphérèse est également décompté dans les raisons d'annulation de réinjections des CAR-T dû à un nombre insuffisant de cellules. (Figure 40)

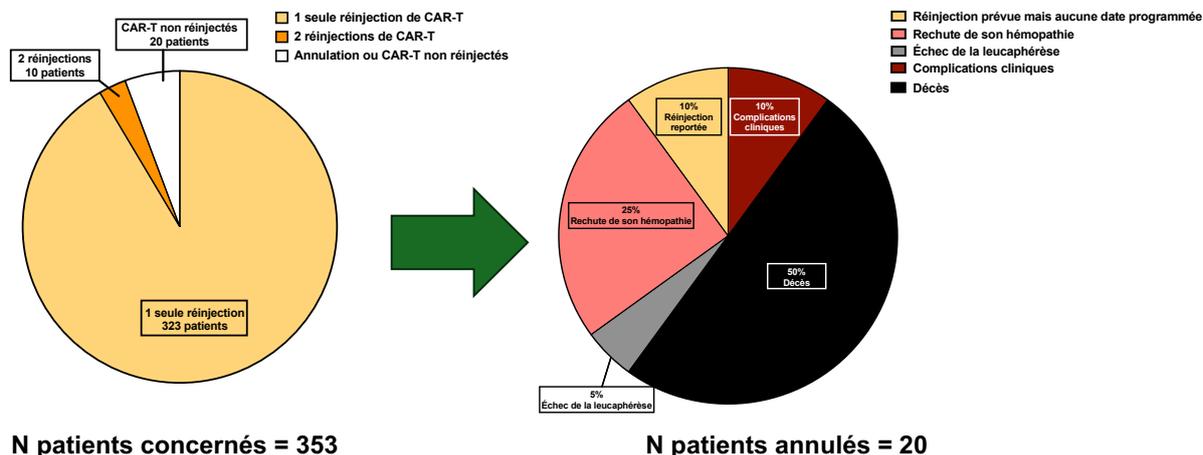


Figure 40 – Répartition des raisons d’annulation de réinjection des CAR-T (Réalisées à l’aide de GraphPad Prism 10® (version 10.3.1)).

Les patients annulés ont une médiane d’âge de 67 ans. Les annulations concernaient principalement des patients pour un traitement de LNH à néoplasie à cellules lymphoïdes B matures (55.0%) dont la grande majorité, étaient des DLBCL (9 cas sur 11). Un peu moins d’un tiers des patients annulés souffraient de myélome multiple. Malheureusement, pour un patient prévu, l’information concernant l’indication des CAR-T n’était pas connue (Table 24). Yescarta® est la spécialité CAR-T anti-CD19 majoritairement annulée (35.0% des annulations et 50.0% des anti-CD19 annulés) et trois spécialités CAR-T anti-CD19 inscrites dans des essais cliniques n’ont malheureusement pas été réinjectées. (Table 24)

Patients prévus mais finalement non traités par CAR-T (N = 20)	
Caractéristiques des patients	
Age (médiane (années) [min-max])	67 [44 ; 77]
Sexe - n patients (%)	
Féminin	9 (45.0)
Masculin	11 (55.0)
Indications - n patients (%)	
LAL-B	2 (10.0)
Lymphomes non Hodgkiniens à néoplasies à cellules lymphoïdes B matures	11 (55.0)
<i>DLBCL ou DLBCL transformant</i>	9 (45.0)
<i>Lymphome folliculaire</i>	1 (5.0)
<i>Lymphome du manteau</i>	1 (5.0)
Myélome multiple	6 (30.0)
NA	1 (5.0)
Raisons d'annulation - n patients (%)	
Complications cliniques	2 (10.0)
Décès	10 (50.0)
Échec de la leucaphérèse	1 (5.0)
Rechute de son hémopathie	5 (25.0)
Réinjection prévue mais aucune date de programmée	2 (10.0)
Spécialités de CAR-T qui auraient dû être réinjectés - n patients (%)	
Anti-BCMA	
Idecabtagene vicleucel (ABECMA®)	6 (30.0)
Anti-CD19	
Axicabtagene ciloleucel (Yescarta®)	7 (35.0)
Brexucabtagene autoleucel (Tecartus®)	2 (10.0)
Lisocabtagene maraleucel (Breyanzi®)	2 (10.0)
Tisagenlecleucel (Kymriah®)	2 (10.0)
Protocoles autres anti-CD19	1 (5.0)

Table 24 – Résumé des patients prévus mais non réinjectés par des cellules CAR-T (N= 20). Abréviations : DLBCL, Lymphome B diffus à grandes cellules ; LAL-B, Leucémie aiguë lymphoblastique de type B ; NA, données manquantes

A l'inverse des annulations, des patients ont été réinjectés par des cellules CAR-T une seconde fois. L'âge médian à la deuxième réinjection est de 53.5 ans. Des patients très jeunes ont reçu une deuxième réinjection car l'âge minimal des patients à la deuxième réinjection est de 5 ans. De plus, plus d'hommes que de femmes ont reçu une deuxième injection (70.0% vs 30.0%). La moitié des patients ayant reçu une deuxième injection souffrait de DLBCL. L'autre moitié comportait des patients atteints de LAL-B et de myélome multiple (Table 25).

La deuxième réinjection de CAR-T a été réalisée en raison d'un fort risque de rechute ou suite à une rechute post-CAR-T. Deux patients ont été intégrés dans le protocole CAPTIRALL du fait de leur LAL-B avec fort risque de rechute. Cet essai clinique concerne les enfants, adolescents et jeunes adultes traités une première fois par Tisagenlecleucel (Kymriah®)(326), comme c'était le cas pour les patients avec une double réinjection de CAR-T à Lille. Dans cet essai clinique, la perte précoce d'aplasie des lymphocytes B est un marqueur de mauvaise fonctionnalité des CAR-T réinjectés et est associée également à un risque élevé de rechute. C'est ce qui avait été remarqué chez les deux patients lillois inscrits. Le protocole CAPTIRALL consiste alors à l'administration d'une seconde réinjection de CAR-T après l'observation d'une perte d'aplasie de lymphocytes B dans les 6 mois post-CAR-T. Cette deuxième réinjection est ensuite combinée avec un inhibiteur de PD-1, Nivolumab (Opdivo®). Cette étude part de l'hypothèse que dans certains cas, la voie de signalisation du point de contrôle PD-1 pourrait être impliquée dans la disparition, ou la non-persistance, ou le rejet des CAR-T. Des résultats prometteurs ont été observés sur certains patients aux Etats-Unis (327,328). Pour les 2 patients inscrits dans le protocole CAPTIRALL ainsi que 2 autres, la spécialité de cellules CAR-T réinjectée la seconde fois n'a pas changé. Cependant, pour 5 cas, il y a eu un changement de spécialité et tous concernaient les CAR-T anti-CD19 (le shift Kymriah® vers Yescarta® est le plus fréquent avec 3 cas sur 5). Il est aussi intéressant de remarquer qu'un patient souffrant de myélome multiple a eu en deuxième injection, un produit CAR-T visant une autre cible (SLAMF7) que le BCMA (entrant ainsi dans un essai clinique). De plus, le délai médian entre les deux réinjections de CAR-T pour ces 10 patients était de 12.5 mois avec un maximum de délai à 40 mois. Ces patients ont montré effectivement soit un fort risque de rechute soit une rechute en moins de 4 ans post-CAR-T (Table 25).

Patients ayant reçu 2 réinjections de CAR-T (N patients = 10)	
Age de la deuxième réinjection (mediane (années) [min-max])	53.5 [5 ; 73]
Sexe - n patients (%)	
Féminin	3 (30.0)
Masculin	7 (70.0)
Indications - n patients (%)	
LAL-B	2 (20.0)
Lymphomes non Hodgkiniens à néoplasies à cellules lymphoïdes B matures	5 (50.0)
<i>DLBCL ou DLBCL transformant</i>	5 (50.0)
Myélome multiple	3 (30.0)
Raisons de réinjection - n patients (%)	
Rechute de son hémopathie	5 (50.0)
Fort risque de rechute de son hémopathie	3 (30.0)
Hémopathie à fort risque de rechute + entrée dans protocole CAPTIRALL	2 (20.0)
Changements ou non de CAR-T injectés par rapport à la première fois - n patients (%)	
Aucun changement	4 (40.0)
Changement de Kymriah vers Yescarta	3 (30.0)
Changement de Yescarta vers Kymriah	1 (10.0)
Changement d'autre CD19 vers Kymriah	1 (10.0)
Changement de ABECMA vers autre cible	1 (10.0)
Délai entre la première et la deuxième réinjection (mediane (mois) [min-max])	12.5 [3 ; 40]

Table 25 – Résumé des patients ayant reçu une double réinjection de CAR-T. Abréviations : DLBCL, Lymphome B diffus à grandes cellules ; LAL-B, Leucémie aiguë lymphoblastique de type B.

e) Effets indésirables des CAR-T au CHU de Lille

1. Syndrome de relargage cytokinique (CRS)

Le CRS est l'effet indésirable le plus fréquent post-CAR-T. Au CHU de Lille, sur les 343 réinjections réalisées, 289 se sont soldés avec un CRS. La grande majorité était celui de grade 1 apparu chez 54.8% des réinjections de CAR-T. Cependant des grades 3 et 4 ont été observés chez certains patients mais ils représentaient moins de 10% des réinjections (Table 26 et Figure 41A). D'après la figure 41A, il y a eu plus d'événements apparentés à un CRS de grade 1 ou 2 après une réinjection de CAR-T que de réinjections sans CRS.

Concernant la prise en charge du CRS, certains patients ont seulement nécessité une prise en charge symptomatique (paracétamol et réhydratation par exemple). Cependant, dans la majeure partie des cas, du tocilizumab a été injecté en association ou non avec des corticoïdes, quel que soit le grade du CRS, pour une prise en charge rapide et éviter une aggravation plus importante. En cas de mauvaise prise en charge, un transfert du patient en réanimation peut être envisagé.

La majorité des CRS observés (76.1%) est survenue après réinjection de cellules CAR-T anti-CD19 (Figure 42A).

2. Syndrome de neurotoxicité associé au traitement par cellules CAR-T (ICANS)

L'ICANS est observé pour 19.8% des réinjections au CHU de Lille, avec une fréquence plus faible que le CRS (Table 26). La majorité des ICANS observés après réinjection de CAR-T sont de grade 1 (54.4% des ICANS). Mais inversement au CRS, il y a beaucoup plus de réinjections sans ICANS cliniquement gradé qu'avec (262 vs 68). 4.1% de toutes les réinjections de CAR-T ont été suivies par un ICANS de grade 2 ou

3. Cependant, pour 3.8% des réinjections, aucun grade d'ICANS ni d'évocation de neurotoxicité post-CAR-T n'a été attribué cliniquement (Figure 41B et Table 26).

Moins de 5% des réinjections pour lesquelles un ICANS a été diagnostiqué provenaient d'une administration de CAR-T anti BCMA. C'est, en effet, une complication qui est plus fréquemment retrouvée avec des CAR-T anti-CD19 (Figure 42B).

Presque tous les ICANS étaient accompagnés de CRS (65 pour 68 ICANS, 95.6%), seulement 3 étaient indépendants. Ainsi, pour la plupart, ils étaient traités comme dans les recommandations de la SFGM-TC de 2023, avec de la dexaméthasone en IV(247). Mais moins de 15% des réinjections sont dénués de CRS et d'ICANS (Table 26).

Effets indésirables principaux suite à une réinjection de CAR-T (N réinjections = 343 pour N patients = 333)	
Syndrome de relargage cytokinique (CRS) - n réinjections (%)	289 (84.3)
Grade 1	188 (54.8)
Grade 2	80 (23.3)
Grade 3	17 (5.0)
Grade 4	4 (1.2)
Sans CRS	50 (14.6)
NA	4 (1.2)
Syndrome de neurotoxicité associée au traitement par cellules CAR-T (ICANS) - n réinjections (%)	68 (19.8)
Grade 1	37 (10.8)
Grade 2	14 (4.1)
Grade 3	14 (4.1)
Grade 4	3 (0.9)
Sans ICANS	262 (76.4)
NA	13 (3.8)
Autres symptômes ou syndrome neurologiques post-CAR-T - n réinjections (%)	
FLAIR	1 (0.3)
CRES syndrome	1 (0.3)
Réinjections suivies d'un CRS et d'un ICANS - n réinjections (%)	65 (18.9)
Aucun CRS et aucun ICANS - n réinjections (%)	46 (13.4)
Rechute post-CAR-T - n réinjections (%)	139 (40.5)
Décès - n patients (%)	107 (32.1)

Table 26 - Effets indésirables après une réinjection de CAR-T. Abréviations : FLAIR, *Fluid attenuated inversion recovery* ; CRES, *CAR-T cell-related encephalopathy syndrome*, NA, *données manquantes*

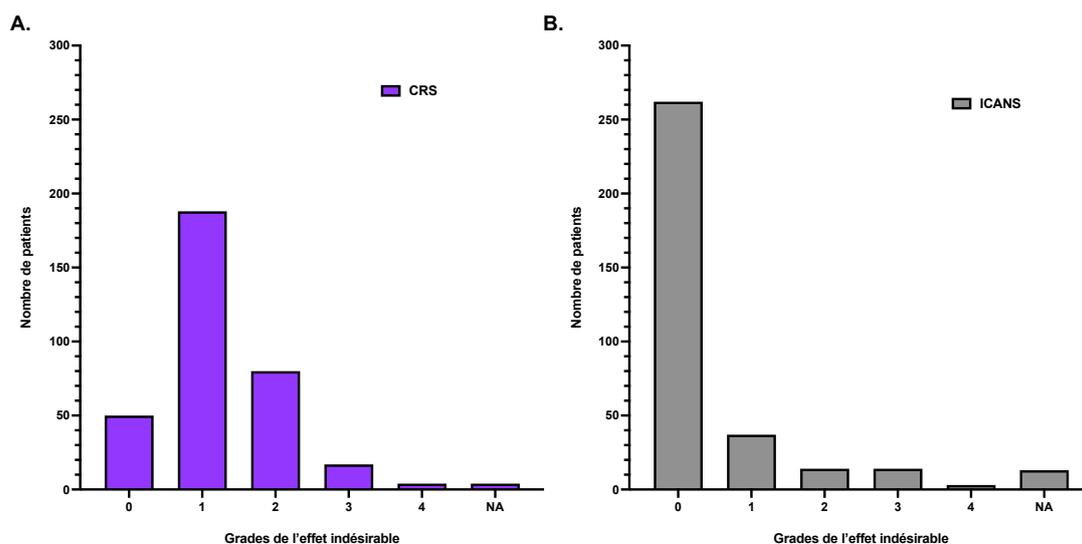


Figure 41 – (A), Répartition des CRS observés après réinjection de cellules CAR-T suivant les différents grades ; (B), Répartition des ICANS après réinjection de cellules CAR-T suivant les différents grades. (Réalisées à l'aide de GraphPad Prism 10® (version 10.3.1)) Abréviations : CRS, Syndrome de relargage cytokinique ; ICANS, Syndrome de neurotoxicité associée au traitement par cellules CAR-T ; NA, *données manquantes*

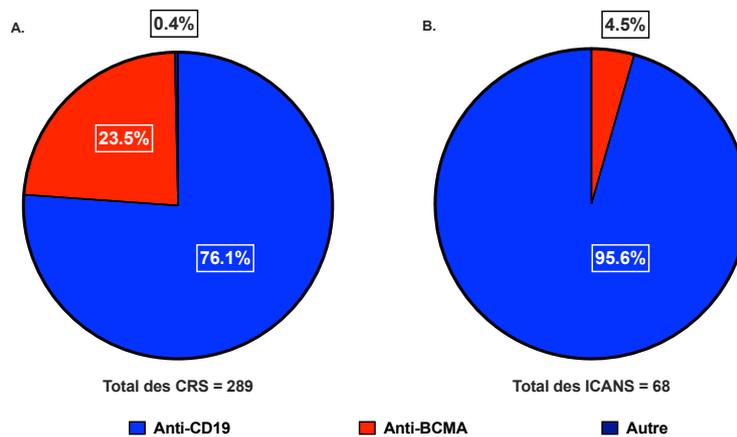


Figure 42 – (A), Répartition des CRS en fonction des cibles de cellules CAR-T., (B), Répartition des ICANS en fonction des cibles de cellules CAR-T (Réalisées à l'aide de GraphPad Prism 10® (version 10.3.1))

D'après la table 26, un patient présentait un effet FLAIR sans rapport avec une neurotoxicité associée mais, par mesure de précaution, de la dexaméthasone lui avait été administrée en IV et une évolution favorable avait été observée à J2. Un patient a présenté un CRES syndrome (*CAR-T cell-related encephalopathy syndrome*) après une réinjection de CAR-T. Il présentait sur son IRM cérébrale une progression lésionnelle en FLAIR en supra et infra-tentoriel et une prise de contraste leptoméningée cérébelleuse droite. L'électroencéphalogramme a confirmé l'encéphalopathie par l'observation de surcharges diffuses en activité lente intermittente et non spécifique. Il avait un score CARTOX-10 égal à 10. De la dexaméthasone lui avait été administrée selon les recommandations de la SFGM-TC de 2018 (329). L'hypothèse la plus probable était une progression de la maladie chez ce patient au niveau cérébral combinée à une encéphalopathie métabolique. Malheureusement, ce patient est décédé quelques jours après.

3. Autres effets indésirables observés après la réinjection des CAR-T

D'autres effets indésirables ont été observés à la suite de la réinjection de cellules CAR-T chez les patients au CHU de Lille :

- Perturbations biologiques sur la numération de formule sanguine (NFS) : anémie, neutropénie, thrombopénie
- Syndrome inflammatoire biologique : augmentation de la CRP
- Troubles du système digestif : nausées, vomissements
- Infections virales, fongiques et bactériennes
- Insuffisance rénale aiguë
- Perturbation du bilan hépatique : cytolyse avec 3 (ou plus) fois la normale des transaminases (aspartate aminotransférase (ASAT), alanine aminotransférase (ALAT)), une cholestase avec augmentation des gamma-glutamyltransférase (GGT), ictère avec des perturbation de la bilirubine

L'ICAHT permet de décrire l'hématotoxicité observée après la réinjection de cellules CAR-T. Les cytopénies que l'hématotoxicité peut induire peuvent être délétères pour le patient car ils le prédisposent à de sévères complications infectieuses. Pour évaluer la sévérité de cet effet indésirable, une classification (comme celle du CRS ou de l'ICANS) a été établie depuis septembre 2023 (215,277). Au CHU de Lille, les patients sous CAR-T ont commencé à être gradués suivant cette pratique dès la fin d'année 2023. La majorité des réinjections de CAR-T évaluée suivant ces recommandations était suivie par un *early* ICAHT de grade 1. Cependant, aucun *late* ICAHT n'a été observé pour aucune réinjection.

f) Rechute et survie des patients au CHU de Lille post-CAR-T

Les premières cellules CAR-T ont été administrés à Lille en 2018. Au bout de 6 ans, de nombreuses informations ont pu être recollectées post-CAR-T grâce au suivi clinico-biologique régulier de ces patients.

1. Rechute post-CAR-T

Une rechute post-CAR-T a été retrouvée après 139 réinjections (40.5%) au CHU de Lille (Table 27).

Rechutes (N rechutes = 139)	
Caractéristiques des patients	
Age à la rechute (médiane (années) [min-max])	60 [5 ; 79]
Sexe - n rechutes (%)	
Féminin	44 (31.7)
Masculin	95 (68.3)
Indications - n rechutes (%)	
LAL-B	14 (10.1)
LLC compliquée en syndrome de Richter	3 (2.2)
Lymphomes non Hodgkiniens à néoplasies à cellules lymphoïdes B matures	92 (66.2)
	<i>DLBCL ou DLBCL transformant</i> 84 (60.4)
	<i>Lymphome de la zone grise</i> 1 (0.7)
	<i>Lymphome du manteau</i> 2 (1.4)
	<i>Lymphome folliculaire</i> 5 (3.6)
Myélome multiple	30 (21.6)
Liée à la réinjection des CAR-T	
Spécialités de CAR-T utilisées - n rechutes (%)	
Anti-BCMA	
Idecabtagene vicleucel (Abecma®)	14 (10.1)
Ciltacabtagene autoleucel (Carvykti®)	2 (1.4)
Autres anti-BCMA	14 (10.1)
Anti-CD19	
Axicabtagene ciloleucel (Yescarta®)	109 (78.4)
Brexucabtagene autoleucel (Tecartus®)	12 (8.6)
Lisocabtagene maraleucel (Breyanzi®)	4 (2.9)
Tisagenlecleucel (Kymriah®)	28 (20.1)
Protocoles autres anti-CD19	11 (7.9)
Autres cibles	0 (0.0)
Effets indésirables liées aux CAR-T - n rechutes (%)	
Syndrome de relargage cytokinique (CRS)	
Grade 1	111 (79.9)
Grade 2	79 (56.8)
Grade 3	24 (17.3)
Grade 4	8 (5.8)
Grade 4	0 (0.0)
Sans CRS	27 (19.4)
NA	1 (0.7)
Syndrome de neurotoxicité associée au traitement par cellules CAR-T (ICANS)	
Grade 1	20 (14.4)
Grade 2	9 (6.5)
Grade 3	5 (3.6)
Grade 4	5 (3.6)
Grade 4	1 (0.7)
Sans ICANS	114 ()
NA	5 (3.6)
Autres symptômes ou syndrome neurologiques post-CAR-T	
FLAIR	1 (0.7)
CRES syndrome	1 (0.7)
Réinjections suivies d'un CRS et d'un ICANS	
Aucun CRS et aucun ICANS	18 (12.9)
	24 (17.3)
Paramètres temporels	
Délai entre l'administration de CAR-T et la rechute (médiane (mois) [min-max])	3 [0 ; 41]

Table 27 – Tableau récapitulatif des rechutes post-CAR-T. Abréviations : CRES, CAR-T cell-related encephalopathy syndrome ; DLBCL, lymphome B diffus à grandes cellules ; FLAIR, Fluid attenuated inversion recovery ; LAL-B, leucémie aiguë lymphoblastique de type B ; LLC, leucémie lymphoïde chronique ; NA, données manquantes

En effet, d'après la courbe de Kaplan-Meier pour cette population, la survie médiane correspondant à une probabilité de rechute post-CAR-T de 50% est atteinte à 3.5 ans (Figure 43A). Cent neuf (78.4%) des réinjections qui ont rechuté étaient des cellules CAR-T anti-CD19 (Table 27 et Figure 44A). En outre, une probabilité de rechute proche de 55% au bout de 6 ans est observée pour les patients ayant reçu des CAR-T anti-CD19 alors qu'elle est vraiment plus faible pour les patients traités par CAR-T anti-BCMA (33.3%). Cependant, en comparant les deux courbes de Kaplan-Meier, par un test du log-rank, on peut observer un hazard-ratio (HR) de 1.03 [0.69 ; 1.54] pour la population traitée par CAR-T anti-CD19 et de 0.97 [0.65 ; 1.45] pour celle par CAR-T anti-BCMA. La différence entre les deux courbes de Kaplan-Meier montrant les

probabilités de rechute en fonction des cibles de CAR-T utilisées n'est pas statistiquement significative ($p\text{-value} = 0.879$) (Figure 43B). La grande majorité des cas de rechute a été rediscutée en réunion de concertation pluridisciplinaire (RCP) pour proposer une nouvelle prise en charge thérapeutique. Comme chaque cas est différent, chaque traitement de rechute n'a pas été le même. Les exemples de traitements proposés ont été : une nouvelle ligne de chimiothérapie, un nouveau traitement anti-néoplasique, l'entrée dans un nouveau protocole d'essais clinique, une immunothérapie, une allogreffe de CSH, des soins palliatifs ou une seconde réinjection de cellules CAR-T.

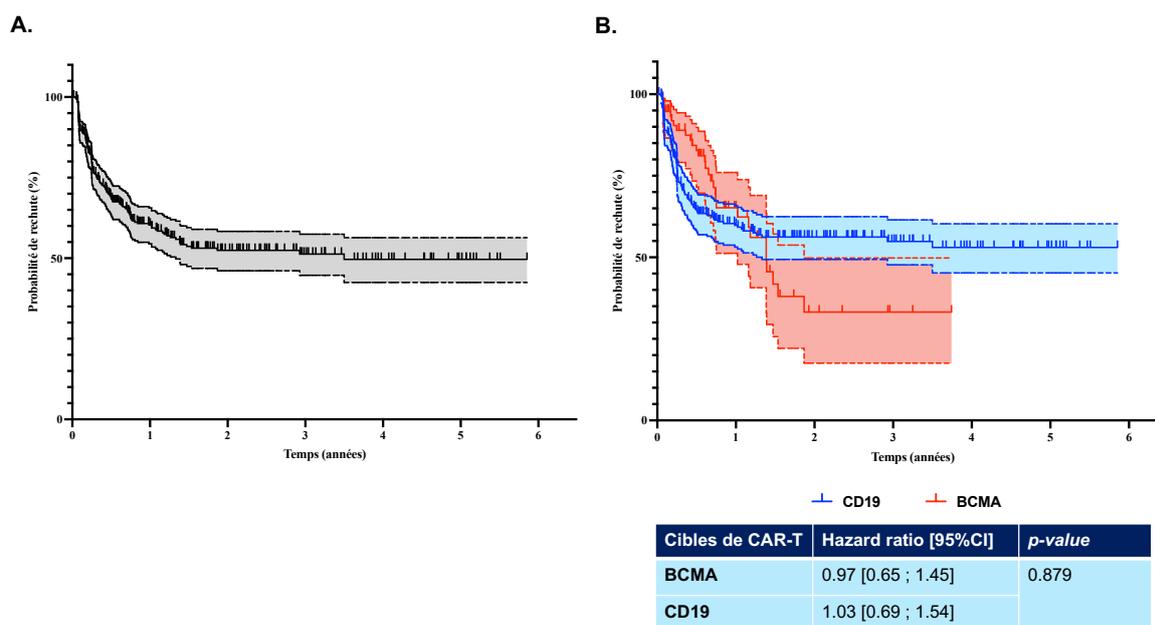


Figure 43 – (A), Courbe de survie sans évènement (rechute) après réinjection de cellules CAR-T au cours du temps ; (B), Courbe de survie sans évènement (rechute) après réinjection de cellules CAR-T au cours du temps en fonction des cibles de CAR-T (Réalisées à l'aide de GraphPad Prism 10® (version 10.3.1))

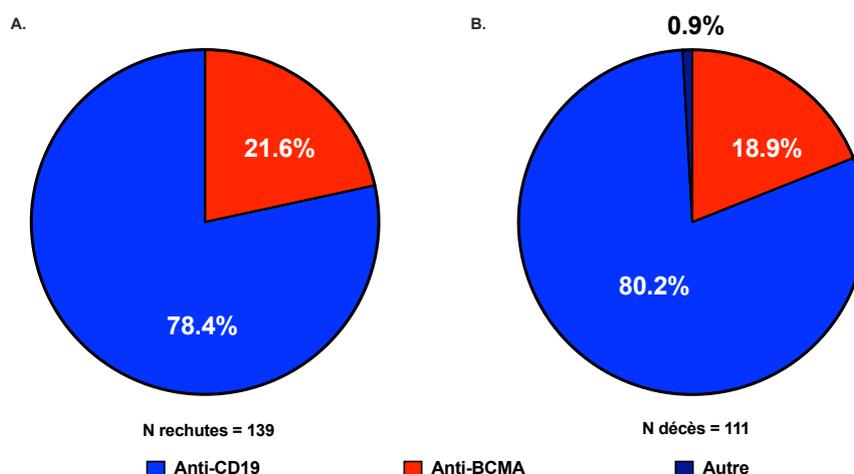


Figure 44 – Rechutes et décès après CAR-T suivant leurs cibles (A), Répartition des rechutes suivant les cibles de CAR-T ; (B), Répartition des décès en fonction des cibles de CAR-T (Réalisées à l'aide de GraphPad Prism 10® (version 10.3.1))

L'âge médian des patients à la rechute est de 60 ans. La population concernée est plutôt masculine (ratio H/F de 2/1). Ces patients qui ont rechuté étaient principalement atteints de DLBCL, ce qui explique que les rechutes concernaient majoritairement des CAR-T anti-CD19. Une apparition de CRS de grade 1 avait été observée dans un peu plus de la moitié des réinjections de CAR-T suivies de rechute alors que la survenue d'ICANS dans moins de 20% de ces cas de rechute (Table 27). Il est intéressant de remarquer que les rechutes post-CAR-T sont survenues assez rapidement, avec une médiane d'apparition de 3 mois. Certaines rechutes se sont même manifestées dans le mois qui suivait la réinjection (Table 27).

2. *Survie post-CAR-T*

Cent sept des 333 patients qui ont reçu des cellules CAR-T au CHU de Lille sont décédés. Au bout de 6 ans, la probabilité de survie dans la population ayant reçu des CAR-T à Lille est d'environ 39.5% avec une médiane de survie égale à 4.6 ans. La probabilité de 50% de rechute est atteinte un peu plus rapidement que celle de décès (3.5 ans vs 4.6 ans). Cependant, la probabilité de rechute stagne après avoir atteint les 50% alors que la probabilité de survie diminue pour atteindre les 39.5% après presque 6 ans de suivi (Figure 45A). Parallèlement aux courbes de rechute, on a observé les courbes de survie en fonction des cibles des cellules CAR-T injectées. Comme un nombre plus important de cellules CAR-T anti-CD19 a été administré, le nombre de décès après CAR-T anti-CD19 est plus élevé que celui après CAR-T anti-BCMA (80.2% vs 18.9%) (Figure 44B). Néanmoins, l'aspect des courbes de survie en fonction des cibles de CAR-T utilisées sont comparables. De plus, les HR calculés pour ces courbes sont proches de 1 et d'après le test du log-rank, leur différence n'est pas statistiquement significative ($p\text{-value} = 0.899$) (Figure 45B).

Parmi les patients qui sont décédés, 81 patients (75.7%) avaient connu une rechute post-CAR-T. La courbe de survie des patients en fonction des rechutes montre que les patients sans rechute ont une meilleure probabilité de survie au bout des 6 ans de suivi que ceux ayant rechuté (77.2% vs 10.2%). En effet, la différence des HR calculés grâce au test du log-rank est statistiquement significative ($p\text{-value} < 0.0001$). Les patients avec rechute ont une médiane de survie égale de 1.3 ans et un HR de 4.85 [3.31 ; 7.10] (Figure 45C). Les patients ayant subi une rechute sont, pour la moitié d'entre eux, morts dans les 5 mois post-rechute (Table 28).

L'âge médian des patients au moment du décès est de 63 ans. Cependant, un patient est décédé à l'âge de 16 ans. Le nombre de décès concerne plus d'hommes que de femmes. De plus, parallèlement aux rechutes, l'indication des CAR-T pour laquelle on

observe le plus de décès est le DLBCL, connu pour être une tumeur très agressive pouvant se propager dans différentes parties du corps. Quarante-vingt-onze des 107 patients décédés (85.0%) avaient présenté un CRS post-CAR-T alors que seulement 13 n'avaient eu ni CRS ni ICANS (12.1%) (Table 28).

Le délai entre l'administration des CAR-T et le décès de ces patients peut être assez court avec une médiane égale à 7 mois. Il est à noter que certains sont malheureusement décédés dans le mois qui suivait le traitement par cellules CAR-T, souvent en raison de complications infectieuses (Table 28).

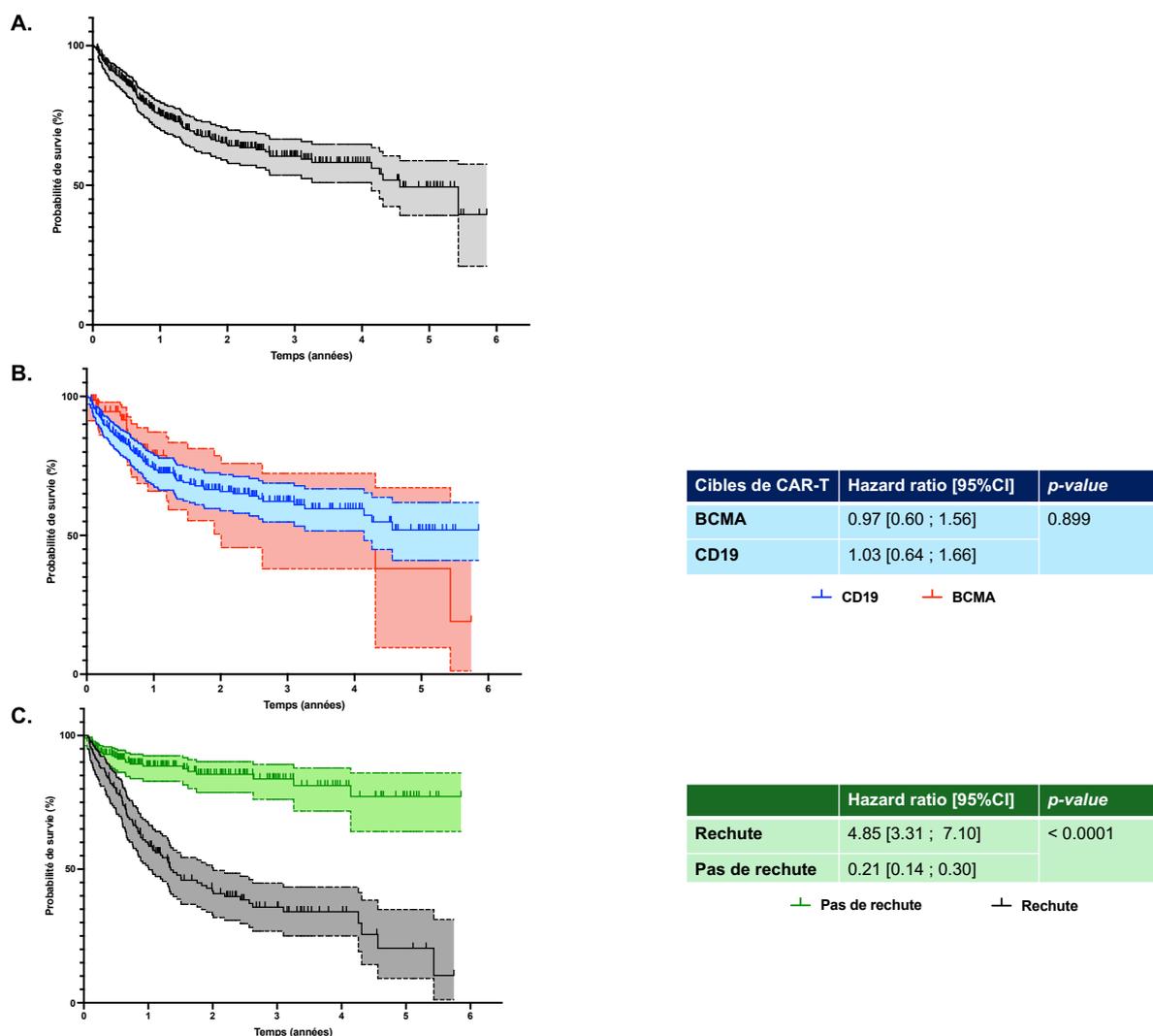


Figure 45 – (A), Courbe de survie globale après cellules CAR-T; (B), Courbe de survie globale après cellules CAR-T en fonction des cibles ; (C), Courbe de survie globale après injection de cellules CAR-T en fonction de la présence de rechute ou non des patients après réinjection (Réalisées à l'aide de GraphPad Prism 10® (version 10.3.1))

Décès (N patients décédés = 107)	
Caractéristiques des patients	
Age au décès (médiane (années) [min-max])	63 [16 ; 78]
Sexe - n patients (%)	
Féminin	40 (37.4)
Masculin	67 (62.6)
Indications - n patients (%)	
LAL-B	9 (8.4)
LLC compliquée en syndrome de Richter	4 (3.7)
Lymphomes non Hodgkiniens à néoplasies à cellules lymphoïdes B matures	74 (69.2)
<i>DLBCL ou DLBCL transformant</i>	70 (65.4)
<i>Lymphome du manteau</i>	2 (1.9)
<i>Lymphome folliculaire</i>	2 (1.9)
Myélome multiple	20 (18.7)
Liée à la réinjection des CAR-T	
Spécialités de CAR-T utilisées - n patients (%)	
Anti-BCMA	19 (17.8)
Idecabtagene vicleucel (Abecma®)	6 (5.6)
Ciltacabtagene autoleucel (Carvykti®)	1 (0.9)
Autres anti-BCMA	12 (11.2)
Anti-CD19	87 (81.3)
Axicabtagene ciloleucel (Yescarta®)	52 (48.6)
Brexucabtagene autoleucel (Tecartus®)	9 (8.4)
Lisocabtagene maraleucel (Breyanzi®)	3 (2.8)
Tisagenlecleucel (Kymriah®)	17 (15.9)
Protocoles autres anti-CD19	6 (5.6)
Autres cibles	1 (0.9)
SLAMF7 comme cible (essai CARAMBA)	1 (0.9)
CD19/CD20 comme cible (essai DALY-2)	0 (0.0)
Effets indésirables liés aux CAR-T - n patients (%)	
Syndrome de relargage cytokinique (CRS)	91 (85.0)
Grade 1	54 (50.5)
Grade 2	27 (25.2)
Grade 3	8 (7.5)
Grade 4	2 (1.9)
Sans CRS	15 (14.0)
NA	1 (0.9)
Syndrome de neurotoxicité associée au traitement par cellules CAR-T (ICANS)	21 (19.6)
Grade 1	9 (8.4)
Grade 2	7 (6.5)
Grade 3	4 (3.7)
Grade 4	1 (0.9)
Sans ICANS	81 (75.7)
NA	5 (4.7)
Autres symptômes ou syndrome neurologiques post-CAR-T	1 (0.9)
CRES syndrome	1 (0.9)
Réinjections suivies d'un CRS et d'un ICANS	21 (19.6)
Aucun CRS et aucun ICANS	13 (12.1)
Rechute post-CAR-T	81 (75.7)
Paramètres temporels	
Délai entre l'administration de CAR-T et le décès (médiane (mois) [min-max])	7 [0 ; 54]
Délai entre la rechute et le décès (médiane (mois) [min-max])	5 [0 ; 52]

Table 28 - Tableau récapitulatif des décès post-CAR-T. Abréviations : CRES, *CAR-T cell-related encephalopathy syndrome* ; DLBCL, lymphome B diffus à grandes cellules ; FLAIR, *Fluid attenuated inversion recovery* ; LAL-B, leucémie aiguë lymphoblastique de type B ; LLC, leucémie lymphoïde chronique ; NA, données manquantes

g) Suivi des patients au CHU de Lille post-CAR-T

Un suivi clinico-biologique assidu et régulier permet entre autres de prévenir l'apparition de rechute ou de complications post-CAR-T et d'évaluer la réponse et l'efficacité clinico-biologique du CAR-T injecté.

Après l'injection de cellules CAR-T, un examen clinique régulier est réalisé chez le patient à différents temps (1 mois, 3 mois, 6 mois, 9 mois et 1 an puis tous les ans). Il est effectué en fonction de la pathologie pour laquelle le patient est traité dans le but d'une réévaluation de la maladie et par conséquent, d'une analyse de l'efficacité du

traitement administré : en radiologie via un TEP-TDM (Tomographie par émission de positons – Tomodensitométrie) ou TEP-scan (lymphomes non-Hodgkiniens à cellules B) et en biologie via un myélogramme (330).

En biologie, après une injection de cellules CAR-T, un suivi classique du patient est préconisé avec une évaluation quotidienne de sa NFS et numération plaquettaire, son ionogramme, sa fonction rénale (urée, créatinine) et hépatique, CRP, LDH, acide urique. Un bilan de coagulation avec l'étude du taux de prothrombine, de fibrinogène et des D-dimères doit être réalisé régulièrement ainsi que le dosage des immunoglobulines IgG et des sous-classes (pour analyser la présence d'une hypogammaglobulinémie). Si une hypotension et/ou tachycardie est observée, les marqueurs cardiaques tels que les nt-pro BNP et les troponines T doivent être ajoutés au bilan biochimique pour être dosés. De même en fonction de la clinique, des sérologies virales pourront également être ajoutées.

Le suivi biologique de l'expansion des cellules CAR-T est réalisé sur sang périphérique après injection chez les patients traités. Il est possible d'effectuer un suivi dans d'autres tissus comme la moelle osseuse ou le LCR. Il est également envisageable d'examiner le contenu de la poche CAR-T immédiatement après son injection et le rinçage de la poche. Ce suivi biologique est instauré en vue de suivre l'amplitude d'expansion et de persistance des cellules CAR-T circulants après injection. De plus, cela donne une idée de la qualité du produit injecté.

Au CHU de Lille, le suivi biologique est effectué en immunologie et en virologie au Centre de biologie et pathologie (CBP) Pierre-Marie Degand. Plusieurs techniques comme la CMF, la PCR quantitative et le dosage de cytokines sont utilisées pour effectuer ce suivi (331)(Figure 46). Ici, nous allons détailler plus particulièrement le suivi par CMF réalisé au laboratoire d'immunologie.

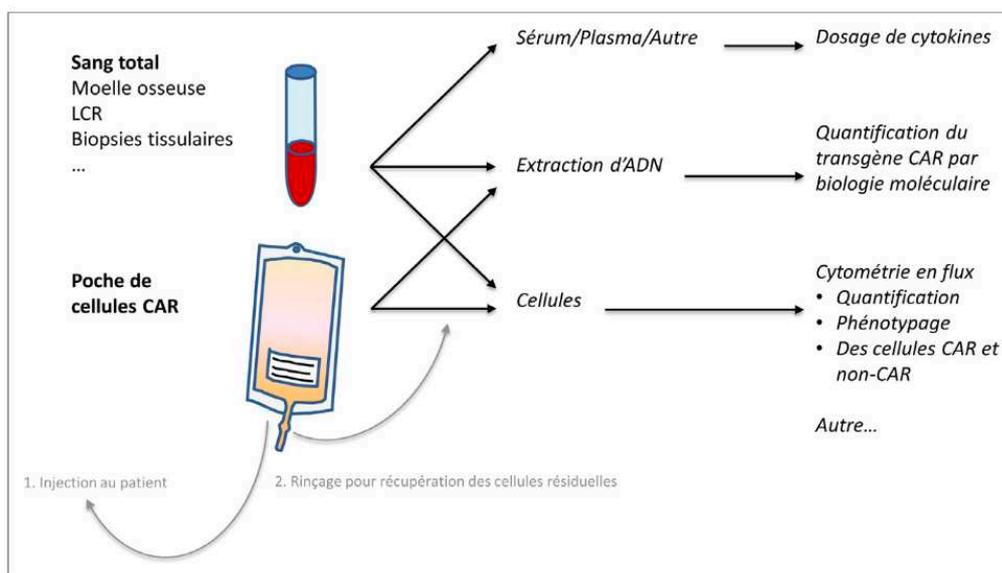


Figure 46 – Différents matrices de prélèvement et analyses réalisées pour le suivi immunologique du traitement par cellules CAR-T(331) (Extraite de Rubio et al., *Bull Cancer*, 2021) (Au CHU de Lille, la poche de cellules CAR-T n'est pas analysée en vue de quantifier le transgène CAR en biologie moléculaire)

1. Suivi immunologique par cytométrie en flux réalisé au CHU de Lille

Le suivi biologique en immunologie au CHU de Lille est effectué par CMF sur DxFlex (Beckman Coulter™, Californie) à partir de différents types de prélèvements.

Dans le sang et les liquides divers de l'organisme (LCR, moelle, liquide broncho-alvéolaire...), différentes cellules peuvent être présentes en suspension. La cytométrie en flux est une technique analytique permettant leur identification, caractérisation et quantification. Les cellules passent successivement dans une gaine fluidique et devant plusieurs faisceaux lasers ayant des longueurs d'onde différentes (sur le DxFlex, il y en a 3 avec le laser violet à 405 nm, le bleu à 488 nm et le rouge à 638 nm). Des signaux optiques basés sur la diffusion de la lumière et la fluorescence peuvent alors être générés via des détecteurs (sur le DxFlex, il y en a 13). En effet, chaque cellule passant devant un faisceau laser diffracte la lumière. Cette diffraction de lumière est mesurée soit dans l'axe de la cellule, *Forward Scatter* (FSC), permettant d'obtenir des informations sur sa taille, soit à 90°C, *Side Scatter* (SSC), donnant des indications sur la granulométrie et la structure interne de la cellule. Par ailleurs, les cellules peuvent être marquées avec des anticorps spécifiques couplés à un fluorochrome qui va émettre une fluorescence de longueur d'onde spécifique sous l'action du rayonnement laser. Ainsi, des antigènes spécifiques tels que des marqueurs de surface ou intracellulaires pourront être détectés. En outre, les signaux de fluorescence captés par le cytomètre correspondent d'une part, à la fluorescence émise par la cellule elle-même (autofluorescence) et d'autre part à la fluorescence émise par l'anticorps couplé à un fluorochrome se liant spécifiquement à une cellule. Cela permet alors d'identifier

les différents types cellulaires présents en fonction de leurs marqueurs et caractéristiques spécifiques dans le liquide étudié. Cela correspond à l'immunophénotypage cellulaire. Ensuite, les signaux lumineux émis seront transformés en signaux électroniques par des photomultiplicateurs permettant une conversion analogique digitale pour une collecte de données en échelle logarithmique suivie d'une analyse des résultats par ordinateur (Figure 47). Une fois les données collectées, une *gating* stratégie (ou stratégie de fenêtrage) doit être réfléchiée et mise en place pour séparer les différentes classes cellulaires composant le liquide étudié. Cette stratégie de *gating* est basée sur les niveaux d'expression des marqueurs antigéniques choisis à la surface ou à l'intérieur des cellules. L'étude des lymphocytes dans tout liquide peut alors être analysée par immunophénotypage lymphocytaire.

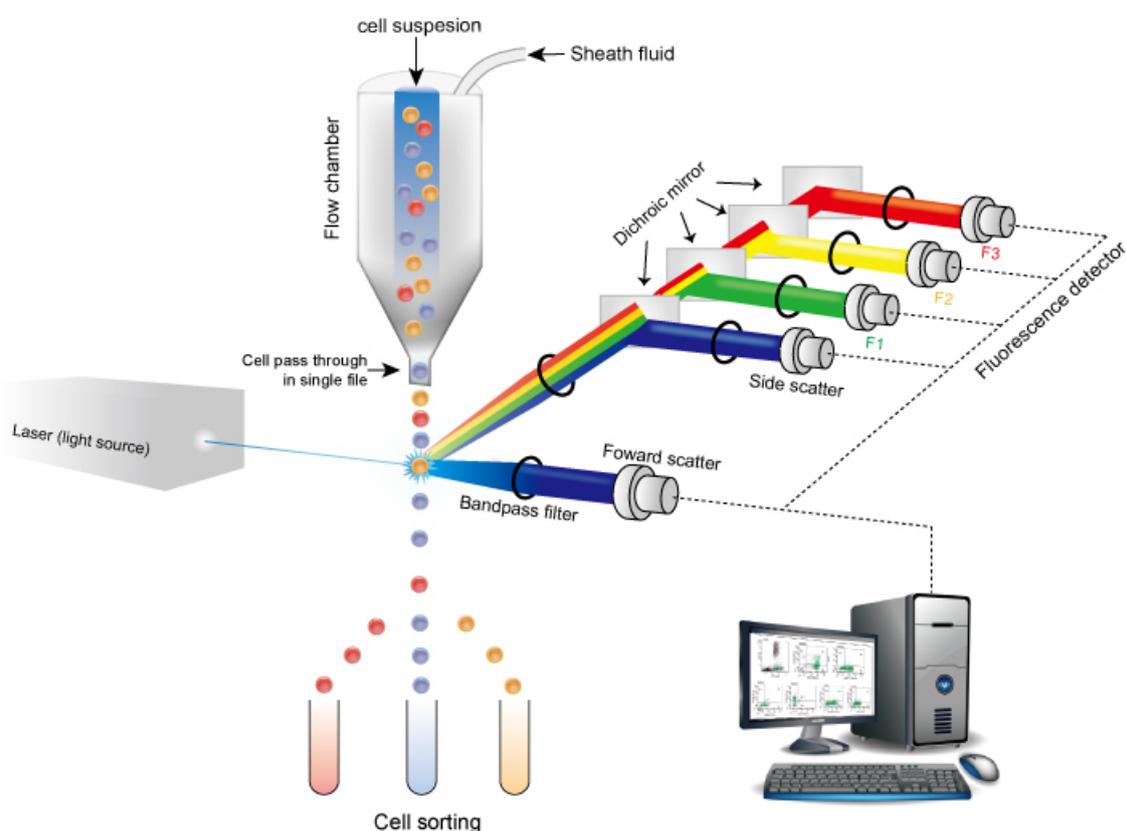


Figure 47 - Principe de la cytométrie en flux (Extrainte du guide de cytométrie en flux par *Creative Diagnostics*®(332))

Différents prélèvements sont pris en charge au cours du suivi des cellules CAR-T. Tout d'abord au moment de l'aphérèse, une portion de la poche de leucaphérèse est envoyée par l'EFS au laboratoire d'immunologie pour réaliser un immunophénotypage lymphocytaire T, B et NK (dit également standard) combiné avec l'étude des sous-populations T. L'immunophénotypage lymphocytaire standard permet de caractériser et énumérer les populations lymphocytaires T, B et NK via des marqueurs antigéniques spécifiques listés Table 29. Le CD45 est pan-leucocytaire (c'est-à-dire présent sur tous

les leucocytes) et le CD3 est exprimé par tous les lymphocytes T qui représentent la majorité des lymphocytes chez l'adulte sain (valeurs usuelles 700-1900 cellules/ μ l). Parmi les lymphocytes T, il est possible de distinguer les lymphocytes T CD4+ (dits également auxiliaires), des lymphocytes T CD8+ (appelés également cytotoxiques). Le CD45RA et le CCR7 (*CC-chemokine receptor 7*) seront également utilisés pour étudier les sous-populations lymphocytaires T. Le CD45RA est un produit de l'épissage alternatif du gène *PTPRC* exprimé par les lymphocytes T naïfs et effecteurs terminaux (appelés également de différenciation terminale). Le CCR7 (ou le CD197) est un récepteur membranaire couplé à une protéine G et est exprimé par les lymphocytes T naïfs et les lymphocytes T centraux mémoires. Les lymphocytes effecteurs mémoires n'expriment ni le CCR7 ni le CD45RA. Les lymphocytes B circulants expriment le CD19 et le CD20. Leur différenciation terminale correspond aux plasmocytes, capable de produire des anticorps circulants spécifiques à des antigènes considérés comme nocifs. Les lymphocytes B sont alors impliqués dans la réponse immunitaire humorale. Les lymphocytes NK (*Natural killer*) ont des valeurs usuelles comprises entre 100 et 400 cellules/ μ L et expriment à leur surface le CD16 et le CD56. Ils sont à la fois des cellules de l'immunité innée et de l'immunité adaptative.

Cellules	Marqueurs antigéniques utilisés
Immunophénotypage lymphocytaire standard	
Lymphocytes B	CD45, CD3- , CD19, CD20
Lymphocytes T	CD45, CD3, CD4, CD8
Lymphocytes NK	CD45, CD3- , CD16, CD56
Immunophénotypage des sous-populations lymphocytaires T	
Lymphocytes T naïfs	CD45RA, CCR7 (+ CD3 +CD4 ou CD8)
Lymphocytes T mémoires centraux	CD45RA - , CCR7 (+ CD3 +CD4 ou CD8)
Lymphocytes T mémoires effecteurs	CCR7 - , CD45RA - (+ CD3 +CD4 ou CD8)
Lymphocytes T effecteurs terminaux	CD45RA, CCR7 - (+ CD3 +CD4 ou CD8)

Table 29 – Marqueurs antigéniques utilisés pour un immunophénotypage lymphocytaire standard et celui des sous-populations lymphocytaires T. L'immunophénotypage des sous-populations lymphocytaires T est fait pour les lymphocytes T CD4+ et T CD8+.

Ensuite, des immunophénotypages sont réalisés régulièrement par CMF à partir de prélèvements sanguins sur tube EDTA à certains temps avant et après administration de CAR-T comme indiqué sur la figure 48. Sept jours avant la réinjection de CAR-T, un immunophénotypage lymphocytaire standard caractérisant et calculant le pool des lymphocytes T, B et NK des patients est effectué ainsi qu'un immunophénotypage des sous-populations lymphocytaires T. Après la réinjection de CAR-T, un suivi plus régulier sera réalisé le premier mois post-traitement avec un immunophénotypage des cellules CAR-T en CMF en plus d'un immunophénotypage standard lymphocytaire T, B et NK tous les 7 jours pratiquement. Cet agenda de suivi peut être modifié en fonction de la clinique du patient et des résultats de sa numération de formule sanguine.

De plus, le jour de l'injection, le reste de la poche de CAR-T administrée est transféré dans une seringue puis envoyée au laboratoire d'immunologie pour observer et quantifier le marquage de la protéine CAR utilisée.

En fonction du contexte clinique, le suivi dans des liquides divers (LCR, moelle osseuse...) est également possible pour rechercher la présence de CAR-T.

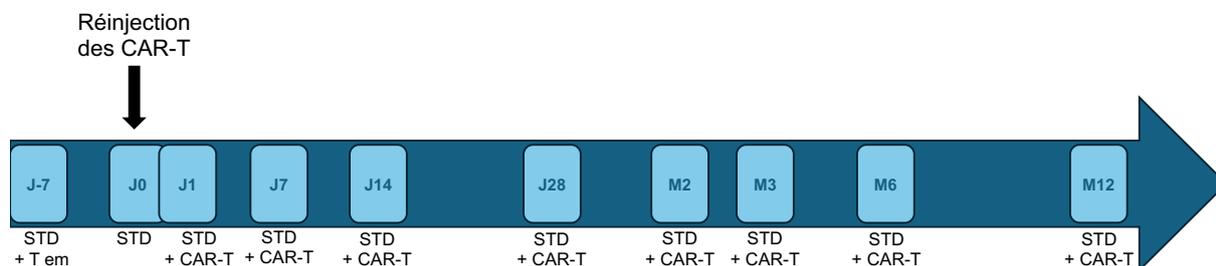


Figure 48 – Agenda de suivi immunologique des cellules CAR-T dans le sang des patients au CHU de Lille. Abréviations : STD, immunophénotypage lymphocytaire standard ; T em, immunophénotypage lymphocytaire des sous-populations lymphocytaires T ; CAR-T, immunophénotypage des CAR-T

Diverses stratégies de marquages de la protéine CAR sont possibles comme indiquées sur la figure 49A. Mais, l'utilisation de protéines cibles recombinantes solubles est considérée comme la méthode de référence en CMF étant donné qu'elle est la seule technique commercialisée et facile d'accès.

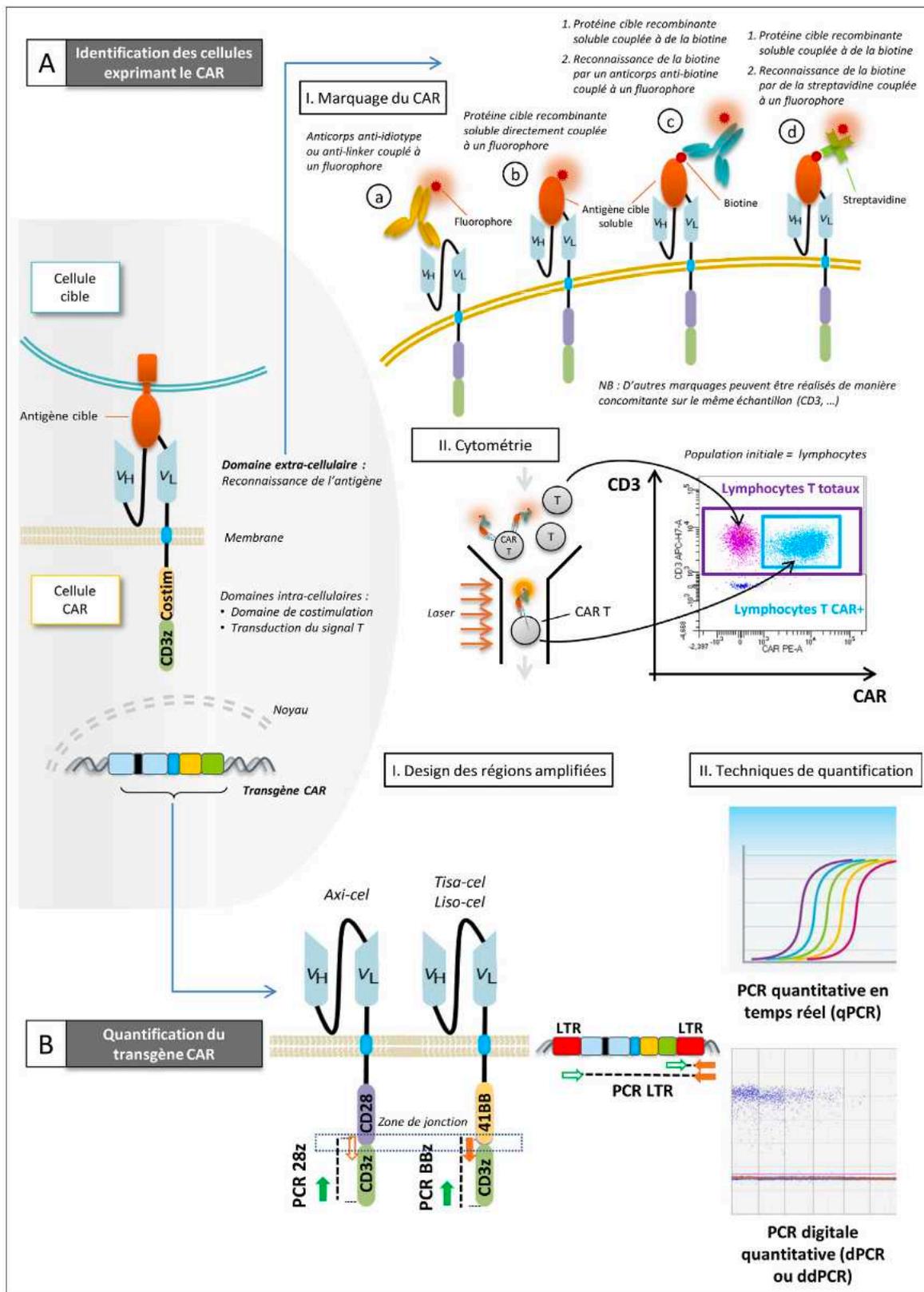


Figure 49 – Principales méthodes de détection des cellules CAR-T. (A), Identification des cellules exprimant le CAR par cytométrie en flux ; **(B),** Quantification du transgène CAR par biologie moléculaire (Extraite de Rubio et al., *Bull Cancer*, 2021)(331)

Au laboratoire d'immunologie cellulaire au CHU de Lille, le suivi des cellules CAR-T se déroule en deux étapes : tout d'abord, il y a une lyse des globules rouges puis l'immunomarquage peut être entrepris. Pour l'identification des cellules CAR-T anti-CD19, la protéine CD19, de type CD19-Fc, est directement couplée au fluorochrome

PE (phycoérythrine) pour un marquage en une seule étape (Figure 50A). Alors que pour le suivi des cellules CAR-T anti-BCMA, la protéine BCMA, est biotinylée donc le marquage se déroule en deux temps. La deuxième étape consiste en la fixation par un anticorps anti-biotine couplée au fluorochrome PE. Les protéines recombinantes utilisées viennent de Miltenyi™, Allemagne (Figure 50B). Dans l'immunophénotypage des cellules CAR-T, d'autres cibles lymphocytaires comme le CD4 et CD8 seront utilisées pour caractériser les cellules CAR-T circulantes et connaître si un contingent CAR-T (CD4 auxiliaire ou CD8 cytotoxique) est majoritaire par rapport à un autre (Figure 50)(333).

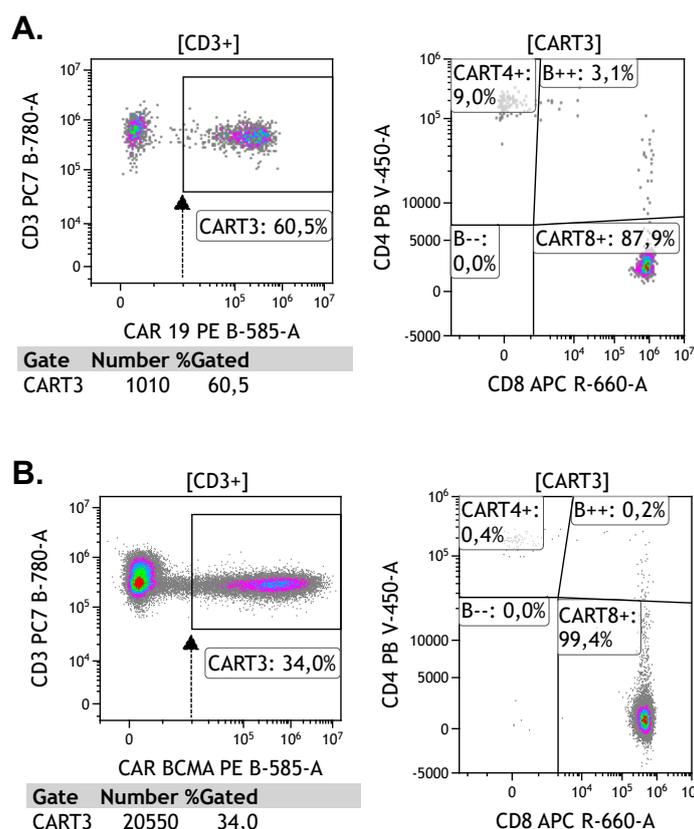


Figure 50 – Exemples d'immunophénotypages de cellules CAR-T par CMF au CHU de Lille. (A), Après injection de cellules CAR-T anti-CD19 ; **(B),** Après injection de cellules CAR-T anti-BCMA. La première fenêtre montre les cellules CD3+ caractérisant la population lymphocytaire. Les cellules CAR-T sont les cellules CD3+ et CAR-CD19 ou BCMA+. Ensuite, la deuxième fenêtre montre la répartition des lymphocytes T CD4+ et CD8+ au sein des cellules CAR-T. La stratégie de fenêtrage est issue de l'article Demaret et al., sur le monitoring des cellules CAR-T(333).

Par ailleurs, dans le suivi des cellules CAR-T par CMF, l'immunophénotypage lymphocytaire T, B et NK est associé à celui des CAR-T pour estimer en premier lieu la numération des lymphocytes B circulants. En effet, une lymphopénie B totale ou quasi-totale est le reflet de l'efficacité et du fonctionnement de CAR-T. Au CHU de Lille, pour nous assurer de la présence de cette lymphopénie B circulante chez les patients traités par cellules CAR-T, deux cibles différentes permettant la détection des lymphocytes B circulants sont utilisées : CD19 et CD20. De plus,

l'immunophénotypage lymphocytaire standard est aussi intéressante pour caractériser et chiffrer les autres cellules immunes (lymphocytes T non-CAR et NK) présentes chez le patient traité. Cela nous permet également d'évaluer l'environnement immunitaire présent et son fonctionnement en termes de cytotoxicité et de production de cytokines par exemple.

Ce suivi par CMF des cellules CAR-T permet de construire une cinétique des cellules CAR-T circulants en post-réinjection. Plusieurs paramètres temporels et quantitatifs peuvent être identifiés : Tfirst, Tmax, Cmax, Tlast et AUC0-28. Le Tfirst est le temps auquel les cellules CAR-T deviennent détectables pour la première fois après la réinjection. Le Tmax correspond au délai pour atteindre le pic d'expansion des CAR-T. La Cmax traduit le pic d'expansion en concentration maximale de cellules CAR-T circulantes en pourcentage ou valeur absolue. Le Tlast est équivalent au dernier point temporel où les CAR-T sont détectables. L'AUC0-28 représente l'aire sous la courbe entre J0 et J28 post-CAR-T et permet de quantifier de manière cumulative les cellules CAR-T circulantes pendant le premier mois de traitement.

Le contingent de CAR-T peut être généralement détecté dans les 5 premiers jours après administration pour atteindre ensuite le pic d'expansion entre J7 et J14 jours. Puis une décroissance est remarquée pour atteindre un Tlast qui peut être observé après 1 mois ou à des temps plus tardifs post réinjection (Figure 51). Tous les points temporels sont exprimés normalement en jours sauf le Tlast qui peut être aussi considéré en mois. Ces facteurs cinétiques permettent de prédire l'efficacité du traitement et le risque de rechute. La masse tumorale, la pathologie et le domaine de costimulation du CAR peuvent faire varier ces paramètres(331).

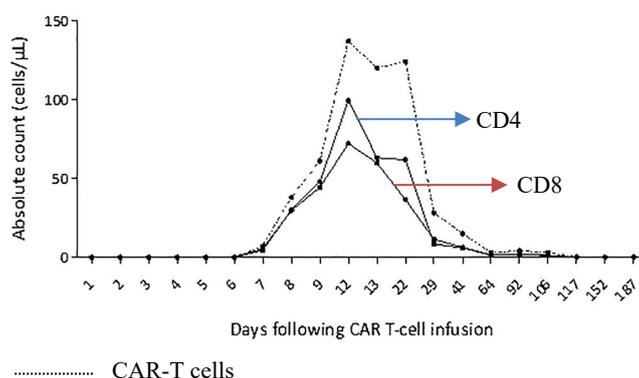


Figure 51 – Exemple d'un suivi d'une expansion de cellules CAR-T dans le sang en nombre absolu (cells/µL) et pour les sous-ensembles de cellules CAR-T CD4+ et CD8+ (Extrait de Demaret et al., *Cytometry B Clin Cytom*, 2021(333)).

2. Suivi en virologie par biologie moléculaire (PCR) au CHU de Lille

La quantification des cellules CAR-T par biologie moléculaire peut être réalisée par deux techniques différentes de PCR à partir de l'ADN extrait des cellules nucléées :

PCR quantitative (qPCR) en temps réel ou [d(d)PCR]. Cependant, la d(d)PCR présente une sensibilité, spécificité et reproductibilité supérieures dans les valeurs basses comparativement à la qPCR(334). Des séquences spécifiques du transgène CAR sont alors détectées par ces méthodes. Soit les séquences promotrices « *Long Terminal Repeat* » (LTR)(335) du vecteur viral utilisé dans la transduction du CAR ; soit le fragment spécifique de la partie scFv du CAR(336) ; soit les séquences de jonction avec les domaines de costimulation(337) peuvent être amplifiées par ces techniques (Figure 49B). Au CHU de Lille, une qPCR en temps réel amplifiant des séquences promotrices LTR est employée, en fonction du vecteur viral transduit (lentivirus (338) ou gammaretrovirus (339))(Table 30). Cette technique permet de déterminer le nombre de copies de transgène moyen par cellule. Néanmoins, ces données au CHU de Lille sont exprimées pour le lentivirus en nombre de copies pour 1 000 000 de leucocytes et pour le gammaretrovirus en copies par mL. Les paramètres cinétiques définis en CMF peuvent être transposés aux techniques de biologie moléculaire. Néanmoins, la sensibilité de la technique de détection des CAR-T est meilleure par PCR comparée à celle par CMF. Elle offre une estimation plus précise de la persistance des cellules CAR-T à long terme ; bien qu'elle ne fournisse aucune information de l'expression réelle du CAR à la surface cellulaire.

Types de CAR-T	Vecteur viral	Technique utilisée au CHU de Lille	Cible du transgène	Limite de détection	Limite de quantification
Anti-BCMA					
Idecabtagene vicleucel (Abecma®)	Lentivirus	qPCR en temps réel	LTR	40 copies / 1 000 000 cellules	50 copies / 1 000 000 cellules
Ciltacabtagene autoleucel (Carvykti®)	Lentivirus	qPCR en temps réel	LTR	40 copies / 1 000 000 cellules	50 copies / 1 000 000 cellules
Autres anti-BCMA	Lentivirus	qPCR en temps réel	LTR	40 copies / 1 000 000 cellules	50 copies / 1 000 000 cellules
Anti-CD19					
Axicabtagene ciloleucel (Yescarta®)	Gammaretrovirus	qPCR en temps réel	5'LTR	400 (2.60 log copies) copies / mL	
Brexucabtagene autoleucel (Tecartus®)	Gammaretrovirus	qPCR en temps réel	5'LTR	400 (2.60 log copies) copies / mL	
Lisocabtagene maraleucel (Breyanzi®)	Lentivirus	qPCR en temps réel	LTR	40 copies / 1 000 000 cellules	50 copies / 1 000 000 cellules
Tisagenlecleucel (Kymriah®)	Lentivirus	qPCR en temps réel	LTR	40 copies / 1 000 000 cellules	50 copies / 1 000 000 cellules
Protocoles anti-CD19	Gammaretrovirus	qPCR en temps réel	5'LTR		
	Lentivirus	qPCR en temps réel	LTR	40 copies / 1 000 000 cellules	50 copies / 1 000 000 cellules
Autres cibles					
SLAMF7 comme cible (essai CARAMBA)	Lentivirus	qPCR en temps réel	LTR	40 copies / 1 000 000 cellules	50 copies / 1 000 000 cellules
CD19/CD20 comme cible (essai DALY-2)	Lentivirus	qPCR en temps réel	LTR	40 copies / 1 000 000 cellules	50 copies / 1 000 000 cellules

Table 30 – Récapitulatif des techniques utilisées au CHU de Lille en virologie en fonction des types de CAR-T administrés. Abréviations : qPCR, PCR quantitative ; LTR, *long terminal repeat*

3. Autres analyses recommandées et optionnelles faites au CHU de Lille

D'autres tests sont mentionnés dans les recommandations de la SFGM-TC de 2021 (331) pour le suivi des patients traités par cellules CAR-T (Figure 52). Certains sont « fortement recommandés » ou « recommandés », comme respectivement, l'électrophorèse des protéines plasmatiques et le dosage des gammaglobulines à 1, 2, 3, 6 mois après injection puis tous les 6 mois ; et la quantification des cellules CAR-T dans la moelle osseuse ou le LCR par CMF quand un prélèvement est réalisé. Alors que d'autres analyses sont considérées comme « complémentaires et optionnelles » : l'immunophénotypage des sous-populations lymphocytaires T, des marqueurs d'activation (CD25 et HLA-DR) et d'épuisement (PD1/TIM3/LAG3) à plusieurs temps (J0, et 1 fois par semaine tant que le contingent de CAR-T est présent à plus de 1% des lymphocytes T CD3+) ; le dosage de cytokines (IL-6;; IL-10; TNF α ; IL-1beta) à chaque point de suivi réalisé sur tube sec par méthode ELISA (*Enzyme-linked immuno assay*) sur sang ou LCR et enfin, le phénotypage étendu en plus de la quantification des cellules CAR-T dans d'autres prélèvements que le sang (moelle osseuse, LCR, ganglions...) par CMF. La grande majorité de ces analyses est réalisée au laboratoire d'immunologie au CBP de Lille sauf l'électrophorèse des protéines plasmatiques et le dosage des gammaglobulines effectués dans le secteur des protéines. Cependant, le panel pour caractériser les sous-populations lymphocytaires T d'épuisement par CMF n'est pas encore mis en place au laboratoire d'immunologie du CBP de Lille.

	Produit d'aphérèse ou sang périphérique 	CART-cells  Sur poche après déperfusion	Patient  Dans le sang périphérique ou autre tissu quand précisé
Analyses Fortement recommandées			<ul style="list-style-type: none"> ✓ Quantification des cellules CAR-T par CMF (% et VA): -à J0, 2 à 3x/sem jusqu'à J21, J28=M1, M2, M3, M6 puis/6 mois (arrêt en cas de disparition du signal) ✓ Quantification des Lymphocytes T (CD3, 4, 8), B et NK: -à chaque point d'analyse des CAR-T ✓ EPP et gammaglobulines : -à M1, M2, M3, M6 puis / 6 mois
Analyses Recommandées	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Phénotypage des lymphocytes: -T CD3, CD4, CD8 -B, NK -T naïfs/mémoires ✓ Congélation de sérum 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Phénotypage des CAR-T: -viabilité et % ✓ Phénotypage T : -CD3/4/8 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Quantification des cellules CAR-T par PCR : -Après disparition du signal en CMF puis M2, M3, M6 puis / 6 mois ✓ Quantification des cellules CAR-T dans la MO et le LCR : -lors de prélèvements dans ces tissus ✓ Congélation de sérum: - Pour dosage de cytokines ou sBCMA à J0 et à chaque point de suivi des CAR-T
Analyses Optionnelles			<ul style="list-style-type: none"> ✓ Phénotypage élargi des lymphocytes T: -à J0 et 1 fois par semaine tant que CAR-T > 1% des T CD3 -T naïfs/mémoires, marqueurs d'activation (CD25, HLA-DR) et d'épuisement (PD1/Tim3/ LAG3) ✓ A chaque point de suivi des CAR-T : -reconstitution des populations immunes non CAR (T, NK, monocytes...) -dosages de cytokines ou congélation de sérum (protocoles recherche) ✓ Quantification des cellules CAR-T et phénotypage étendu dans d'autres prélèvements que le sang (PL, MO, ganglion..)

Figure 52 - Recommandations de la SFGM-TC dans le suivi des patients traités par cellules CAR-T (Extraite de Rubio et al., *Bull Cancer*, 2021)(331). Abréviations : EPP, électrophorèse des protéines plasmatiques ; LCR, liquide céphalo-rachidien ; MO, moelle osseuse ; PL, ponction lombaire ; VA, valeurs absolues

III. Rationnel et objectifs

Les LAM sont des hémopathies considérées comme très agressives et caractérisées par une faible survie globale et un taux élevé de rechute. Les LAM CD19+ sont particulièrement associées à un pronostic défavorable, en raison de l'expression aberrante du CD19 à la surface des blastes myéloïdes. Depuis plus de 40 ans, le traitement standard des LAM repose sur une chimiothérapie intensive associée dans certains cas à une allogreffe de CSH. Toutefois, grâce aux avancées technologiques récentes, à une meilleure compréhension de la physiopathologie des LAM et à l'essor des immunothérapies dans la production thérapeutique, de nouvelles stratégies de traitements plus ciblées peuvent être envisagées. Dans le traitement des hémopathies malignes à cellules B, les cellules CAR-T représentent une innovation thérapeutique majeure. Mais, la mise en œuvre de cette technologie peut s'avérer complexe selon la cible choisie. Initialement, les antigènes cibles privilégiés étaient le CD33 et le CD123, exprimés majoritairement sur les blastes myéloïdes dans les LAM. Cependant, ces marqueurs se retrouvent à la fois à la surface des cellules leucémiques mais aussi des cellules souches et progénitrices hématopoïétiques normales (114). Ainsi, cibler préférentiellement les phénotypes aberrants exprimés par les cellules blastiques grâce aux cellules CAR-T constitue une stratégie prometteuse. L'expression aberrante du CD19 sur les blastes myéloïdes est communément associée à la translocation $t(8;21)(q22;q22)/RUNX1::RUNX1T1$ bien que d'autres anomalies cytogénétiques ont déjà été rapportées avec un diagnostic de LAM CD19+. L'équipe de Ma et al.(116) s'est intéressé à cette hémopathie rare, LAM CD19+, et a, par conséquent, proposé pour cette indication, une production de cellules CAR-T anti-CD19 de seconde génération avec un domaine de costimulation 4-1BB. Une étude de cytotoxicité a pu être menée par cette équipe montrant une lyse des cellules CD19+ CD33+ confirmant leur potentiel effet thérapeutique dans ce sous-type spécifique de LAM. Par ailleurs, Danylesko et al (117) ont montré l'induction d'une rémission clinique *in vivo* chez un patient atteint de LAM CD19+ en rechute par cellules CAR-T anti-CD19 avec un domaine de costimulation basé sur le CD28. Dans ce *case report*, le protocole clinique (NCT02772198) initialement destiné aux hémopathies malignes de la lignée B a été modifié pour inclure ce patient et concerner ainsi toutes les hémopathies malignes dans un cadre plus général. Cette expérience a d'ailleurs permis à cette équipe israélienne d'ouvrir un nouveau protocole clinique (NCT04257175) spécifiquement pour l'administration de cellules CAR-T CD19 chez des patients atteints de LAM CD19+ avec une translocation $t(8;21)$. Un autre essai clinique est également en cours en Chine pour évaluer l'efficacité des cellules CAR-T dirigées contre le CD19 dans les

cas de LAM chez l'adulte en rechute et réfractaire (R/R) (NCT03896854). De plus, une équipe néerlandaise a publié très récemment une étude promouvant des thérapies ciblant le CD19 (blinatumomab et les cellules CAR-T CD19) en pédiatrie dans un contexte de LAM CD19+ t(8 ;21) en rechute et réfractaire (106). Tous ces travaux ont renforcé notre intérêt pour l'utilisation de cellules CAR-T dans les LAM CD19+ en rechute et réfractaire. Au CHU de Lille en collaboration avec celui de Rouen, la production académique de cellules CAR-T anti-CD19 de seconde génération, intégrant un domaine de costimulation 4-1BB est en cours de mise en place afin de traiter les patients atteints de LAM R/R CD19+ dans le cadre de l'étude CARLA-M19. Cette production académique présente plusieurs avantages, notamment la réduction des coûts (un traitement CAR-T coûte entre 350 000 et 400 000 euros) et l'élimination des étapes de cryoconservation et de décongélation, pouvant fragiliser les cellules CAR-T (340). Un autre avantage de cette production académique réside dans cette indication thérapeutique pour laquelle ces cellules CAR-T sont produites. En effet une hémopathie rare intéresse moins les industriels. Par conséquent, le fait de développer ce traitement dans une structure académique permet aux patients souffrant de cette pathologie d'avoir accès à une solution thérapeutique possible. Par ailleurs, une production académique permet de pouvoir modifier plus facilement les procédures si besoin et d'avoir une caractérisation plus affine et précise des produits à tout moment de la fabrication.

Pour obtenir une autorisation d'essai clinique de la production académique par l'ANSM, il est nécessaire de respecter les lignes directrices publiées par l'EMA, qui détaillent la validation du processus de fabrication des cellules génétiquement modifiées (341). La production académique de cellules CAR-T est généralement réalisée dans des structures publiques. Elle est régie par les bonnes pratiques de fabrication (BPF), telles que définies dans les référentiels européens et français. Les BPF encadrent tout le processus de production des cellules CAR-T, tout en définissant les contrôles qualité à effectuer (342).

De plus en plus d'établissements commencent à obtenir une autorisation pour réaliser une production académique de cellules CAR-T. Par exemple, une équipe à Barcelone a développé une production académique de cellules CAR-T anti-CD19 de deuxième génération, visant à améliorer l'accessibilité des traitements et démontrer la faisabilité d'une production à grande échelle grâce à des pratiques et outils spécifiques (343). Étant donné les résultats très probants de cette équipe et comparables aux traitements commercialisés (344), l'agence du médicament espagnole l'a autorisé à pouvoir traiter

des patients adultes atteints de LAL R/R (345). Cet exemple motive ainsi notre équipe pour la production académique de cellules CAR-T en cours.

Les principaux objectifs de cette thèse incluent, dans un premier temps, la mise en place d'une technique pour démontrer la fonctionnalité et la cytotoxicité *in vitro* des cellules CAR-T produites au CHU de Lille en vue de soumettre une demande d'essai clinique auprès de l'ANSM pour les LAM R/R exprimant le CD19, conformément aux lignes directrices de l'*European Medicines Agency* (EMA). Ensuite, un test de contrôle qualité faisable et reproductible en routine a été également mis au point pour participer à la production des cellules CAR-T. L'ensemble de ces analyses a comme finalité de montrer le potentiel des cellules CAR-T dirigées contre le CD19 et produites au CHU de Lille à l'échelle académique dans le traitement des LAM CD19+ R/R.

IV. MATÉRIEL ET MÉTHODES

A) Les cellules CAR-T et cultures cellulaires utilisées

a) Présentation des lignées cellulaires utilisées

1. *Cellules mononucléées (Lymphocytes T et B)*

Les CMN hétérologues aux cellules utilisées pour la production de cellules CAR-T provenaient de reliquats de soin (aucun tube supplémentaire n'a été prélevé). Les CMN autologues provenaient des couches leuco-plaquettaires (CLP) de l'EFS. Elles ont été cryopréservées avant la production de chaque série de cellules CAR-T. Elles ont été employées pour la mise au point des techniques d'efficacité et de fonctionnalité des cellules CAR-T. L'isolement de ces cellules a été réalisé par technique de gradient de densité sur une solution de polysaccharide, Pancoll humain (Pan Biotech®, Allemagne) après centrifugation (1800 RPM (*revolutions per minute of rotor*), pendant 30 minutes à 20°C). Un anneau cellulaire a ensuite été récupéré et lavé dans un milieu *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI) (Gibco™, Thermo Fisher Scientific™, Massachusetts, États-Unis). Puis, un tri immunomagnétique a été réalisé avec un kit immunomagnétique (EasySep® Stemcell™, France). Afin d'isoler les lymphocytes B, les CMN ont ainsi été incubées durant 10 minutes avec un cocktail d'anticorps spécifiques (tri négatif), puis durant 5 minutes avec des billes magnétiques. Enfin, la préparation a été placée sur un aimant pendant 5 minutes. La suspension cellulaire récupérée correspond alors à la fraction de lymphocytes B purifiés. A l'inverse, pour les lymphocytes T, c'est la fraction fixée sur l'aimant qui est récupérée (tri positif CD4+). Des aliquots de chaque type cellulaire ont été congelés à -80°C.

2. *Blastes LAM CD19+ et CD19-*

Les blastes myéloïdes de patients LAM CD19+ et CD19- ont été cryopréservés à -80°C. Elles ont été fournies par la tumorothèque du Centre de Référence Régional en Cancérologie de Lille. Elles ont été conservées d'après les recommandations de la Haute Autorité de Santé (HAS) de 2009 (346). Le procédé de congélation à -80°C commence par une séparation sur pancoll ou une lyse macrovolume. Les cellules sont ensuite centrifugées pendant 10 minutes à 4°C à 3000 RPM et le culot est repris par une solution avec du sérum de veau foetal (SVF) décomplémenté. L'ensemble est réparti dans des cryotubes dans lesquels sont ajoutés 10% de diméthylsulfoxyde (DMSO). Ils sont ensuite congelés à -80°C. Les blastes sont décongelés au moment de leur utilisation avec un passage au bain-marie à 37°C, suivi d'un lavage au RPMI. Puis une numération initiale des cellules décongelées est réalisée par CMF.

3. *RAJI*

La lignée cellulaire RAJI a été établie par R.J.V Pulvertaft en 1963 (347). C'est la première lignée cellulaire hématopoïétique humaine continue. Elle représente une lignée cellulaire lymphoblastique B (EBV+) humaine issue à l'origine d'un lymphome de Burkitt d'un enfant de sexe masculin âgé de 11 ans provenant du Nigeria (348). Les cellules RAJI expriment les marqueurs des lymphocytes B à leur surface membranaire, comme les antigènes CD19 et CD20 (Figure 53A). Les cellules RAJI ont été cultivées dans des flasques de culture cellulaire (Falcon®, New-Jersey, États-Unis), en milieu RPMI 1640 (1X) supplémenté en L-glutamine (Gibco™, Thermo Fisher Scientific™, Massachusetts, États-Unis), additionné de 10% de SVF décomplémenté (Gibco™, Thermo Fisher Scientific™, Massachusetts, États-Unis) et 1% de pénicilline-streptomycine (concentrations de 10 000 unités/mL de pénicilline et de 1 000 µg/mL de streptomycine) (Gibco™, Thermo Fisher Scientific™, Massachusetts, États-Unis)). Puis elles sont incubées à 37°C avec 5% CO₂. Le milieu de culture est renouvelé tous les deux jours jusqu'à l'utilisation de cette lignée cellulaire dans les tests de cytotoxicité.

4. *MOLM-13 (CD19- et CD19+)*

Les cellules MOLM-13 sont dérivées d'une lignée cellulaire humaine établie en 1995 à partir du sang périphérique d'un patient de 20 ans atteint de LAM 5a (d'après la classification FAB) en rechute. Initialement, les MOLM-13 *wild-type* (WT) expriment à leur surface membranaire le CD33 mais sont dépourvues de CD3 et de CD19 (349). Elles sont nommées ici MOLM-13 CD19⁻ (Figure 53B). Dans cette étude, nous disposons de deux lignées cellulaires MOLM-13 : une WT et une exprimant le CD19 à sa surface membranaire. En effet, la lignée cellulaire MOLM-13 initiale a été modifiée

pour exprimer à sa surface le marqueur des lymphocytes B, le CD19. Pour la distinguer de celle citée précédemment, elle est nommée MOM-13 CD19⁺. De par cette modification d'expression membranaire, les MOLM-13 CD19⁺ connaissent deux niveaux d'expression du CD19 : soit *low* pour 40% d'entre elles soit *high* pour 60% (Figure 53C). Les cellules MOLM-13 sont fréquemment utilisées *in vitro* comme modèles de LAM permettant d'étudier et de tester les mécanismes sous-jacents montrant l'efficacité d'une thérapeutique possible, comme dans notre étude, celle de CAR-T anti-CD19. Elles présentent comme propriété caractéristique le fait de se multiplier et de proliférer rapidement *in vitro*. Les cellules MOLM-13 (CD19⁻ et CD19⁺) ont été obtenues auprès du CHU de Rouen. Après réception, elles ont été cultivées et maintenues dans 10 mL de milieu RPMI supplémenté avec 10% de SVF et 1% de pénicilline-streptomycine et incubées à 37°C dans une atmosphère contenant 5% de CO₂.

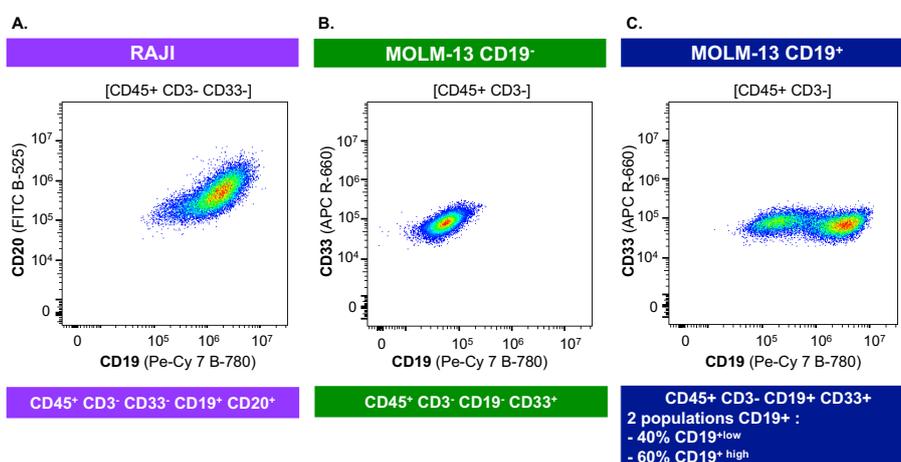


Figure 53 - Présentation des lignées cellulaires utilisées. (A), RAJI ; (B), MOLM-13 CD19⁻ ; (C), MOLM-13 CD19⁺

b) Présentation des cellules CAR-T produites et utilisées

1. Production des cellules CAR-T

La production académique de cellules CAR-T au CHU de Lille et au CHU de Rouen est en partenariat avec la société Miltenyi Biotec™. Les cellules CAR-T ont été générées avec le CliniMACS Prodigy® (Miltenyi Biotec™, Allemagne), qui est un système automatisé et clos (Figure 54A et B).

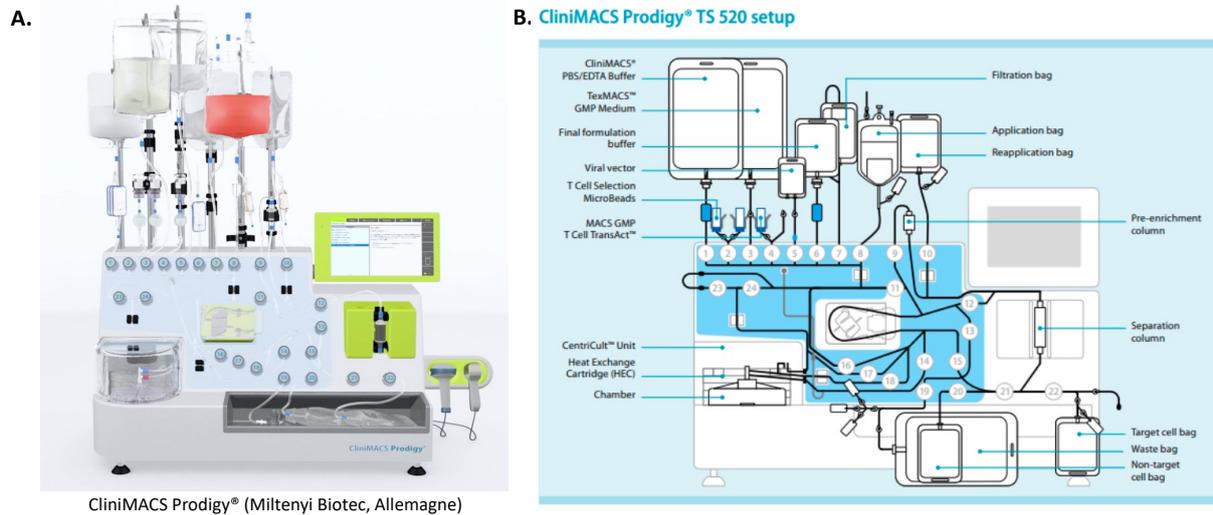


Figure 54 – CliniMACS Prodigy® (Miltenyi Biotech™, Allemagne) (A), Visual et vue d'ensemble de l'automate et **(B),** Détail des différentes parties composant l'automate

Les cellules CAR-T ont été produites dans les 2 CHU à partir de CLP provenant de l'EFS. Le processus de production est schématisé Figure 55A et le protocole est plus détaillé Figure 55B avec les temps correspondants. Le nombre de CD3+ parmi les CMN de ce produit cellulaire est ensuite calculé pour connaître une estimation de la numération des lymphocytes T. Puis une sélection magnétique des cellules CD4+ et CD8+ du produit est réalisée. La mise en culture nécessite une quantité minimale de l'ordre de 10^8 lymphocytes T (CD4+ et CD8+) sélectionnés dans un milieu favorable à leur expansion. Le reste des cellules CD4+ et CD8+ peut être cryoconservé et utilisé comme cellules contrôles lors de tests à effectuer. L'activation des lymphocytes T constitue l'étape suivante et qui favorisera une meilleure intégration du transgène. Elle sera réalisée *in vitro* à l'aide d'une nanomatrice polymère colloïdale soluble conjuguée à des agonistes CD3 et CD28 humanisés, TransAct™, fournissant des signaux primaires et costimulants pour une stimulation des lymphocytes T optimisée et efficace. A la suite de l'étape d'activation, un vecteur lentiviral approvisionné par Miltenyi contenant le transgène du CAR souhaité (scFv de CD19 avec un domaine de costimulation 4-1BB), permet la transduction des cellules T pendant au maximum 48h de contact. La quantité de vecteur à utiliser est déterminée par la *Multiplicity of infection* (MOI), qui correspond à l'équivalent du nombre de virus vectoriel par rapport au nombre de cellules à transduire. La MOI doit être de l'ordre de 10 pour être efficace. La phase de transduction se finit par des étapes de rinçage pour retirer l'excès de vecteur n'ayant pas été intégré par les cellules T. Les lymphocytes T, une fois, transduits, sont maintenus en culture dans le milieu TexMACS™ pendant une période de 12 jours. Ce milieu est enrichi d'interleukines telles que l'IL-7 et l'IL-15, nécessaires pour promouvoir une meilleure expansion des lymphocytes T mémoires (Figure 55B).

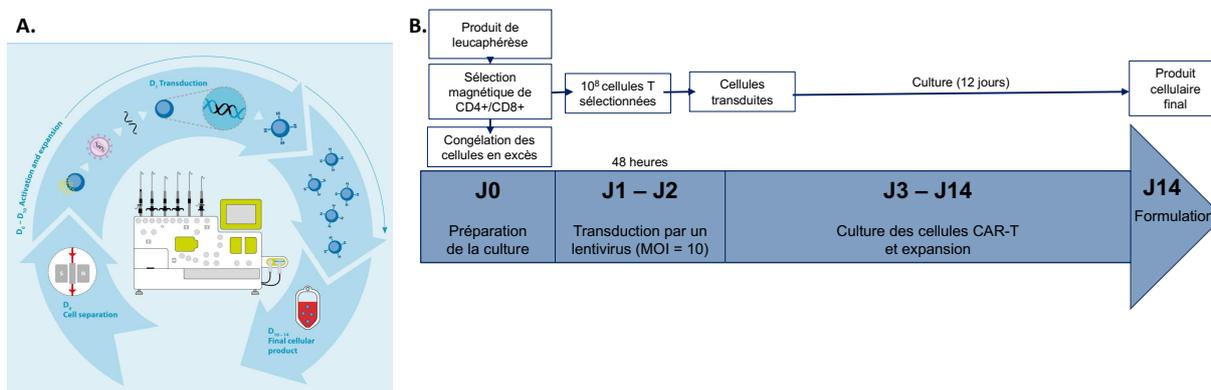


Figure 55 – Production des cellules CAR-T(350) (A), Principe du processus de transduction des cellules T sur le CliniMACS Prodigy® (Miltenyi Biotech™, Allemagne) ; **(B)**, Protocole de production des cellules CAR-T avec l'utilisation du CliniMACS Prodigy®(Miltenyi Biotech™, Allemagne). Abréviations : JX, jour et x correspondant à un chiffre ou nombre ; MOI, *Multiplicity of infection*

2. Cellules CAR-T produites et utilisées

Deux séries de cellules CAR-T ont été produites à Lille, les cellules CAR-T VALTECH 1 et les cellules CAR-T VALTECH 2, ainsi nommées car validées techniquement. Leur pourcentage de transduction, ainsi que leurs phénotypes CD4+/CD8+ sont détaillés ci-dessous (Table 31). Une série de cellules produites par le même procédé par le CHU de Rouen a également été testée dans les expériences préliminaires. Les deux séries de CAR-T de Lille ont été conservées dans du CryoStor® (STEMCELL Technologies™, BioLife Solutions, Washington, États-Unis) à -80°C.

	Cellules CAR-T VALTECH 1 (57.1% de cellules CAR+)	Cellules CAR-T VALTECH 2 (40.8% de cellules CAR+)
CAR CD4+	86.24%	60.72%
CAR CD8+	11.27%	29.8%
CAR CD4+ CD8+	2.39%	9.41%
CAR CD4- CD8-	0.10%	0.07%

Table 31 - Efficacité de transduction et phénotype des cellules CAR-T VALTECH 1 et 2.

3. Contrôles qualités des cellules CAR-T produites et utilisées

Pour valider cette fabrication de cellules CAR-T, plusieurs contrôles qualités sont mis en œuvre à chaque étape afin de garantir leur sécurité et efficacité (351,352). L'innocuité est évaluée par des analyses de sécurité microbiologique et de bonne transduction virale, qui sont obligatoires pour la libération des lots. D'autres tests, bien que non obligatoires, sont fortement recommandés pour évaluer la composition, la caractérisation et l'efficacité des cellules CAR-T afin d'assurer une maîtrise approfondie du processus de production académique. Ce travail s'inscrit dans le cadre de la demande d'autorisation de production auprès de l'ANSM qui nécessite la réalisation de tests de fonctionnalité des cellules CAR-T. Nous nous sommes ainsi focalisés sur les études de cytotoxicité et les capacités fonctionnelles des cellules CAR-T VALTECH 1 et 2 pour évaluer leur puissance et leur efficacité.

4. Tri FACS (*fluorescence-activated cell sorting*)

Pour certains tests, un tri des cellules CAR-T après production a été réalisé. Les cellules T transduites ont été incubées au préalable avec l'anticorps CAR CD19 FMC63 idiotype PE (Miltenyi Biotech™, Allemagne), durant 10 minutes, avant d'être lavées. Ces cellules ont été triées et séparées en deux fractions grâce au BD FACS Aria II (BD Biosciences™, Californie, États-Unis) sur le principe de la cytométrie en flux, avec d'une part les cellules CAR-T qui étaient marquées par l'anticorps idiotypique, et d'autre part les cellules T non transduites, qui n'étaient pas marquées.

B) Étude de la cytotoxicité des cellules CAR-T issues de la production académique

Pour évaluer la cytotoxicité spécifique *in vitro*, l'objectif de ce travail est de mettre en place un test mesurant la lyse des cellules cibles par les cellules CAR-T en coculture. Les cellules CAR-T VALTECH 1 et 2 ont été produites pour cibler des cellules tumorales, ici, des blastes myéloïdes, exprimant le CD19. Par conséquent, via ce test de cytotoxicité, cela nous permet également d'évaluer l'effet des cellules CAR-T produites sur leurs cellules cibles spécifiques, ce qui sera le reflet de la destruction *in vivo* attendue chez un patient. Plusieurs tests existent pour évaluer ce paramètre et sont exposés en Table supplémentaire 4. Nous avons choisi d'étudier la cytotoxicité des cellules CAR-T VALTECH 1 et 2 par cytométrie en flux en analysant la viabilité des cellules cibles à l'aide d'un marquage par 7-Aminoactinomycine D (7-AAD).

a) Étude de la cytotoxicité des CAR-T par CMF

1. Schéma expérimental général

L'évaluation de la cytotoxicité par les cellules CAR-T VALTECH 1 et 2 est réalisée par CMF après incubation des cellules CAR-T avec une lignée cellulaire. Lors des tests préliminaires pour la mise au point de la technique, nous avons utilisé plusieurs types de cibles : cellules B hétérologues et autologues, blastes myéloïdes CD19⁺ et RAJI, en contact ou non avec les cellules CAR-T et de lymphocytes T. Différents ratios effecteur : cible (E :C) (E=Effecteur correspondant aux cellules CAR-T et C=Cible cellulaire testée) ont été testés afin de déterminer celui qui est le plus optimal pour les expériences suivantes. Différentes conditions (en présence ou non de cellules CAR-T) ont ensuite été étudiées avec des cellules RAJI, MOLM-13 CD19⁺ et CD19⁻. Nous cherchons à évaluer par CMF, notamment via l'utilisation du 7-AAD, la lyse des cellules cibles à différents temps post-coculture (H0, H5, H24 (H en heure)), ce qui nous permettra d'avoir à la fois un reflet de la viabilité de ces cellules et de la cytotoxicité des cellules CAR-T. En effet, si les cellules sont 7-AAD⁺, cela signifie qu'elles sont mortes.

De plus, à ces différents temps de coculture, nous allons évaluer l'expression du marqueur CD19 à la surface des cellules cibles en présence des cellules CAR-T. Dans une seconde expérience, il a été intéressant d'observer la lyse des cellules cibles mises en culture avec les cellules CAR-T à un temps plus avancé que 24 heures. Nous avons donc laissé incuber les cocultures et les lignées cellulaires seules (utilisées comme témoin) jusqu'à H30. Toutes ces expériences de CMF ont été réalisées sur DxFlex (Beckman Coulter™, Californie).

2. Préparation technique

Les cellules CAR-T et lignées cellulaires testées (Lymphocytes B, blastes myéloïdes CD19⁺, RAJI, MOLM-13 CD19⁺ et CD19⁻) ont été mises en coculture dans du milieu AIM-V (Gibco™, Thermo Fisher Scientific™, Massachusetts, États-Unis) à une concentration de 1 500 cellules/mL avec le ratio E:C sélectionné lors de la phase de mise au point technique. Pour préparer cette mise en culture ou en coculture, il faut réaliser au préalable, une numération de chaque lignée cellulaire et des cellules CAR-T utilisées à l'aide d'un immunomarquage du CD45 seul pour les lignées cellulaires et associé à celui de la protéine CAR CD19 pour la numération des cellules CAR-T. Pour la seconde expérience, nous avons ajouté le 7-AAD à cette numération cellulaire, afin de prendre en compte le pourcentage de cellules CAR-T mortes dans le calcul du ratio E:C. Après incubation pendant 10 minutes à l'obscurité, des billes de comptage fluorescentes (FlowCount®, Beckman Coulter, Californie, États-Unis) sont ajoutées au culot avec quelques gouttes de PBS. L'analyse est réalisée sur un cytomètre en flux DxFlex® (Beckman-Coulter). A partir des calculs du ratio et de concentrations cellulaires, les cellules cibles testées ont été cultivées en présence de cellules CAR-T ou seules dans des plaques de 6 puits à fond plat (Corning™, État de New York, États-Unis). Un volume de 50 µL de coculture et de culture seule a été prélevé à différentes heures (H0, H5, H24 pour la première expérience et pour la deuxième, H30 a été ajoutée) pour être ensuite analysé en CMF. Les marquages membranaires ont été réalisés avec les anticorps énumérés dans la Table 2.

Anticorps	Fluorochrome	Clone	Longueur d'onde	Laser (DXFlex®)	Fournisseur
Anti-CD45	Krome Orange	J33	525	405	Beckman Coulter™, Californie
Anti-CD20	FITC	B-Ly1	525	488	Beckman Coulter™, Californie
CAR CD19 FMC63 Idiotype	PE	RE1297	585	488	Miltenyi Biotech™, Allemagne
Aminoactinomycine D (7-AAD)	Pe-Cy5.5		690	488	BioLegend®, Californie
Anti-CD19	Pe-Cy7	J4,119	780	488	Beckman Coulter™, Californie
Anti-CD33	APC	P67-6	660	635	BD Biosciences®, New Jersey
Anti-CD3	APC – Alexa Fluor 750	UCHT1	780	635	Beckman Coulter™, Californie

Table 32 – Panel d'anticorps utilisés pour les cocultures

La viabilité cellulaire a été évaluée par le marquage d'un intercalant de l'ADN, le 7-AAD en Pc5.5 (BioLegend®, Californie, États-Unis). Les cellules ont été incubées avec les anticorps pendant 10 minutes à l'obscurité, puis des billes de comptage fluorescentes (FlowCount®, Beckman Coulter™, Californie) ont été ajoutées, permettant de faire une numération de ces cellules. La lecture des immunomarquages a été réalisée par le cytomètre DxFlex. Les données ont été analysées avec le logiciel Kaluza (Beckman Coulter™, Californie) pour les résultats préliminaires alors que pour les données de CMF des premières et deuxièmes expériences, via le logiciel FlowJo (version 10.10.0).

3. Stratégies de fenêtrage (ou Gating strategies)

a. Coculture CAR-T et lymphocytes B ou blastes myéloïdes CD19+ ou RAJI (résultats préliminaires)

La mise au point de la technique utilisée pour l'étude de la cytotoxicité des cellules CAR-T produites a nécessité des tests préliminaires. Dans ces premières expériences, des cellules lymphocytaires B, des blastes myéloïdes CD19⁺ et des cellules RAJI ont été utilisées. La stratégie de fenêtrage est exposée ci-après. Les cellules viables en coculture ont été analysées selon leur taille et leur structure [*Cells*] (Figure 56A). Puis les lymphocytes ont été fenêtrés sur la base de l'expression membranaire de CD45 [*Ly*] (Figure 56B). Parmi les lymphocytes, les cellules CAR-T ont été ciblées avec une expression positive de CD3, les lymphocytes B et RAJI par l'expression positive de CD20 (Figure 56C). La même analyse est effectuée sur les blastes en les ciblant grâce à leur expression de CD33. Les cellules cibles mortes sont sélectionnées par leur expression positive du 7-AAD (Figure 56D).

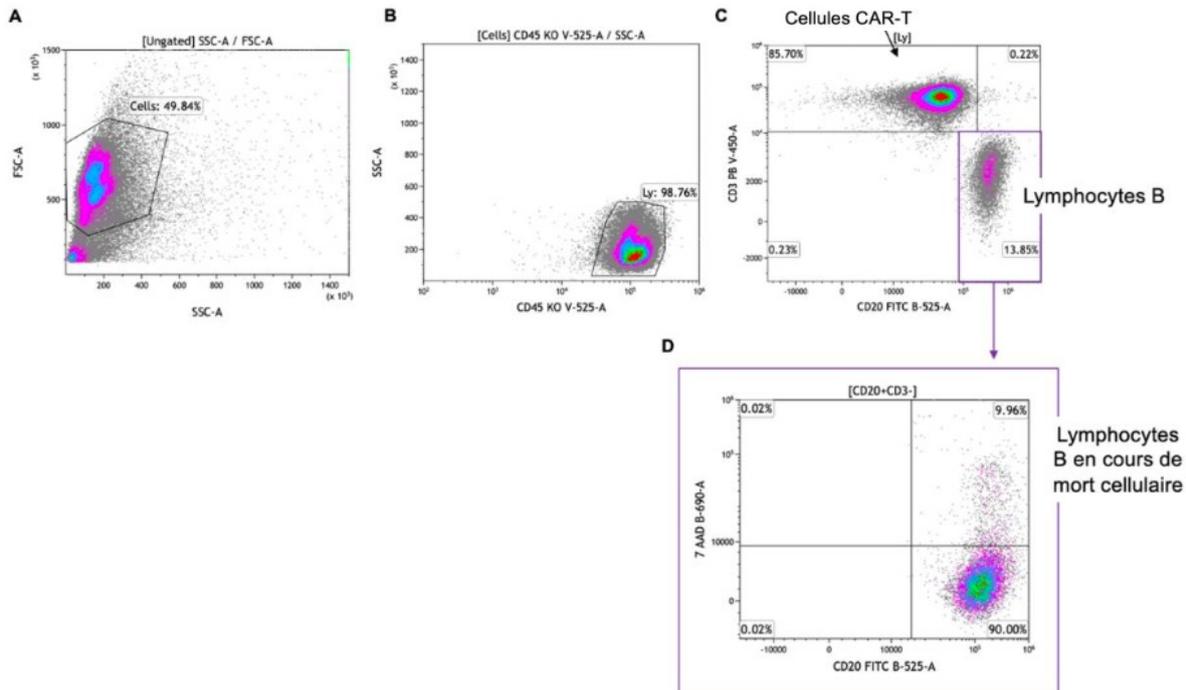


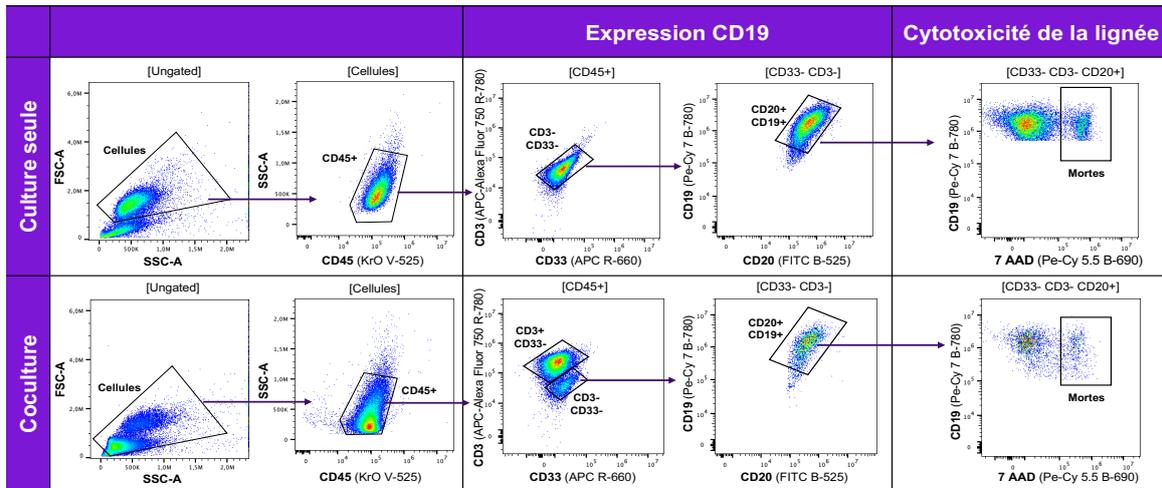
Figure 56 - Exemple de stratégie d'analyse d'une coculture avec des cellules CAR-T et des lymphocytes B. (A), Ciblage des cellules viables selon leur taille et leur structure ; **(B)**, Ciblage des lymphocytes avec le CD45 à partir des cellules viables ; **(C)**, Ciblage des cellules CAR-T avec le CD3 et des lymphocytes B avec le CD20 à partir des lymphocytes ; **(D)**, Ciblage du 7-AAD+ sur les lymphocytes B CD20+ (réalisée à l'aide de Kaluza)

- b. Cocultures et cultures seules avec les différentes lignées cellulaires (RAJI, MOLM-13 CD19+ et CD19-) dans les premières et deuxièmes expériences

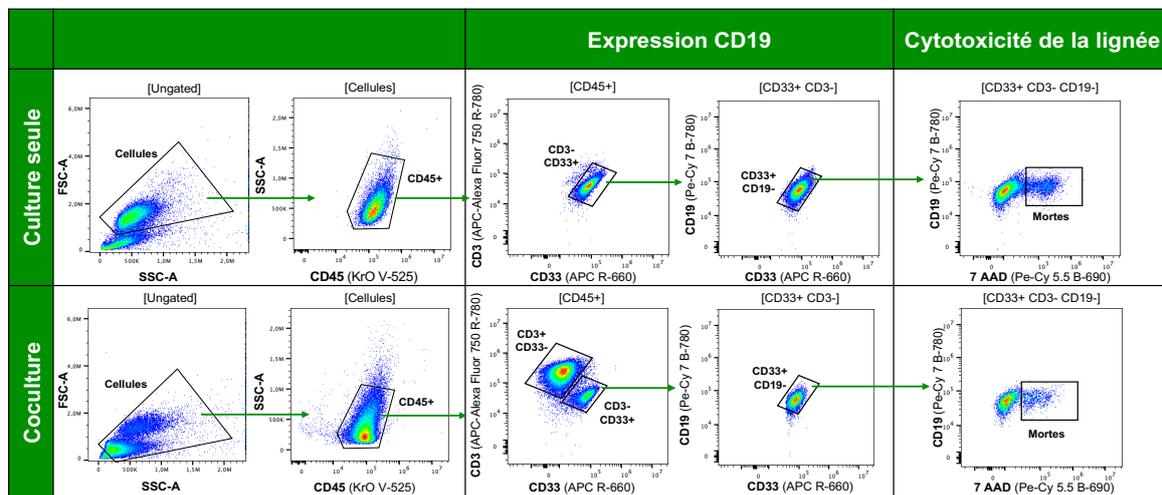
Dans les expériences suivantes, pour les cocultures et cultures seules, les deux premières étapes de fenêtrages ont été les mêmes que décrites précédemment. Pour cibler les RAJI, parmi les CD45+, nous avons sélectionné les cellules CD33- et CD3- ne correspondant pas aux cellules CAR-T, puis les cellules CD19 et CD20 positives. Cela nous permet d'obtenir le pourcentage d'expression du CD19 à la surface des cellules. Enfin, parmi les cellules [CD33- CD3- CD20+], la dernière étape de fenêtrage consiste à observer la lyse des RAJI en utilisant le 7-AAD. En effet, les cellules 7-AAD+ représentent les cellules mortes (Figure 57A). Les figures 57B et 57C représentent respectivement les stratégies de fenêtrage des MOLM-13 CD19- et MOLM-13 CD19+. *A contrario* des RAJI, ces lignées cellulaires expriment le CD33 à leur surface. Ainsi après le *gating* des CD45+, la sélection des MOLM-13 CD19- et MOLM-13 CD19+ est réalisée sur les cellules CD3- et CD33+ puis l'expression du CD19 permet de différencier ces deux lignées MOLM ; les MOLM-13 CD19- n'exprimant pas le CD19 et les MOLM-13 CD19+ exprimant le CD19. Cette étape permet aussi, comme pour les RAJI, d'évaluer les changements d'expression du CD19 après contact ou non avec les cellules CAR-T. Enfin la dernière étape repose sur la

désignation des cellules 7-AAD+ illustrant ainsi la cytotoxicité de ces lignées cellulaires.

A.



B.



C.

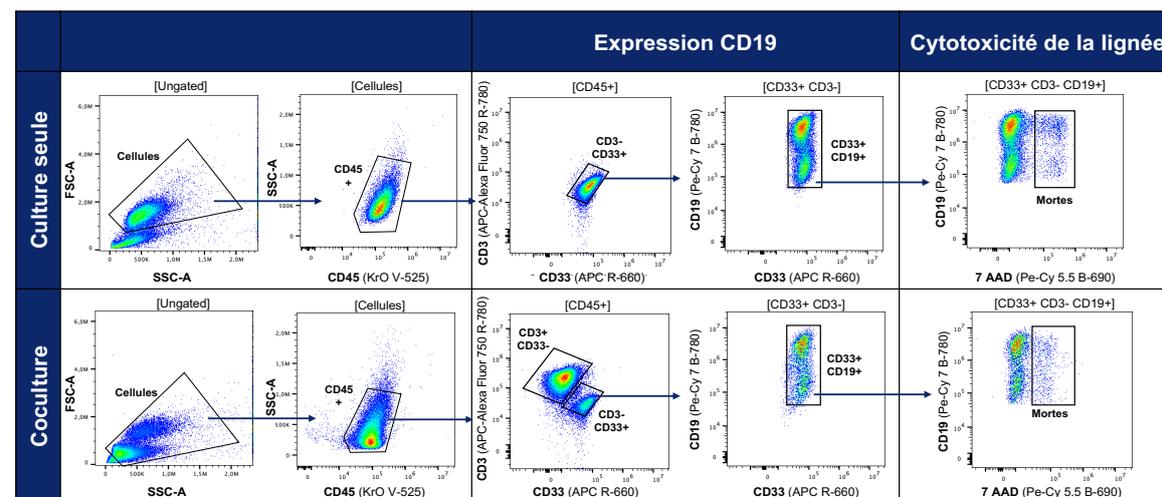


Figure 57 – Stratégies de fenêtrage exposées pour les cultures seules et cocultures des cellules CAR-T avec (A), les RAJ1 ; (B), les MOLM-13 CD19⁻ ; (C), et les MOLM-13 CD19⁺, permettant d'évaluer à la fois l'expression du CD19 à la surface de ces cellules mais aussi d'observer leur cytotoxicité (Réalisée à l'aide de FlowJo (version 10.10.0)). Abréviations : FSC, *forward scatter* ; SSC, *side scatter*

b) Étude de l'expression du CD19 à la surface des MOLM-13 CD19+

1. Objectif

Comme décrit précédemment, deux expériences ont été réalisées :

- une première pour évaluer la cytotoxicité et l'expression du CD19 à la surface des lignées cellulaires testées au cours du temps
- une deuxième permettant cette évaluation à plus long terme, jusque H30

Cependant, cette seconde expérience avait également pour objectif d'évaluer l'expression du CD19 en intracellulaire. Ainsi, en parallèle de l'étude de cytotoxicité des lignées cellulaires par les cellules CAR-T, nous avons réalisé une perméabilisation cellulaire des MOLM-13 CD19⁺ suivie d'une analyse par CMF de l'expression intracellulaire du CD19 dans différentes conditions (cocultures avec les cellules CAR-T VALTECH 1 et 2 et MOLM-13 CD19⁺ seules). Tout comme pour l'étude de cytotoxicité, cette perméabilisation cellulaire a été effectuée à différents temps d'incubation (H0, H5 et H24).

2. Perméabilisation cellulaire

Les cellules CAR-T et les MOLM-13 CD19⁺ ont été mises en coculture dans du milieu AIM-V (Gibco™, Thermo Fisher Scientific™, Massachusetts, États-Unis) à une concentration de 1 500 cellules/mL. Elles ont été cultivées dans des puits à fond plat (Corning™, État de New York, États-Unis). Un volume de 500 µL de coculture et de culture seule a été prélevé à différents temps de culture (H0, H5, H24) pour réaliser la perméabilisation cellulaire. Cette expérience est schématisée Figure 58. La première étape consiste à réaliser le marquage du CD19 à la surface membranaire des cellules grâce à un anticorps anti-CD19 couplé à de l'Alexa Fluor 647. L'ensemble est incubé pendant 10 minutes à l'obscurité. La seconde étape consiste à perméabiliser les cellules. Après la première incubation, les cellules sont lavées à l'aide d'une solution de *phosphate buffered saline* (PBS) (Gibco™, Thermo Fisher Scientific™, Massachusetts, États-Unis) et d'un passage à la centrifugeuse (7 minutes à 20°C à 1490 RPM). Le culot est ensuite repris par un solvant de perméabilisation Cytofix/Cytoperm® (BD Biosciences™, Californie, États-Unis) suivie d'une incubation de 20 minutes à 4°C. Ensuite, nous ajoutons 1mL de Perm/Wash™ *buffer* (BD Biosciences™, Californie, États-Unis) 1X, solution utilisée pour perméabiliser les cellules et en tant que tampon de lavage et diluant d'anticorps. Puis, l'ensemble est mis à centrifuger pendant 7 minutes à 20°C à 1490 RPM. Nous répétons cette étape une seconde fois avec le Perm/Wash™ *buffer* 1X. Le culot est repris dans 100µL de

Perm/Wash™ buffer 1X et l'ensemble est divisé en deux tubes de quantité égale (50µL de cellules). Dans le tube 1, nous ajoutons un anticorps anti-IgG1 couplé à de la Pe-Cy7 permettant le contrôle isotypique du marquage intracellulaire (Table 33). Dans le tube 2, nous ajoutons un anticorps anti-CD19 couplé à de la Pe-Cy7 permettant d'observer le marquage intracellulaire du CD19 (Table 34). Les deux tubes sont incubés à 4°C pendant 15 minutes et s'en suivra deux étapes de lavages au Perm/Wash™ buffer 1X avant l'analyse au cytomètre DxFlex®. Les données de CMF ont été analysées par FlowJo (version 10.10.0). La stratégie de fenêtrage après perméabilisation cellulaire est résumée Figure 59.

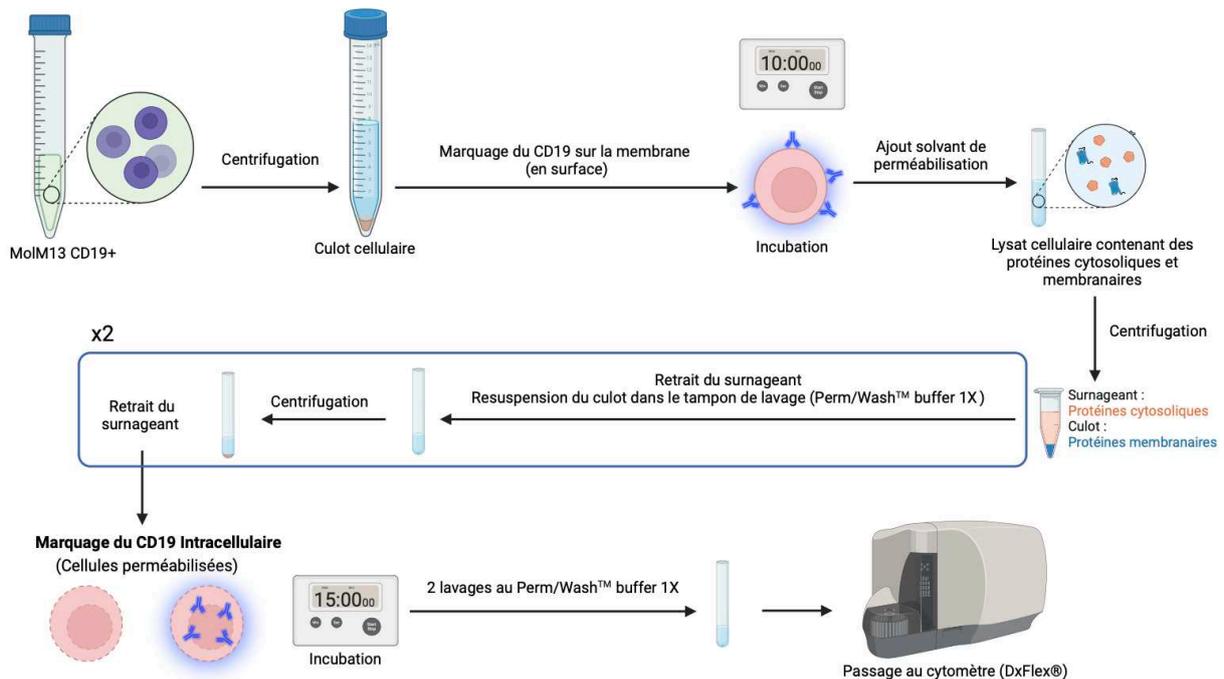


Figure 58 - Principe de perméabilisation des MOLM-13 CD19+

Anticorps	Fluorochrome	Clone	Longueur d'onde	Laser (DxFlex®)	Fournisseur
Anti-IgG1	Pe-Cy7	679.1Mc7	780	488	Beckman Coulter™, Californie
Anti-CD19 extra-cellulaire	Alexa Fluor 647	HIB19	660	635	BioLegend®, Californie

Table 33 – Panel d'anticorps utilisé pour le contrôle isotypique et le marquage du CD19 en extracellulaire

Anticorps	Fluorochrome	Clone	Longueur d'onde	Laser (DxFlex®)	Fournisseur
Anti-CD19 intra-cellulaire	Pe-Cy7	J3-119	780	488	Beckman Coulter™, Californie
Anti-CD19 extra-cellulaire	Alexa Fluor 647	HIB19	660	635	BioLegend®, Californie

Table 34 – Panel d'anticorps utilisé pour le marquage en intra et en extra-cellulaire des MOLM-13 CD19+ en cocultures ou seules

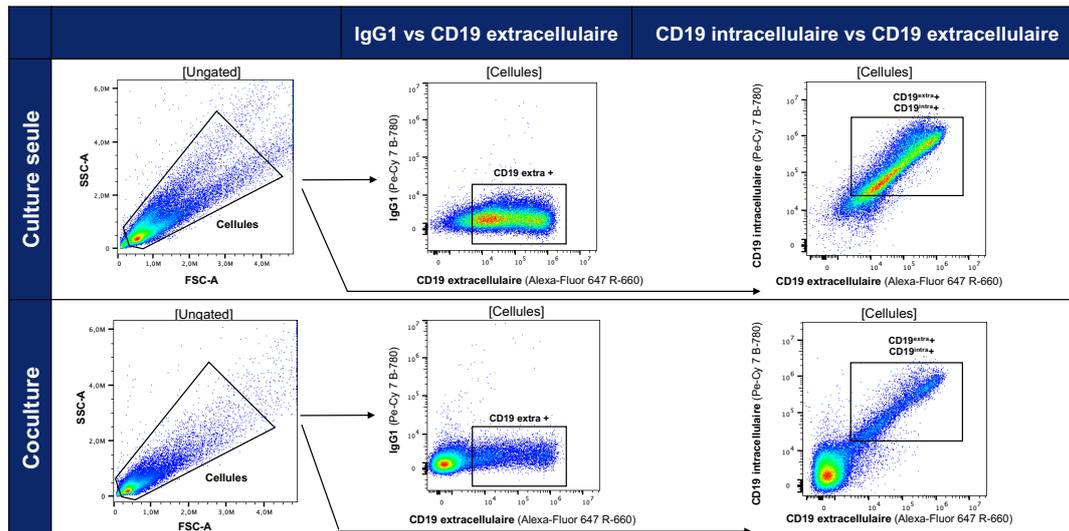


Figure 59 - Stratégies de fenêtrage après perméabilisation cellulaire pour les cultures seules et cocultures des MOLM-13 CD19⁺ avec les cellules CAR-T permettant d'observer l'expression extra et intracellulaire du CD19 (Réalisée à l'aide de FlowJo (version 10.10.0)). Abréviations : FSC, forward scatter ; SSC, side scatter.

C) Capacité fonctionnelle des cellules CAR-T anti-CD 19 issues de la production académique évaluée par Enzyme-linked immunospot (ELISPOT)

Au contact de leur antigène cible, les cellules CAR-T produisent généralement de l'IFN- γ . Ainsi, la présence d'IFN- γ produit par les cellules CAR-T après contact avec leurs cellules cibles permet de garantir leur bonne fonctionnalité, mettant en évidence leur activité cytotoxique après reconnaissance du CD19, à la surface de leurs cellules cibles. Cette sécrétion d'IFN- γ par les cellules CAR-T anti-CD19 peut être évaluée par technique ELISpot (*Enzyme-linked immunospot*). Il s'agit d'une méthode immuno-enzymatique sur phase solide, mise au point au début des années 1980 par Czekinsky et al.(353) qui permet de détecter et de quantifier le nombre de cellules sécrétant un anticorps spécifique ou une cytokine. Ainsi, l'ELISpot peut être utilisé comme test fonctionnel des cellules CAR-T.

Des cellules CAR-T (CAR-VALTECH 1 et 2), des lymphocytes T (CD3⁺), des cellules lymphocytaires B (CD19⁺), des RAJI, des MOLM-13 CD19⁺ et CD19⁻ ont été mis en suspension dans de l'AIM-V, en cocultures ou seules, dans des puits coâtés avec des anticorps anti-IFN- γ (Oxford Immunotech®, Massachusetts, États-Unis), et ont été incubées à 37 °C dans un incubateur à 5 % de CO₂ pendant 20 heures. Après incubation, les puits ont été lavés avant l'ajout d'un anticorps secondaire conjugué à une phosphatase alcaline. Ensuite, la plaque a été de nouveau incubée pendant 1 heure entre 2 et 8°C, puis lavée. Enfin, un substrat a été ajouté pendant 7 minutes à température ambiante permettant la révélation, avant d'être mis à sécher dans un incubateur. Les spots ont été visualisés et comptés à l'aide d'un lecteur de plaque

automatisé (CTL ImmunoSpot, Ohio, États-Unis) (Figure 60). Chaque spot est le reflet de la sécrétion d'IFN- γ par une cellule.

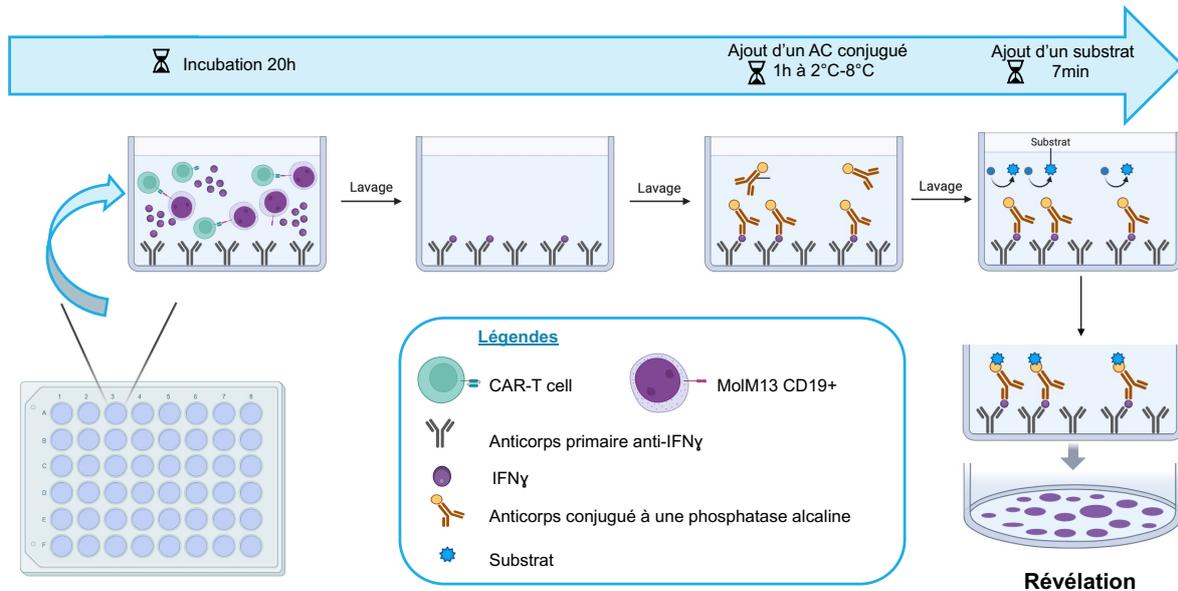


Figure 60 - Principe de l'ELISpot

D) Analyses statistiques

Toutes les données ont été analysées en utilisant GraphPad Prism 10® (Version 10.3.1) (GraphPad Software, États-Unis). A H5 et H24, les pourcentages de cytotoxicité des deux lots de cellules CAR-T (CAR-T VALTECH 1 et CAR-T VALTECH 2) ont été poolés afin de calculer; au cours de chaque expérience, les pourcentages moyens de cytotoxicité des cellules CAR-T d'une part, sur les RAJI et d'autre part, sur les MOLM-13 CD19⁺. Les différences de pourcentages moyens de cytotoxicité des cellules CAR-T sur les RAJI et les MOLM-13 CD19⁺ entre la première et la deuxième expérience aux temps H5 et H24 ont été comparées en utilisant un test t de Student pour deux échantillons indépendants. Les *p-values* inférieures à 0,05 pour une comparaison bilatérale ont été considérées comme statistiquement significatives. La même procédure a été utilisée pour les différences de pourcentages moyens de cellules CD19⁺ parmi les MOLM13-CD19 à H5 et H24 pour les deux expériences.

E) Préparation des figures

Toutes les figures et données de CMF pour les premières et deuxièmes expériences ont été assemblées par FlowJo Layout (version 10.10.0, Becton Dickinson & Company (BD)). Pour les résultats préliminaires, les figures et données de CMF ont été analysées avec le logiciel Kaluza (Beckman Coulter™, Californie, États-Unis). Les figures animées des principes des techniques utilisées ont été créées en utilisant Biorender (<https://biorender.com/>). Les figures de stratégies de fenêtrage de cytométrie et les représentations en UMAP (*Uniform manifold approximation and*

projection) ont été générées par FlowJo (version 10.10.0) et son *plugin* appelé UMAP (version 4.0.3). Les résultats ont d'abord été concaténés pour une analyse d'ensemble, puis un *downsampling* à 10% de cet ensemble a été réalisé (le *plugin* FlowJo utilisé est *Downsample* (version 3.3.1)). Pour la réalisation des UMAP, les paramètres utilisés sont basés sur la distance euclidienne avec le nombre de voisins les plus proches (*nearest neighbours*) égal à 12 et la distance minimale fixée à 0.2. Les courbes montrant l'évolution du nombre en valeur absolue et en pourcentage des cellules mortes ou de cellules exprimant le CD19 en fonction du temps ont été réalisées en utilisant GraphPad Prism 10® (version 10.3.1). Pour les cocultures de CAR-T avec une lignée cellulaire, les histogrammes montrent la moyenne et l'écart-type obtenus pour les deux productions de CAR-T utilisées (CAR-T VALTECH 1 et 2). Pour les cultures seules, les histogrammes montrent uniquement les valeurs brutes de cytotoxicité et d'expression du CD19 à chaque temps d'étude.

V. RÉSULTATS

A) Mise au point de la technique : Expérience préliminaire

Pour les études de cytotoxicité et de capacité fonctionnelle des cellules CAR-T, il a été essentiel de réaliser dans un premier temps des mises au point techniques, à partir de cellules cibles CD19+ (Lymphocytes B, blastes, RAJI).

a) Étude de cytotoxicité des cellules CAR-T

1. Cocultures in vitro : choix du ratio Effecteur : Cible (E : C)

Un premier test a été réalisé avec les cellules CAR-T VALTECH 1 et des lymphocytes B hétérologues à un ratio (E :C) de 1 : 4, soit une cellule CAR-T pour 4 lymphocytes B. Les cellules ont été analysées dès la mise en coculture (H0), puis 6 heures après (H6), et enfin 24 heures après la mise en culture (H24). Le taux de mortalité des lymphocytes B, défini par le pourcentage de cellules 7-AAD+ CD20+, a augmenté de 9.9% à 20.7% en 24 heures. Mais, les variations en valeurs absolues du nombre de lymphocytes B morts sont restées faibles (51 cellules à H0 vs 86 à H24) (Figure 61).

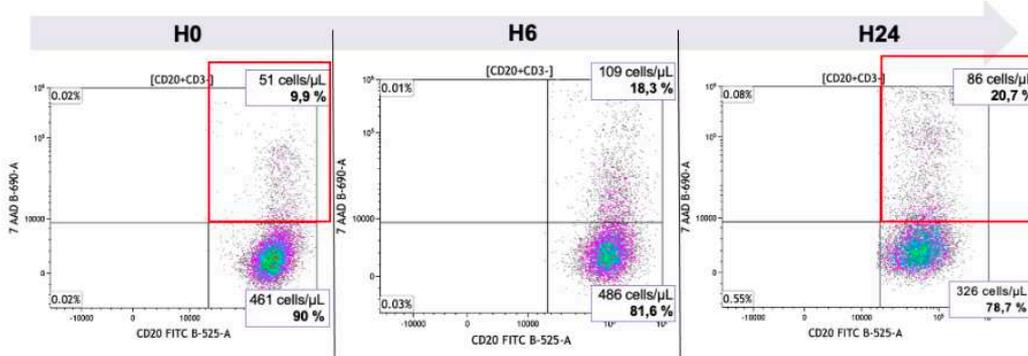


Figure 61 – Viabilité des lymphocytes B *in vitro* lors d'une coculture de cellules CAR-T VALTECH 1 et de lymphocytes B hétérologues (ratio 1 : 4) (Résultats à partir de Kaluza®) Les lymphocytes B viables sont CD20+ et 7-AAD-. Les lymphocytes B morts sont CD20+ et 7-AAD+.

Après 24 heures d'incubation avec les cellules CAR-T VALTECH 1, un changement du phénotype classique des lymphocytes B a été observé. On observe une diminution de l'expression du CD19 alors que celle du CD20 est conservée. À H0, 98,8 % des cellules exprimaient le CD20 et le CD19, mais ce chiffre tombe à 1,7 % à H24 (Figure 62A). Bien que la cytotoxicité des CAR-T VALTECH 1 sur les lymphocytes B hétérologues n'ait pas été démontrée, une forte diminution de l'expression de CD19 a été notée, suggérant une potentielle réaction allogénique. Pour le vérifier, une seconde coculture a été réalisée avec des lymphocytes B autologues. Les résultats ont confirmé cette observation : faible cytotoxicité (données non présentées) et diminution importante du pourcentage de cellules CD19+ malgré une expression de CD20 conservée (de 99,1 % à H0 à 8,1 % à H24) (Figure 62B).

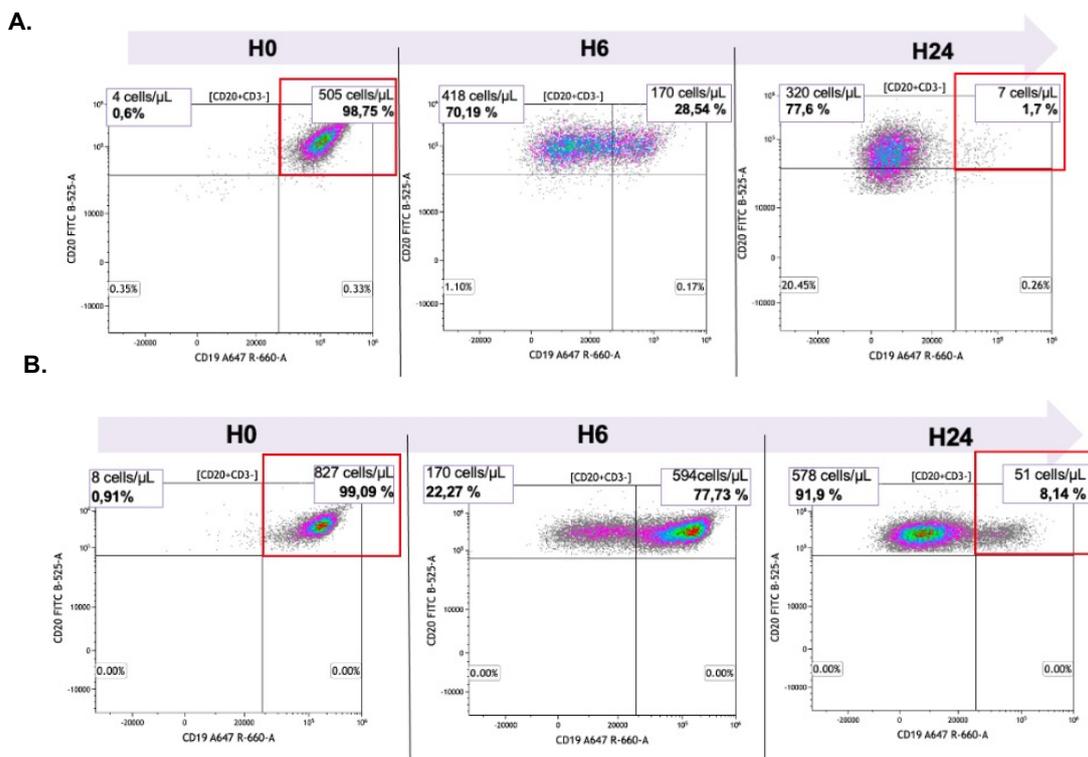


Figure 62 – Évolution du phénotype des lymphocytes B lors d'une coculture de cellules CAR-T VALTECH 1 à un ratio 1 : 4 (A), Avec des lymphocytes B hétérologues ; (B), Avec des lymphocytes B autologues (Résultats à partir de Kaluza®)

Ces expériences ont été transposées avec les cellules CAR-T VALTECH 2 (données non présentées) avec des résultats comparables à ceux obtenus avec les cellules CAR-T VALTECH 1.

D'autres ratios E :C ont été testés pour les cocultures, notamment 2 :1, avec un nombre de cellules effectrices CAR-T plus élevé que les lymphocytes B. À ce ratio, la diminution de l'expression du CD19 par les lymphocytes B hétérologues est similaire, passant de 95,4 % de cellules CD20+CD19+ à 3,3 % après 24 heures d'incubation (Figure 63A). De même que précédemment, le nombre de cellules lymphocytaires B 7-AAD+ reste faible (données non présentées).

Une coculture de lymphocytes B hétérologues avec des lymphocytes T non transduits a également été réalisée à un ratio 2:1 pour vérifier l'absence d'effet cytotoxique. La figure 63B montre qu'en présence de lymphocytes T non transduits, les lymphocytes B conservent leur expression de CD19, passant de 98,0 % de lymphocytes CD20+CD19+ à H0 à 96,0 % à H24, confirmant que la diminution de CD19 observée précédemment est spécifique aux cellules CAR-T.

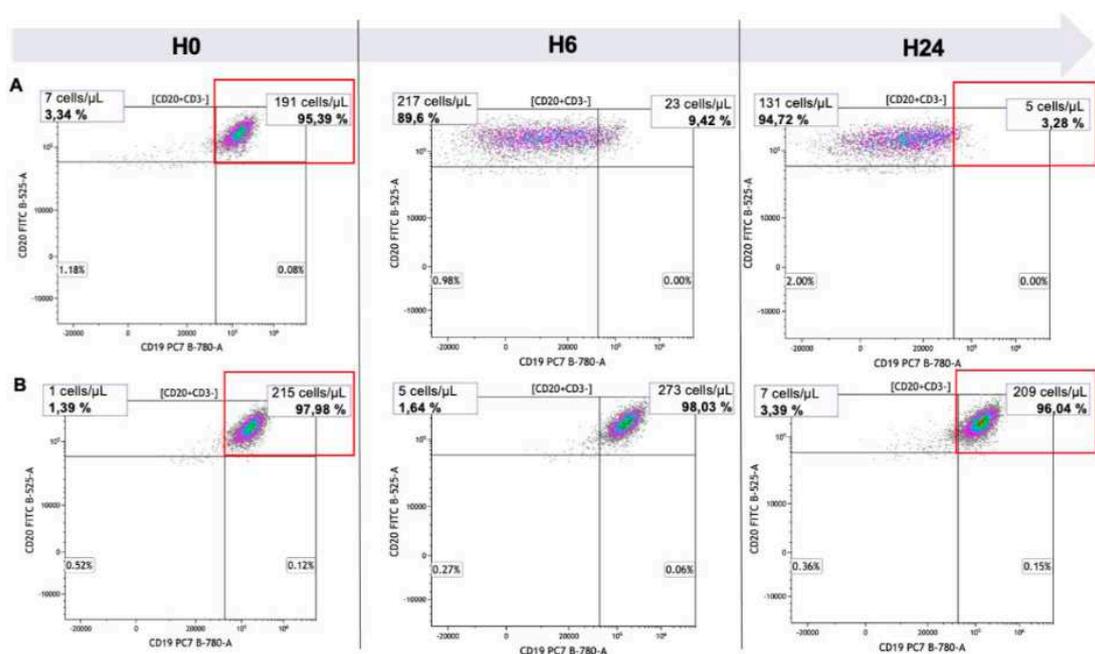


Figure 63 – Évolution du phénotype des lymphocytes B en coculture. (A), Coculture avec des cellules CAR-T VALTECH 1 et des lymphocytes B hétérologues (ratio E :C égal à 2 :1) ; **(B),** Coculture avec les lymphocytes T non transduits triés, provenant de la production des cellules CAR-T VALTECH 1 et des lymphocytes B hétérologues (ratio 2 :1) (Résultats à partir de Kaluza®).

La cytotoxicité des cellules CAR-T n'a pas pu être démontrée malgré les différentes conditions testées. Ce phénomène sur le CD19 en surface n'est pas observé lorsque ces lymphocytes B sont mis en coculture avec des lymphocytes T n'exprimant pas de CAR anti-CD19. De plus, la diminution de l'expression du CD19 à la surface des lymphocytes B en présence de cellules CAR-T a pu être observée quel que soit le ratio

E :C au cours du temps. C'est le ratio E :C fixé à 2 :1 qui a été choisi comme Ma et al.(116), pour les expériences suivantes.

2. Essai de cytotoxicité des cellules CAR-T sur des cellules CD19+

Pour démontrer que les cellules CAR-T anti-CD19 produites présentent une propriété cytotoxique, des cocultures avec des cellules RAJI et des blastes cryoconservés provenant de patients atteints de LAM CD19+ ont été réalisées avec les cellules CAR-T VALTECH 1 et 2 produites à Lille mais également avec les cellules CAR-T de Rouen et des lymphocytes T non transduits.

a. Cellules RAJI

Les cellules RAJI ont été mises en coculture avec les cellules CAR-T VALTECH 1 et 2 et les cellules CAR-T de Rouen. Deux situations témoins ont été testées suivant les mêmes conditions : RAJI seules et RAJI en coculture avec des lymphocytes T sans CAR anti-CD19 (Figure 64). Comme illustré avec l'exemple de la Figure 64A, le pourcentage de cellules RAJI CD20+ 7-AAD+ augmente avec le temps (de 7.1% à 44.6% à H24) en contact avec les cellules CAR-T VALTECH 1. On retrouve la même tendance avec les CAR-T VALTECH 2 et à les CAR-T produits à Rouen la population RAJI CD20+ 7-AAD+ reste inchangée dans les conditions témoins (Figure 64B). Ainsi, cela confirme que les RAJI subissent une mort cellulaire quand elles sont en coculture avec des cellules CAR-T.

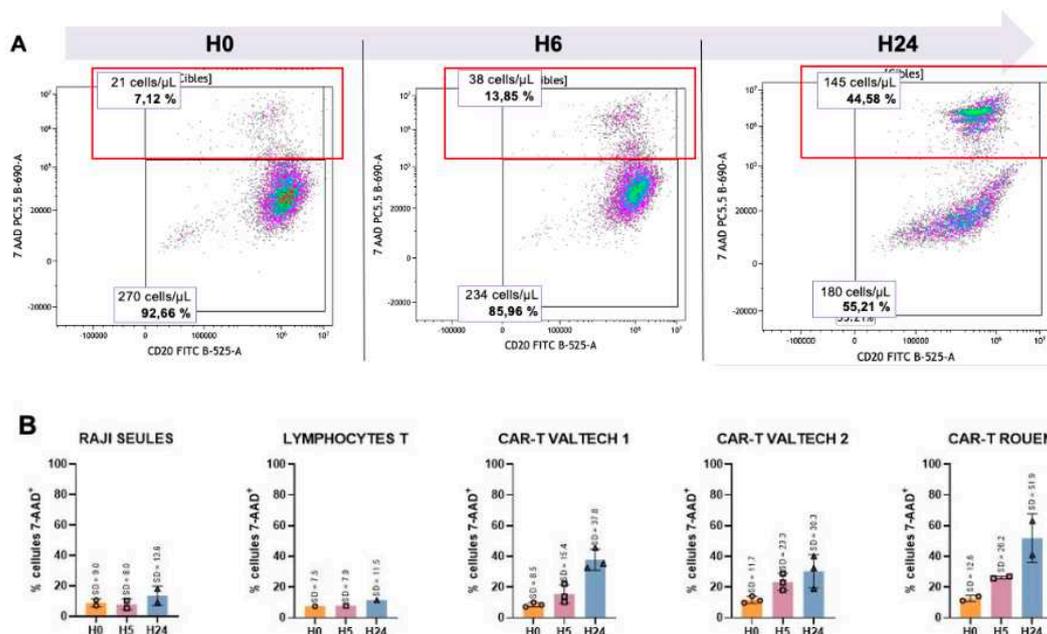


Figure 64 – Cytotoxicité des cellules CAR-T sur les cellules RAJI. (A), Exemple de viabilité des cellules RAJI *in vitro* mises en coculture avec les cellules CAR-T VALTECH1 (ratio E :C = 2:1) (Résultats à partir de Kaluza®) ; (B), Fréquence de cellules RAJI 7-AAD+ en coculture dans différentes conditions (Réalisé avec GraphPad Prism 10® (version 10.3.1)). Chaque chiffre correspond au pourcentage moyen (SD, *standard deviation*) pour chacune des cocultures dans les mêmes conditions.

Les moyennes en valeurs absolues des cellules RAJI viables/ μL (CD20+ 7-AAD-) ont été détaillées dans la Table 35 pour les différentes conditions. En présence de cellules CAR-T, le pourcentage de cellules RAJI viables diminue mais le nombre en valeur absolue soit stagne soit augmente très légèrement en 24 heures. Néanmoins, on observe environ 2.5 fois plus de cellules RAJI viables après 24 heures lorsqu'elles sont cultivées seules (de 982 cellules/ μL à H0 jusqu'à 2359 à H24).

	H0 (cellules viables/ μL)	H5 (cellules viables/ μL)	H24 (cellules viables/ μL)
Cellules CAR-T VALTECH 1 (n=3)	267	202	290
Cellules CAR-T VALTECH 2 (n=3)	287	165	224
Cellules CAR-T Rouen (n=2)	309	195	272
Lymphocytes T (n=1)	521	561	700
RAJI seules (n= 2)	982	1689	2359

Table 35 – Moyenne des valeurs absolues en cellules RAJI viables/ μL lorsqu'elles sont en cocultures suivant différentes conditions. Les cellules RAJI ont été ciblées par leur expression CD20.

Le phénotype des RAJI semble se modifier en 24 heures comme observé avec celui des lymphocytes B précédemment. Il tend effectivement vers un phénotype CD20+CD19- à H24 tandis qu'on retrouvait principalement un phénotype CD20+CD19+ à H0 (Figure 65, pourcentage de CD20+CD19- atteint 18.0% à H24).

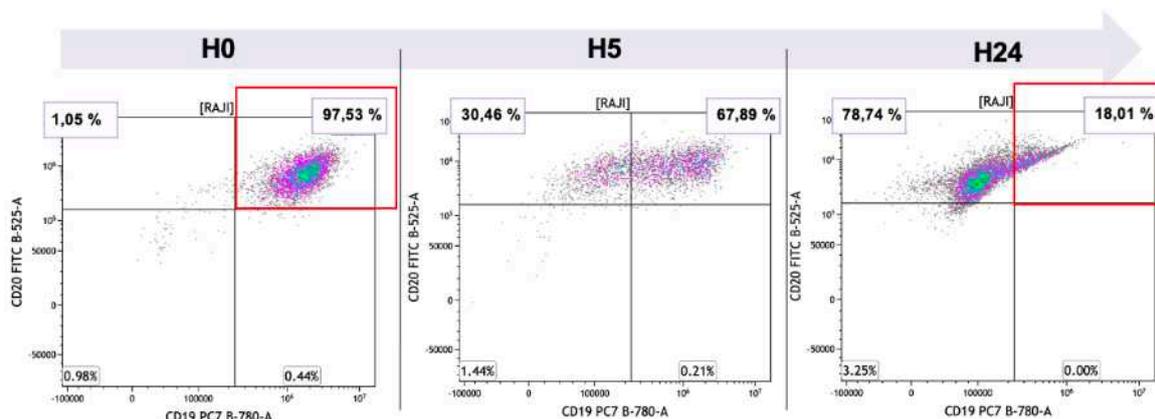


Figure 65 - Exemple d'évolution du phénotype des cellules RAJI lors de la mise en coculture avec des cellules CAR-T VALTECH 1 (Résultats à partir de Kaluza®)

La présentation de ces résultats montre une certaine capacité des cellules CAR-T à détruire des cellules cibles CD19+, avec une diminution de l'expression membranaire de CD19 par les cellules cibles restantes.

b. Blastes LAM CD19+ et CD19- cryopréservés

Des cocultures de cellules CAR-T produites au CHU de Lille et de Rouen ont ensuite été effectuées avec des blastes myéloïdes CD19+ et CD19- (servant de témoin négatif) cryopréservés provenant de patients atteints de LAM. Néanmoins, malgré la réalisation de deux expériences, aucun résultat de cytotoxicité des cellules CAR-T n'a pu être relevé en raison possiblement d'un fort taux de blastes 7-AAD+ (96.4%) après décongélation et avant la mise en coculture (Figure 66).

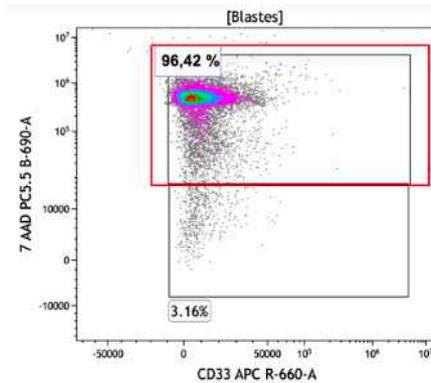


Figure 66 - Exemple démontrant la viabilité des blastes LAM CD19+ à H0 après décongélation (Résultats à partir de Kaluza®)

b) ELISpot

Pour mettre en place un test de fonctionnalité par ELISpot, un témoin positif, avec de la phytohémagglutinine (PHA), et un témoin négatif (cellules CAR-T seules) ont permis de valider les conditions de chaque plaque.

1. Mise au point

Des cellules CAR-T ont été mises en plaque avec des cellules cibles CD19+ à différents ratio E:C. Lorsque les cellules CAR-T sont en présence de ces cellules CD19+, la réaction positive à l'ELISpot (c'est-à-dire la présence de spots) confirme alors la sécrétion d'IFN- γ à la suite de cette interaction, validant ce test fonctionnel des cellules CAR-T (Figure 67A). En revanche, aucun spot n'a été compté pour le puits avec des lymphocytes B seuls (Figure 67B). Les tests de sensibilité ont permis d'identifier le ratio idéal pour une quantification optimale du nombre de spots sans saturation des puits (Figure 67A). De plus, la spécificité du test a été aussi démontrée par la réaction négative de l'ELISpot quand les lymphocytes T non transduits étaient en contact avec des lymphocytes B CD19+ (Figure 67C).

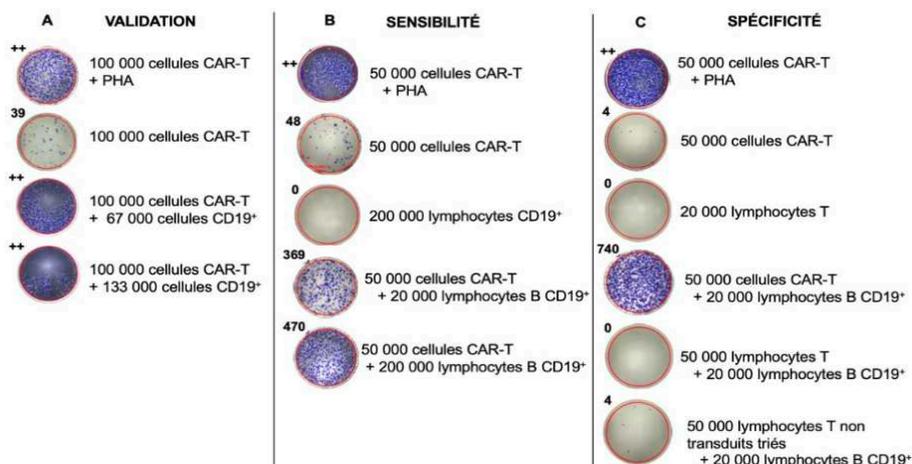


Figure 67 - Mise au point de l'ELISpot via (A), un test de validation ; (B), de sensibilité ; (C), et de spécificité mettant en évidence l'IFN- γ produit avec ou non les cellules CAR-T. Les tests de validation et de spécificité ont été réalisés avec des cellules CAR-T VALTECH 1 et celui de sensibilité avec les cellules CAR-T VALTECH 2. Abréviations : PHA, phytohémagglutinine (++) indique supérieur à 50 spots et inquantifiable)

Pour valider la fonctionnalité des cellules CAR-T en routine au CHU de Lille, le test ELISpot doit être reproductible et simple. Il est donc essentiel de trouver les cellules cibles CD19+ disponibles avec une méthode de conservation la plus optimale. Dans ce but, nous avons testé : des culots secs de lymphocytes B CD19+ congelés, des lymphocytes B viables (Figure 68A) et des cellules RAJI congelées et non congelées (Figure 68B). Sur la figure 68A, les résultats de l'ELISpot montrent que les culots secs ne sont pas adaptés (résultat négatif) en tant que cible potentielle pour ce test de fonctionnalité des cellules CAR-T, contrairement aux lymphocytes B viables. En revanche, avec les RAJI (décongelées ou fraîches), les résultats de l'ELISpot sont positifs mais les puits sont saturés, rendant le comptage des spots difficile. Des résultats similaires ont été obtenus en testant avec les deux lots de cellules CAR-T produites au CHU de Lille.

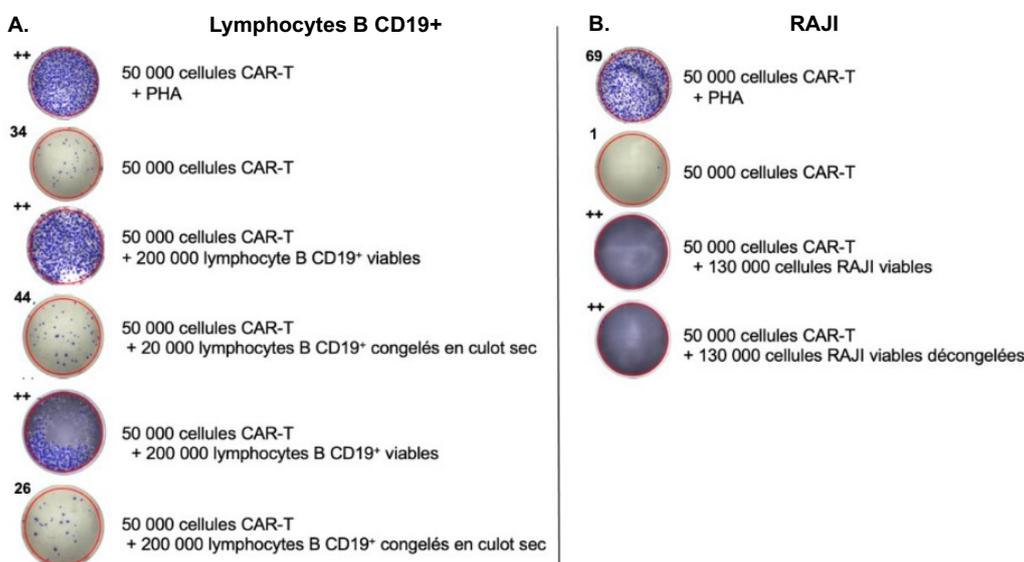


Figure 68 - Simplification du test ELISpot IFN- γ avec les cellules CAR-T. (A), Essai de l'ELISpot à partir de lymphocytes B CD19+ congelés en culot sec ou viables en présence de cellules CAR-T VALTECH 2 ; (B), Essai de l'ELISpot à partir de cellules RAJI viables ou cryopréservées en présence de cellules CAR-T VALTECH 1 (++ indique supérieur à 50 spots et inquantifiable).

2. Essai de fonctionnalité sur des RAJI

Après validation de la méthode en termes de spécificité et sensibilité, nous avons renouvelé le test ELISpot avec des cellules RAJI viables et cryoconservées, en utilisant un nombre réduit de cellules RAJI (20 000 par puits) pour éviter la saturation des puits (Figure 69). Bien que la saturation soit légèrement réduite par rapport à l'expérience précédente (Figure 69), les puits restent saturés, rendant le nombre de spots non quantifiable. Les résultats sont similaires pour les cellules CAR-T VALTECH 1 et VALTECH 2.

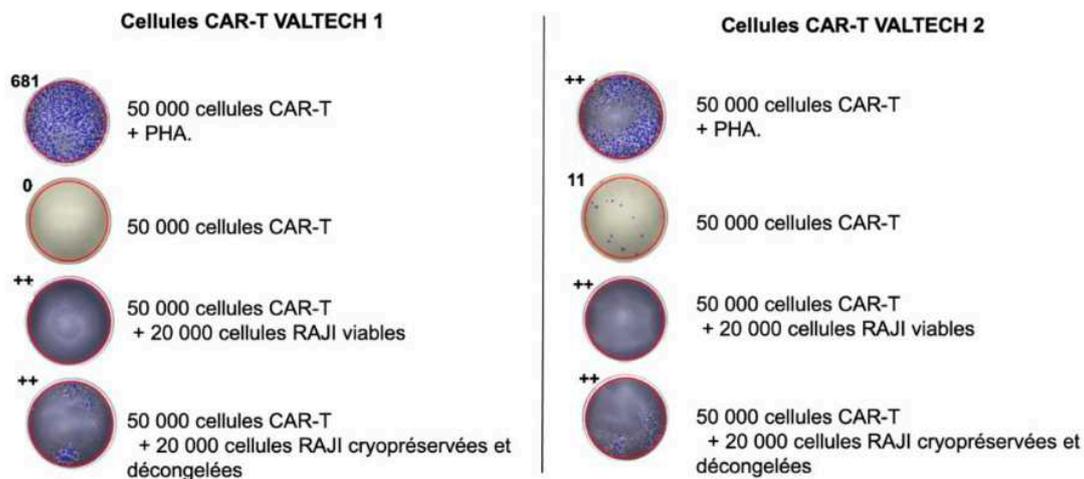


Figure 69 - Essai de fonctionnalité des cellules CAR-T VALTECH 1 et VALTECH 2 produites au CHU de Lille avec un test ELISpot IFN- γ

B) Étude de la cytotoxicité des cellules CAR-T

A partir de la mise au point de l'étude de la cytotoxicité expliquée dans la partie précédente, nous avons ensuite réalisé des analyses sur des cocultures et cultures de lignées cellulaires isolées. Nous avons d'abord confirmé les résultats sur les cellules cibles CD19⁺ (RAJI), pour lesquelles la cytotoxicité est déjà connue, afin d'établir un témoin positif. Ensuite, nous avons utilisé une lignée de blastes myéloïdes ne portant pas le CD19, les MOLM-13 CD19⁻, comme témoin négatif. Enfin, pour évaluer l'efficacité des cellules CAR-T produites, nous avons testé leur cytotoxicité sur une lignée de blastes myéloïdes exprimant le marqueur CD19 (cible des CAR-T produites), les MOLM-13 CD19⁺. Nous allons également observer le comportement de toutes les lignées cellulaires en absence de cellules CAR-T dans le milieu de culture.

Deux expériences ont été menées : la première à trois temps de culture (H0, H5 et H24), et la deuxième, incluant un quatrième temps de prélèvement (H30) et une optimisation du ratio E:C prenant en compte la mortalité initiale des cellules CAR-T après décongélation. De plus, nous avons réalisé une perméabilisation cellulaire sur les MOLM-13 CD19⁺ lors de la seconde expérience pour comprendre les variations phénotypiques du CD19.

a) RAJI

1. Cytotoxicité des cellules CAR-T sur les RAJI

Les cellules RAJI ont été mises en coculture avec les cellules CAR-T VALTECH 1 (Figure 70A) et 2 (Figure 70B). Une condition témoin sans CAR-T est illustrée sur la figure 70C. Le pourcentage et le nombre absolu de cellules RAJI 7-AAD⁺ augmentent avec le temps en présence de cellules CAR-T, contrairement à la condition sans CAR-T où ces valeurs restent inchangées en 24 heures (Figures 70D et 70E). La quantité

de cellules RAJI 7-AAD+ est plus élevée sans cellules CAR-T dès H0. (Figure 70E). Nous observons également une lyse cellulaire plus marquée des RAJI avec les cellules CAR-T VALTECH 2, due à un taux de RAJI 7-AAD+ à 24 heures plus élevé (80.7% vs 61.7% avec les CAR-T VALTECH 1) (Figure 70D). Cette différence pourrait s'expliquer par une proportion plus élevée de lymphocytes T CD8+ transduits dans la composition des cellules CAR-T VALTECH 2. Ces résultats confirment que les cellules RAJI subissent une mort cellulaire en présence de cellules CAR-T, corroborant les observations précédentes.

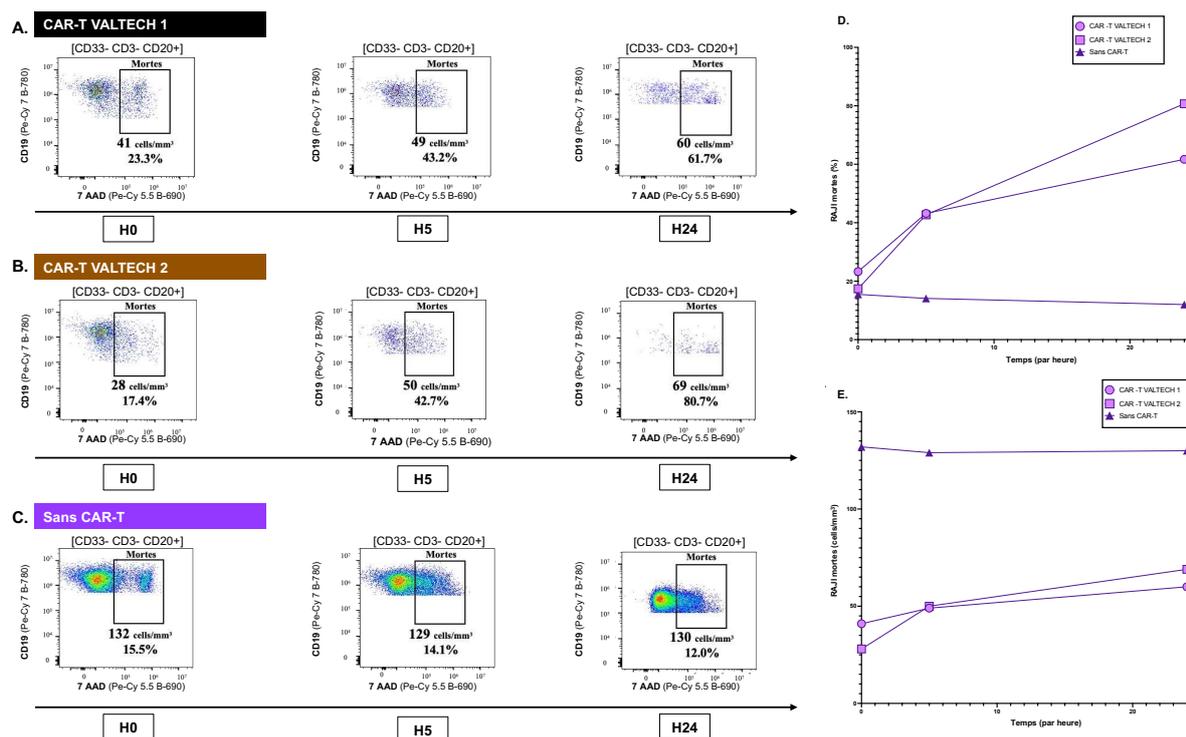


Figure 70 – Cytotoxicité sur les cellules RAJI (première expérience). (A), avec les cellules CAR-T VALTECH 1 ; (B), avec les cellules CAR-T VALTECH 2 ; (C), en culture seule (A, B, C à partir de FlowJo® (version 10.10.0)) ; (D), Taux de cytotoxicité au cours du temps ; (E), Nombre de cellules RAJI mortes au cours du temps (D et E réalisées à partir de GraphPad Prism 10® (version 10.3.1)).

Une deuxième expérience, similaire à la première, a été réalisée avec un quatrième point de mesure à H30. Les mêmes conditions ont été testées. En partant d'un taux initial de cellules RAJI 7-AAD+ de 23,6 % avec les CAR-T VALTECH 1 et 21,7 % avec les CAR-T VALTECH 2 à H0, ce taux augmente continuellement jusqu'à H30, atteignant respectivement 85,5 % et 87,3 %. Cela indique que la cytotoxicité des CAR-T continue au-delà de H24 (Figures 71A et 71B). En revanche, en culture seule, le pourcentage de RAJI 7-AAD+ reste stable jusqu'à H24, mais diminue à H30 pour atteindre 7,8 % (Figures 71C et 71D). Cependant, le nombre cellules RAJI 7-AAD+ en valeur absolue en culture seule reste inchangé (Figure 71E), probablement en raison de la prolifération des cellules vivantes dans des conditions favorables, réduisant la proportion relative de cellules mortes à H30. Nous notons également sur la figure 71E,

qu'en présence de cellules CAR-T, le nombre absolu de cellules RAJI 7-AAD+ augmente rapidement entre H0 et H5, avant de stagner jusqu'à H24. On observe une nouvelle augmentation entre H24 et H30.

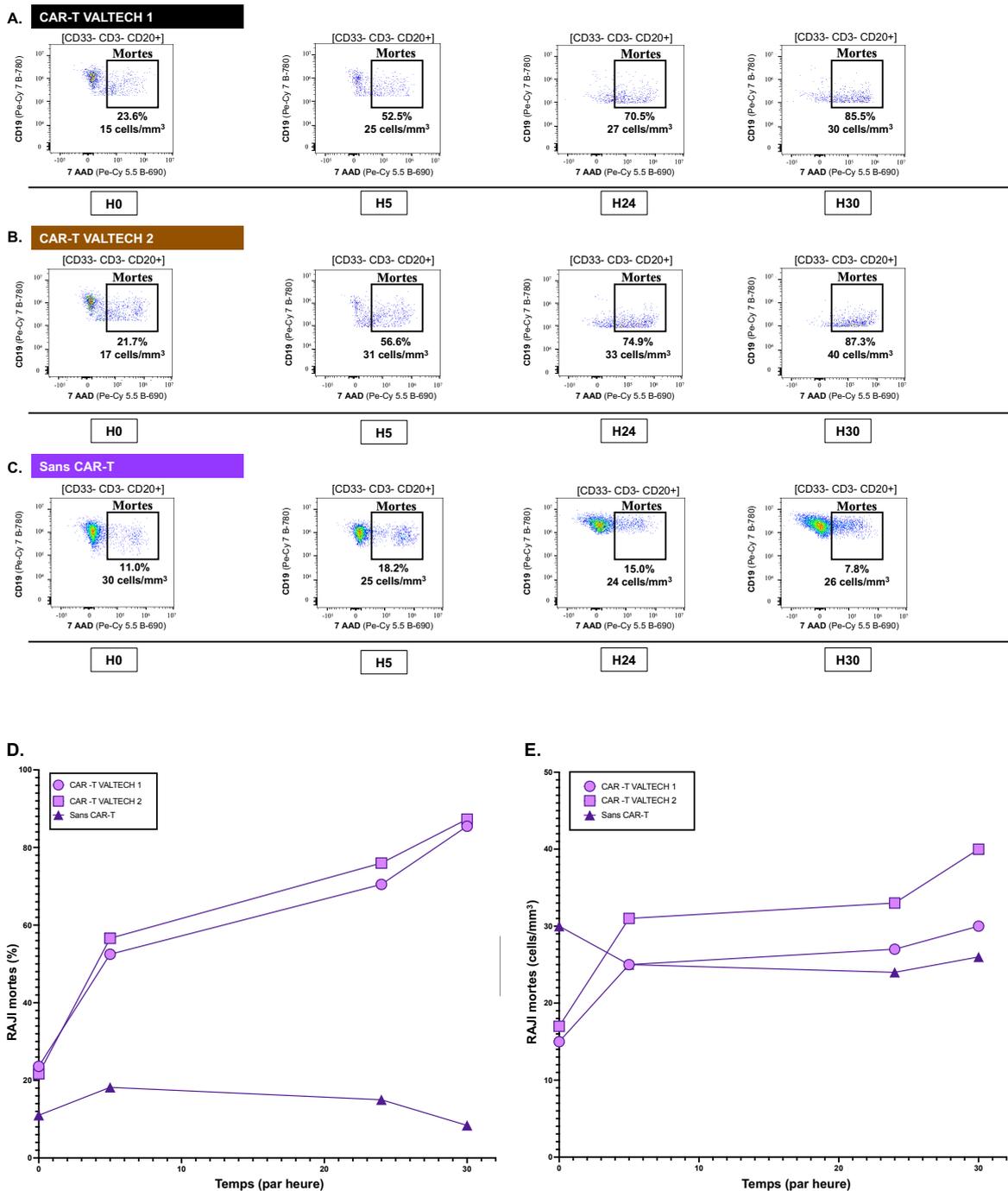


Figure 71 - Cytotoxicité sur les cellules RAJI (deuxième expérience). (A), avec les cellules CAR-T VALTECH 1 ; (B), avec les cellules CAR-T VALTECH 2 ; (C), en culture seule (A, B, C à partir de FlowJo® (version 10.10.0)) ; (D), Taux de cytototoxicité au cours du temps ; (E), Nombre de cellules RAJI mortes au cours du temps (D et E réalisées à partir de GraphPad Prism 10® (version 10.3.1)).

2. Expression du CD19 à la surface des RAJI

Lors de la première expérience, la diminution de l'expression du CD19 par les cellules RAJI est similaire aux expériences qui ont permis la mise au point de l'étude de cytototoxicité. En effet, en présence des cellules CAR-T, la proportion de cellules CD20+CD19+ passe de 95,3 % (CAR-T VALTECH 1) et 98,3 % (CAR-T VALTECH 2)

à H0, à respectivement 40,6 % et 48,0 % après 24 heures de coculture (Figure 72A et 72B). En parallèle, une culture isolée de RAJI, utilisée comme témoin négatif, montre que les cellules RAJI conservent leur expression de CD19, avec un pourcentage de cellules CD20+CD19+ passant de 91,2 % à H0 à 90,9 % à H24 (bien qu'un défaut technique de marquage à H24 ait décalé la population cellulaire) (Figures 72C et 72D). De plus, en analysant les tendances de progression du nombre de cellules CD20+CD19+ à chaque temps de prélèvement selon les différentes conditions, il apparaît clairement que la diminution de ce nombre de cellules CD20+ CD19+ est spécifiquement liée à l'action des cellules CAR-T sur les RAJI, confirmant ainsi les observations précédentes (Figures 72E et 72F).

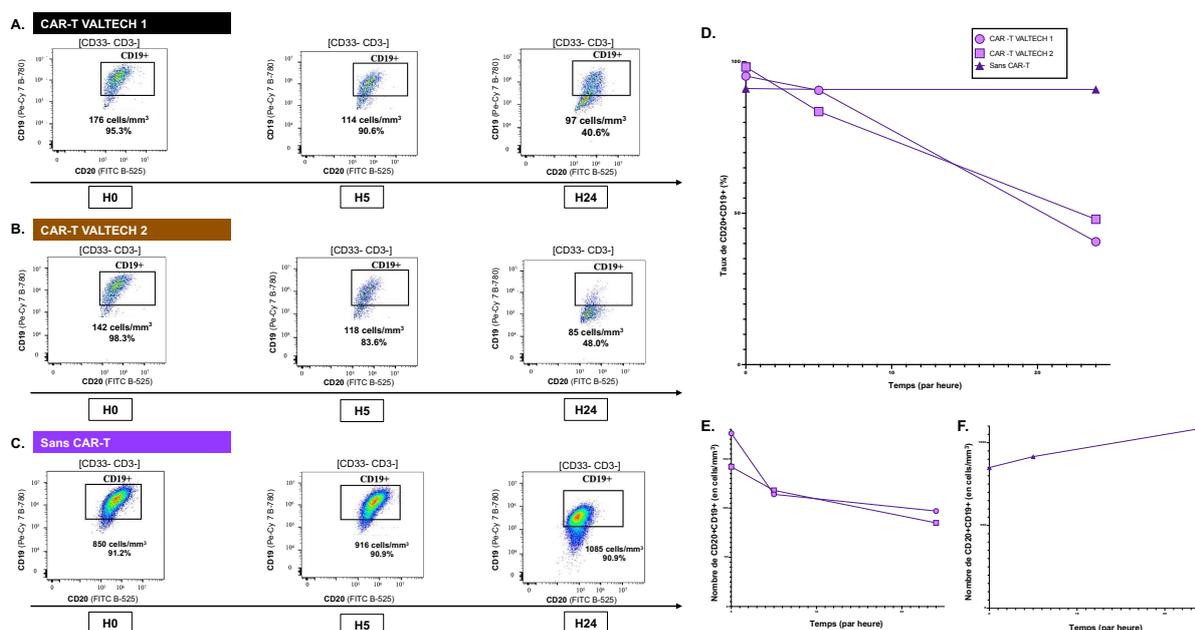


Figure 72 – Évolution du phénotype des cellules RAJI (première expérience) (A), lors de la mise en coculture avec des cellules CAR-T VALTECH 1 ; **(B)**, lors de la mise en coculture avec des cellules CAR-T VALTECH 2 ; **(C)**, en culture seule (A,B,C à partir de FlowJo® (version 10.10.0)) ; **(D)**, Taux de cellules CD20+ CD19+ (%) au cours du temps ; **(E)**, Nombre de cellules RAJI CD19+ (en valeur absolue) au cours du temps (D et E réalisées à partir de GraphPad Prism 10® (version 10.3.1)).

Dans la deuxième expérience, le phénotype des RAJI évolue en 24 heures, comme observé précédemment en présence de cellules CAR-T (Figure 73A et 73B). Elles passent d'un phénotype CD20+CD19+ à H0 à un phénotype CD20+CD19- à H24 et H30 tandis qu'en culture isolée, les RAJI restent CD20+CD19+ (Figure 73C). Plus le temps en coculture avance, plus le pourcentage de cellules CD20+CD19+ ainsi que le nombre de cellules RAJI CD19+ exprimant ce marqueur diminuent (Figure 73D et 73E). Cependant, en culture isolée, le nombre de cellules RAJI CD19+ en valeur absolue au cours du temps diminue après 5 heures, probablement en raison d'un stress cellulaire, puis stagne avant d'augmenter entre H24 et H30 vraisemblablement dû à la prolifération des cellules RAJI en culture (Figure 73F).

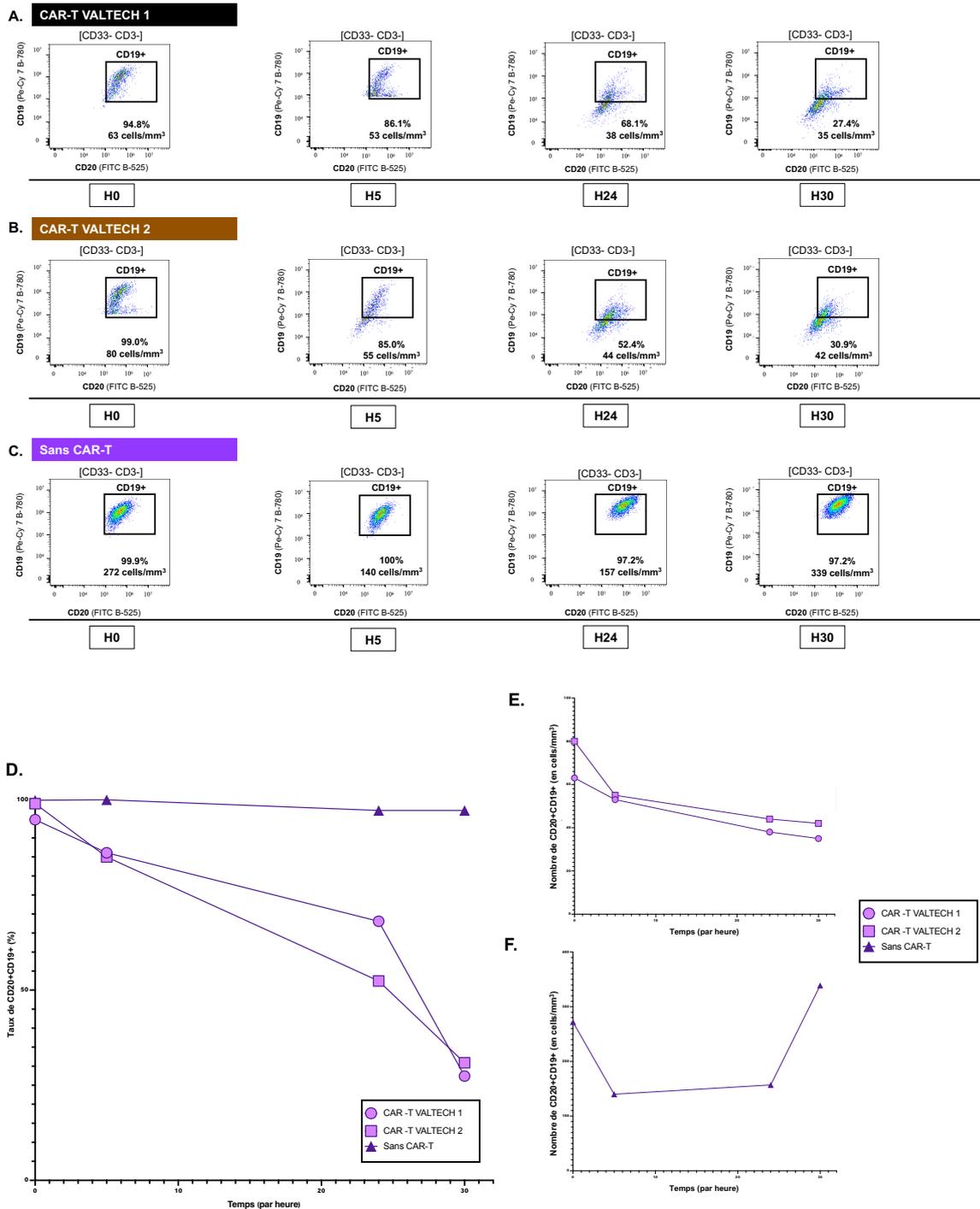


Figure 73 - Évolution du phénotype des cellules RAJI (deuxième expérience) (A), lors de la mise en coculture avec des cellules CAR-T VALTECH 1 ; (B), lors de la mise en coculture avec des cellules CAR-T VALTECH 2 ; (C), en culture seule (A,B,C à partir de FlowJo® (version 10.10.0)) ; (D), Taux de cellules CD20+CD19+ (%) au cours du temps ; (E), Nombre de cellules RAJI CD19+ (en valeur absolue) au cours du temps (D et E réalisées à partir de GraphPad Prism 10® (version 10.3.1)).

b) MOLM-13 CD19-

1. Cytotoxicité des cellules CAR-T sur des MOLM-13 CD19-

Nous avons réalisé les mêmes expériences avec les cellules MOLM-13 CD19⁻. Que ce soit en présence de cellules CAR-T ou en culture isolée, le pourcentage et le nombre de cellules MOLM-13 CD19⁻ 7-AAD⁺ restent inchangés, ou diminuent après 24 heures d'incubation (Figure 74). Cette diminution peut s'expliquer par un

phénomène de culture favorisant la prolifération cellulaire, similaire à celui observé précédemment avec les cultures isolées de RAJI. En culture seule, le nombre absolu de cellules MOLM-13 CD19⁻ 7-AAD⁺ est plus élevé qu'en présence de cellules CAR-T, car initialement, il y a plus de cellules MOLM-13 CD19⁻ dans le milieu de culture (Figure 74E).

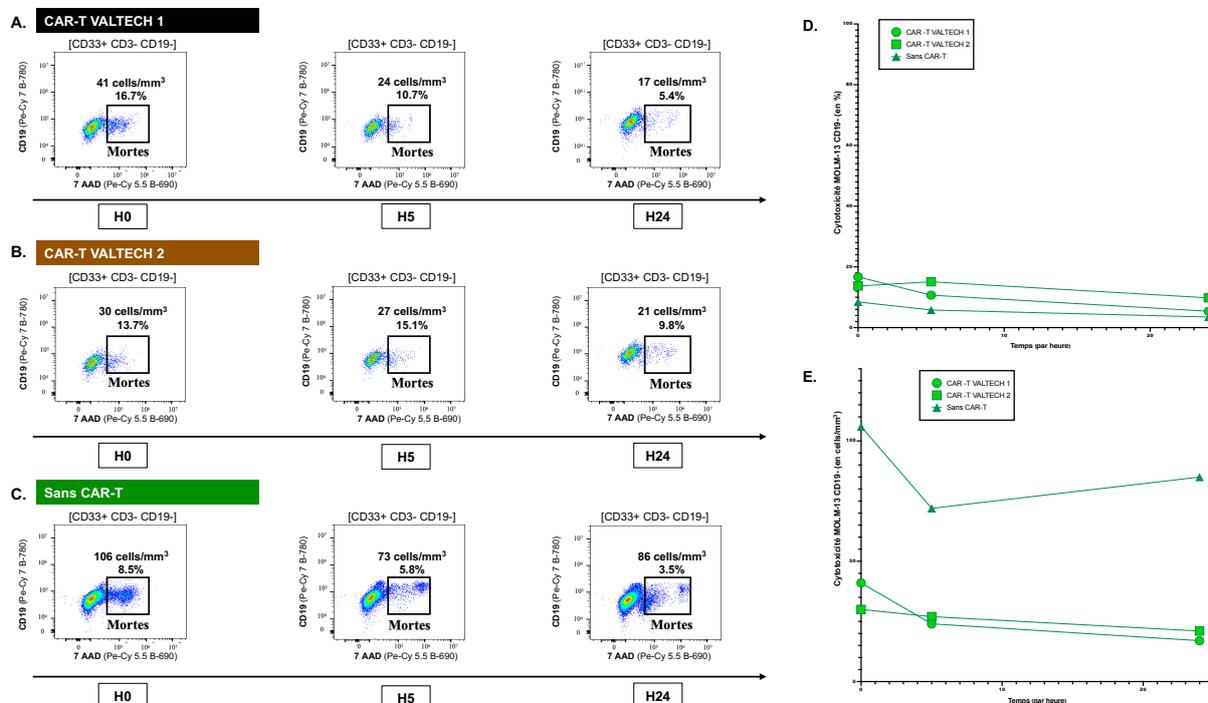


Figure 74 - Cytotoxicité sur les cellules MOLM-13 CD19⁻ (première expérience). (A), avec les cellules CAR-T VALTECH 1 ; (B), avec les cellules CAR-T VALTECH 2 ; (C), en culture seule (A, B, C à partir de FlowJo® (version 10.10.0)) ; (D), Taux de cytotoxicité au cours du temps. ; (E), Nombre de cellules MOLM-13 CD19⁻ mortes au cours du temps (D et E réalisées à partir de GraphPad Prism 10® (version 10.3.1)).

Au cours de la deuxième expérience, nous observons la même tendance au niveau des résultats que précédemment. A H30, le pourcentage et le nombre de MOLM-13 CD19⁻ 7-AAD⁺ sont stables ou légèrement diminués par rapport à H24 (Figure 75). Ainsi, ces résultats confirment que les MOLM-13 CD19⁻ représentent un témoin négatif en termes de lignée cellulaire, et qu'elles ne sont pas des cibles potentielles des cellules CAR-T produites à Lille.

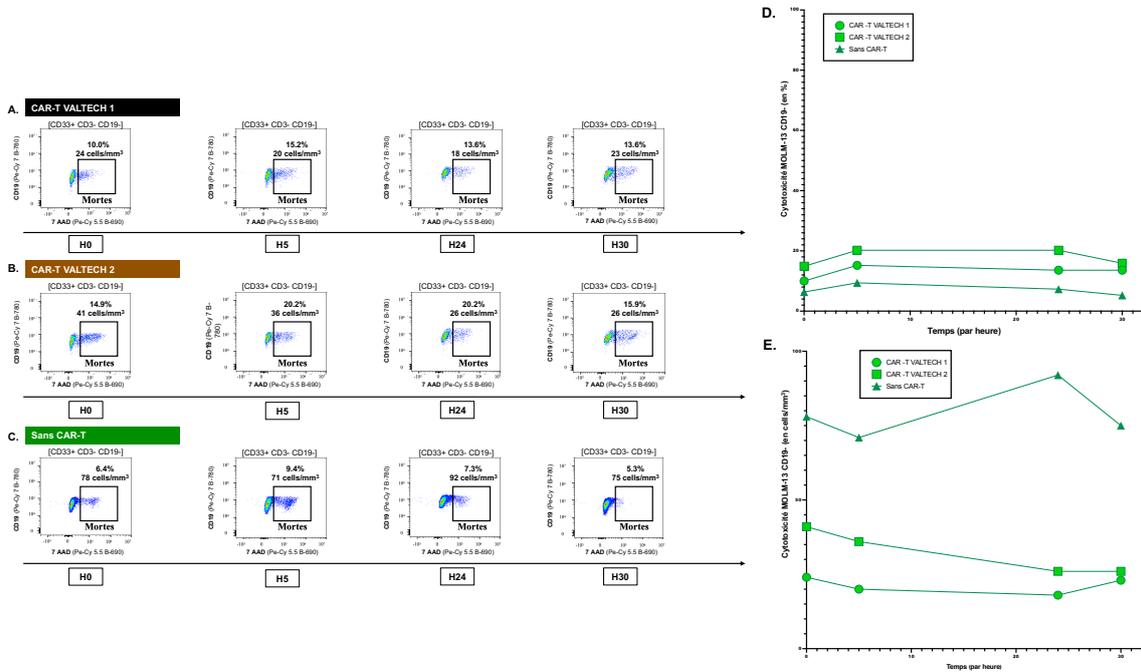


Figure 75 - Cytotoxicité sur les cellules MOLM-13 CD19- (deuxième expérience). (A), avec les cellules CAR-T VALTECH 1 ; (B), avec les cellules CAR-T VALTECH 2 ; (C), en culture seule (A, B, C à partir de FlowJo® (version 10.10.0)) ; (D), Taux de cytotoxicité au cours du temps ; (E), Nombre de cellules MOLM-13 CD19- mortes au cours du temps (D et E réalisées à partir de GraphPad Prism 10® (version 10.3.1)).

2. Expression du CD19 à la surface des MOLM-13 CD19-

Nous avons également examiné le comportement du marqueur CD19 à la surface des MOLM-13 CD19⁻, bien que ces cellules ne l'expriment pas. L'expression du CD19 reste complètement nulle au cours du temps dans toutes les conditions testées, et aucun changement phénotypique n'a été observé (Figures 76A, 76B, et 76C). Si, très rarement, une cellule parmi des milliers semble exprimer CD19, cela est considéré comme de l'accroche non spécifique de l'anticorps marqué. En effet, toutes les cellules (à l'exception de celles montrant une accroche aspécifique) étaient CD19⁻ à tous les temps étudiés (Figure 76D).

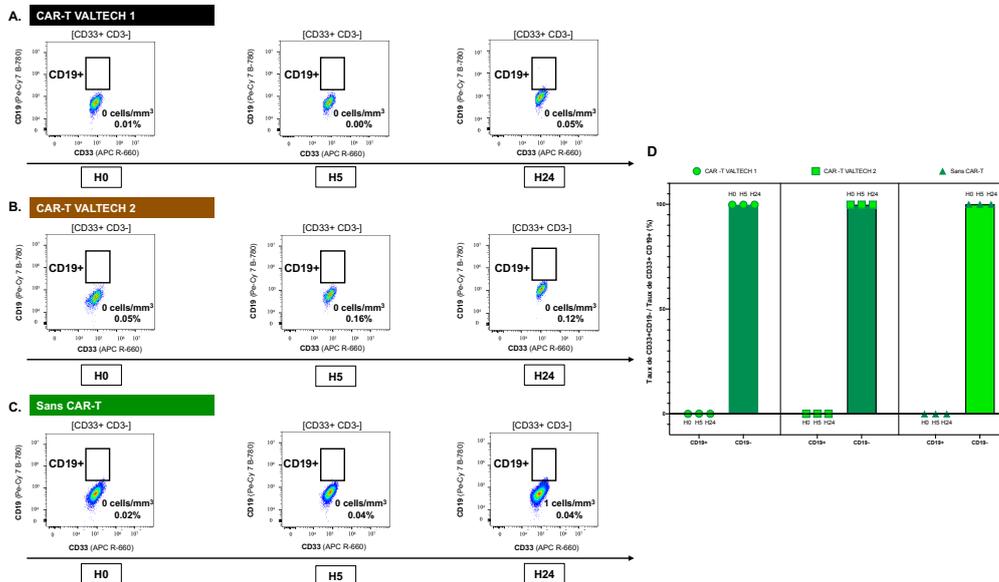


Figure 76 - Évolution du marqueur CD19 des cellules MOLM-13 CD19- (première expérience)(A), lors de la mise en coculture avec des cellules CAR-T VALTECH 1 ; (B), lors de la mise en coculture avec des cellules CAR-T VALTECH 2 ; (C), en culture seule (A, B, C à partir de FlowJo® (version 10.10.0)) ; (D), Taux de CD33+CD19+ et CD33+CD19- (%) aux différents temps de prélèvement. (Réalisée à partir de GraphPad Prism 10® (version 10.3.1)).

Au cours de la seconde expérience, les résultats sont similaires à ceux de la première, malgré un ratio E :C plus élevé, optimisant ainsi la concentration de cellules CAR-T vivantes par rapport à la première expérience. De même, à H30, aucune modification n'a été observée (Figures 77A, 77B, 77C). Ces résultats confirment la validité de ce témoin négatif, montrant l'absence d'évolutions phénotypiques des MOLM-13 CD19- au cours du temps, en présence ou en l'absence de cellules CAR-T (Figure 77D).

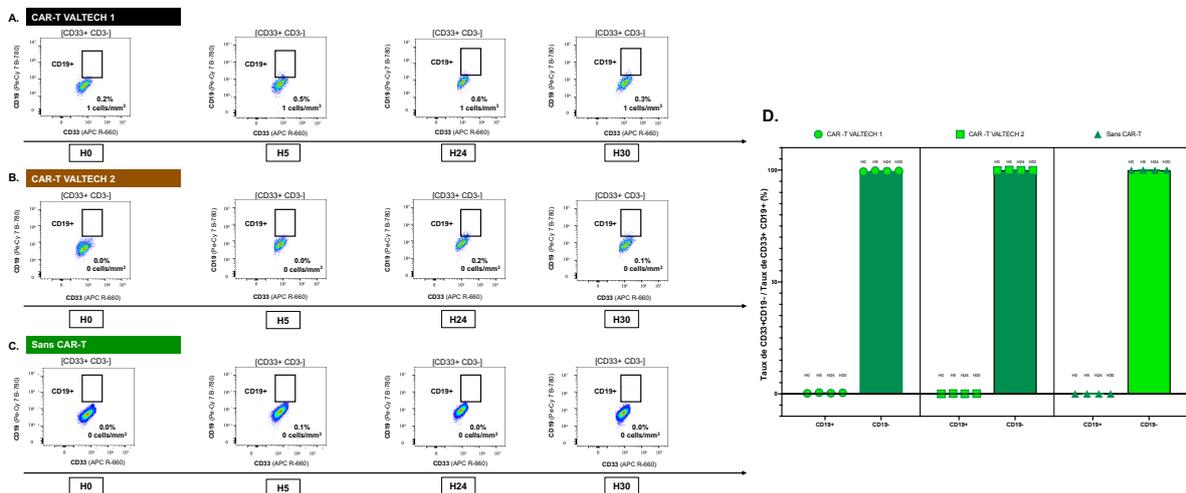


Figure 77 - Évolution du marqueur CD19 des cellules MOLM-13 CD19- (deuxième expérience)(A), lors de la mise en coculture avec des cellules CAR-T VALTECH 1 ; (B), lors de la mise en coculture avec des cellules CAR-T VALTECH 2 ; (C), en culture seule (A, B, C à partir de FlowJo® (version 10.10.0)) ; (D), Taux de CD33+CD19+ et CD33+CD19- (%) aux différents temps de prélèvement (Réalisée à partir de GraphPad Prism 10® (version 10.3.1)).

c) MOLM-13 CD19+

1. Cytotoxicité des cellules CAR-T sur des MOLM-13 CD19+

Après avoir analysé les deux situations avec les cellules RAJI et MOLM-13 CD19⁻, nous pouvons maintenant évaluer la cytotoxicité des cellules CAR-T produites sur la lignée cellulaire d'intérêt : MOLM-13 CD19⁺. Après 24 heures d'incubation, une lyse cellulaire est observée en présence des cellules CAR-T VALTECH 1 et 2. En effet, en coculture avec les cellules CAR-T, le pourcentage ainsi que le nombre de cellules MOLM-13 CD19⁺ mortes augmentent avec le temps, atteignant 61.7% (79 cellules/mm³) de mortalité à H24 avec les CAR-T VALTECH 1 et 82.1% (66 cellules/mm³) avec les CAR-T VALTECH 2 (Figures 78A et 78B). En revanche, le nombre de cellules MOLM-13 CD19⁺ mortes en culture seule reste inchangé après 24 heures d'incubation (environ 101 cellules/mm³) (Figure 78C). Les figures 78D et 78E révèlent des tendances similaires à celles observées avec les cellules RAJI :

- Une distinction entre les CAR-T VALTECH 1 et 2 au niveau du pourcentage de lyse à H24, avec un taux plus élevé pour les CAR-T VALTECH 2 (82.1% contre 61.7%).
- Une diminution du pourcentage de cellules MOLM-13 CD19⁺ mortes en culture seule (de 9.0% à H0 à 4.5% à H24), mais un nombre en valeur absolue stable (101 cellules/mm³).

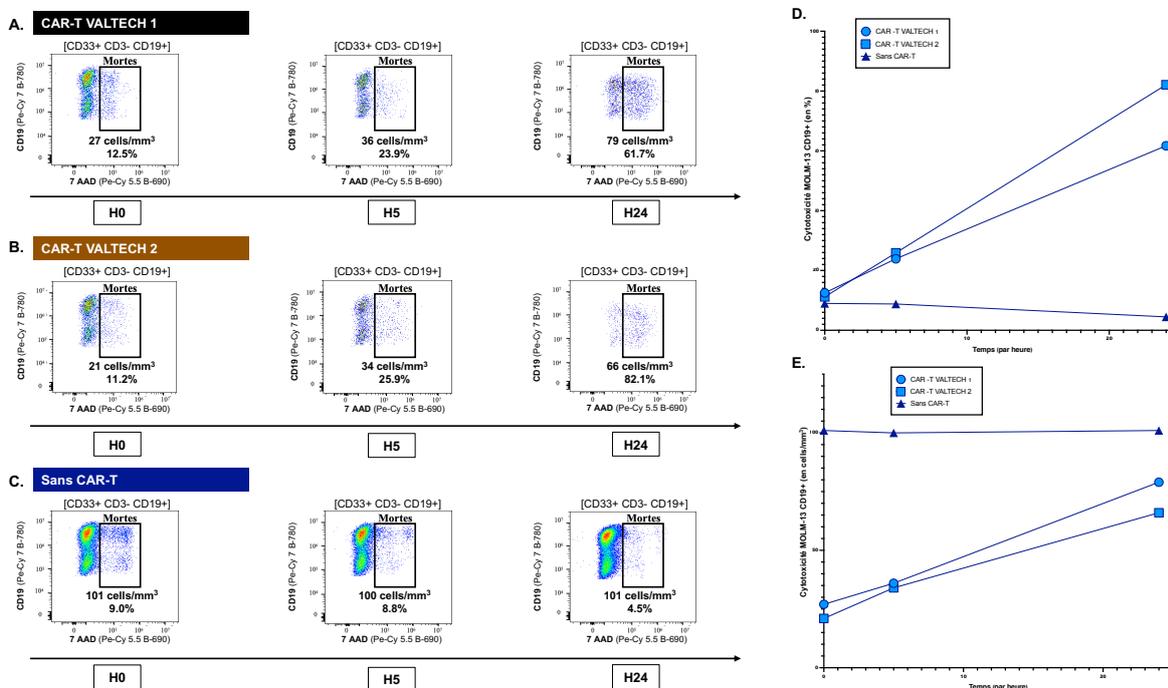


Figure 78 - Cytotoxicité sur les cellules MOLM-13 CD19+ (première expérience) (A), avec les cellules CAR-T VALTECH 1 ; **(B),** avec les cellules CAR-T VALTECH 2 ; **(C),** en culture seule (A, B, C à partir de FlowJo® (version 10.10.0)) ; **(D),** Taux de cytotoxicité au cours du temps. ; **(E),** Nombre de cellules MOLM-13 CD19+ mortes au cours du temps (D et E réalisées à partir de GraphPad Prism 10® (version 10.3.1)).

Lors de la deuxième expérience, nous observons les mêmes résultats : une cytotoxicité à H24 sur les MOLM-13 CD19⁺ pour les deux lots de cellules CAR-T produites et une diminution du taux de cellules mortes en culture seule même si le nombre en valeur absolue stagne (environ 70 cellules par mm³). Cependant à H30, le taux de cytotoxicité continue d'augmenter atteignant presque 100.0% pour les cellules CAR-T VALTECH 2. En parallèle pour la culture seule, il diminue encore jusqu'à 4.1% bien que le nombre en valeur absolue reste quasiment inchangé par rapport à H24 (73 cellules/mm³) (Figure 79).

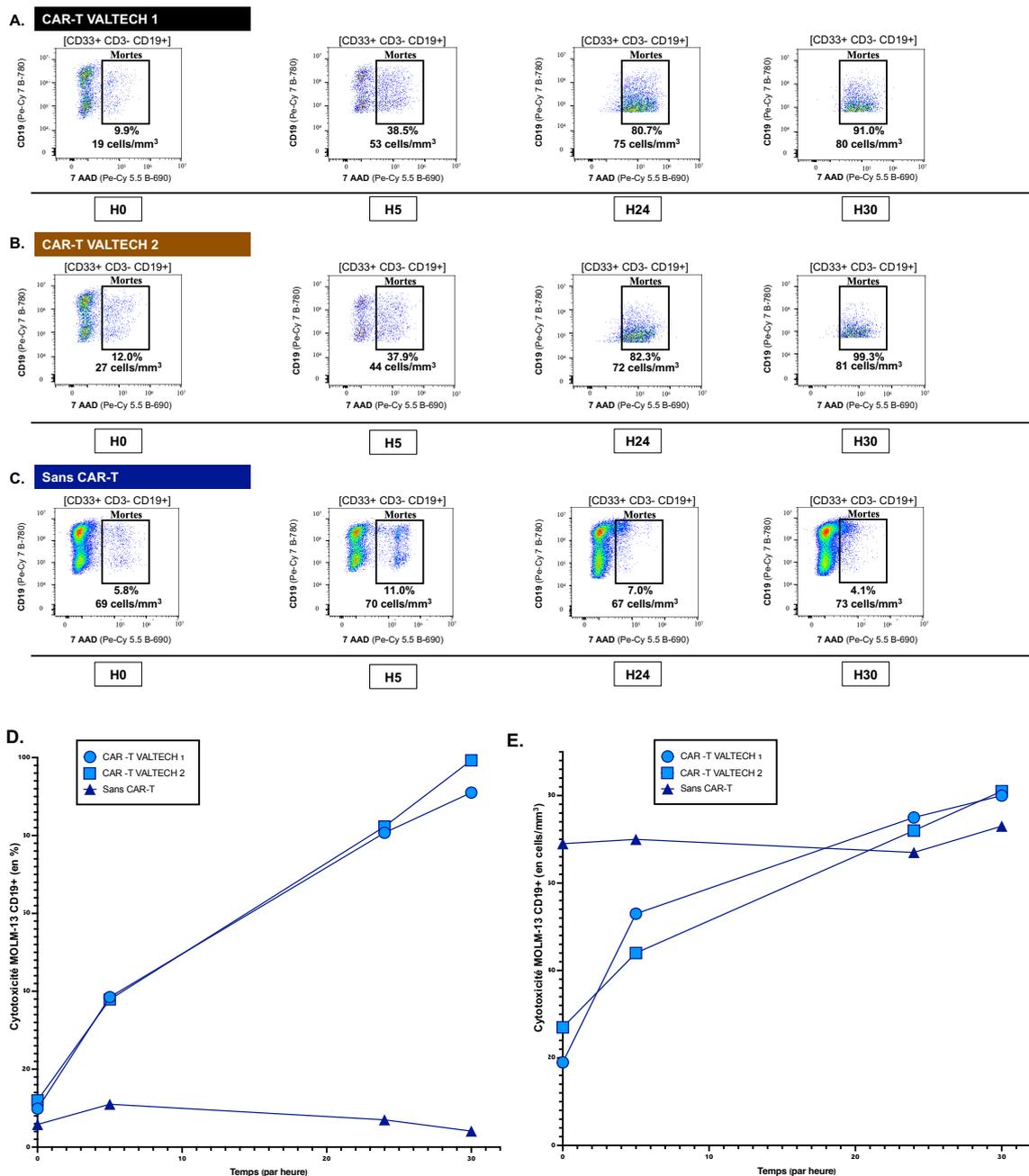


Figure 79 - Cytotoxicité sur les cellules MOLM-13 CD19⁺ (deuxième expérience) (A), avec les cellules CAR-T VALTECH 1 ; (B), avec les cellules CAR-T VALTECH 2 ; (C), en culture seule (A, B, C à partir de FlowJo® (version 10.10.0)) ; (D), Taux de cytotoxicité au cours du temps ; (E), Nombre de cellules MOLM-13 CD19⁺ mortes au cours du temps (D et E réalisées à partir de GraphPad Prism 10® (version 10.3.1)).

2. Expression du CD19 à la surface des MOLM-13 CD19+

a. Étude de l'évolution du marquage CD19

Contrairement aux cellules MOLM-13 CD19⁻, les MOLM-13 CD19⁺ expriment le marqueur CD19 à leur surface. Cette expression atteint près de 100 % à H0 dans les différentes conditions expérimentales (Figures 80A, 80B et 80C). Cependant, en présence de cellules CAR-T, l'expression de CD19 à la surface des MOLM-13 CD19⁺ diminue après 24 heures d'incubation, avec une proportion de cellules CD33+CD19⁺ atteignant 39,1 % avec les CAR-T VALTECH 1 et 25,3 % avec les CAR-T VALTECH 2. Ce changement phénotypique concerne aussi le CD33. A H24, les MOLM-13 CD19⁺ acquièrent effectivement un phénotype CD33⁻ CD19⁻ probablement en raison d'une lyse membranaire potentielle provoquée par l'interaction avec les cellules CAR-T. Parallèlement, le nombre de MOLM-13 CD19⁺ suit cette même tendance de diminution (Figure 80E). Une légère différence est observée entre les deux types de CAR-T, avec une réduction plus prononcée du pourcentage de cellules CD19⁺ pour les CAR-T VALTECH 2 à H24, ce qui pourrait s'expliquer par la proportion relative de cellules CD4/CD8 dans ce lot. En culture isolée, comme observé avec les cellules RAJI, le pourcentage de cellules CD19⁺ reste constant, avec un doublement du nombre de cellules CD19⁺ après 24 heures d'incubation (de 1127 cellules/mm³ à 2232 cellules/mm³), probablement grâce à un environnement propice à leur prolifération (Figures 80C et 80F).

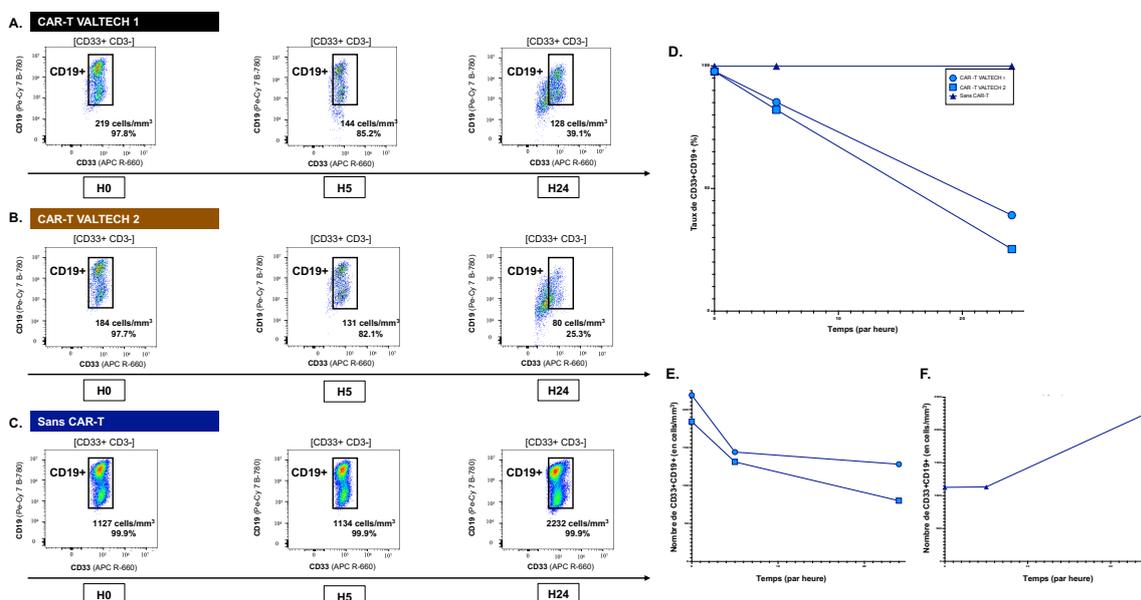


Figure 80 - Évolution du phénotype des cellules MOLM-13 CD19+ (première expérience)(A), lors de la mise en coculture avec des cellules CAR-T VALTECH 1 ; (B), lors de la mise en coculture avec des cellules CAR-T VALTECH 2 ; (C), en culture seule (A, B, C à partir de FlowJo® (version 10.10.0)) ; (D), Taux de cellules CD33+CD19+ (%) au cours du temps ; (E), Nombre de cellules MOLM-13 CD19+ (en valeur absolue) au cours du temps (D et E à partir de GraphPad Prism 10® (version 10.3.1).

La deuxième expérience vérifie ces premiers résultats. Nous pouvons observer qu'à H30 tout s'amplifie. En effet, les expressions du CD19 et du CD33 en présence de cellules CAR-T continuent de diminuer après H24 avec 35.5% de cellules CD33+CD19+ pour les CAR-T VALTECH 1 et 30.3% pour les CAR-T VALTECH 2. De plus, en culture isolée, le nombre de cellules CD19+ n'arrête pas d'augmenter après H24 (Figure 81). Ces tests confirment la cytotoxicité et l'effet anti-CD19 des cellules CAR-T produites sur cette lignée cellulaire correspondant à l'indication visée par les cellules CAR-T produites.

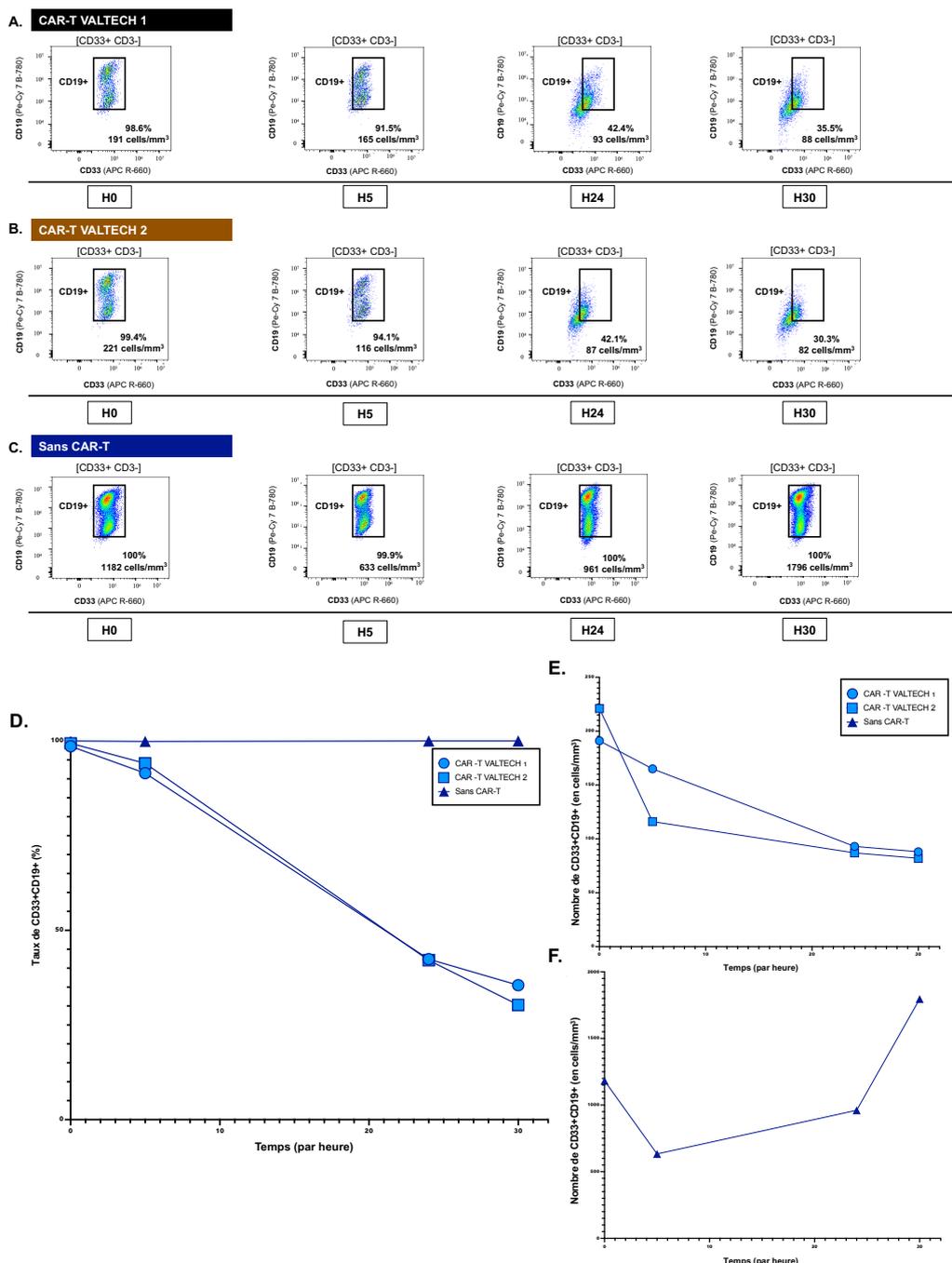


Figure 81 - Évolution du phénotype des cellules MOLM-13 CD19+ (deuxième expérience)(A), lors de la mise en coculture avec des cellules CAR-T VALTECH 1 ; (B), lors de la mise en coculture avec des cellules CAR-T VALTECH 2 ; (C), en culture seule (A, B,C à partir de FlowJo® (version 10.10.0)) ; (D), Taux de cellules CD33+CD19+ (%) au cours du temps ; (E), Nombre de cellules MOLM-13 CD19+ (en valeur absolue) au cours du temps (D et E à partir de GraphPad Prism 10® (version 10.3.1).

b. Perméabilisation cellulaire

À la suite de la première expérience dans laquelle nous avons observé une diminution de l'expression du CD19 après interaction avec les cellules CAR-T, nous avons cherché à déterminer si ce phénomène était dû à une internalisation du CD19 dans les cellules cibles. Ainsi, en parallèle des études de cytotoxicité sur les cellules MOLM-13 CD19⁺, lors de la seconde expérience, nous avons réalisé une perméabilisation cellulaire afin d'analyser l'expression du CD19 en intra- et extracellulaire dans différentes conditions (avec ou sans cellules CAR-T). La figure 82 illustre l'évolution de l'expression du CD19 dans les cellules présentes dans le milieu de culture, ainsi que l'expression de l'IgG1 à la surface des membranes, utilisée comme contrôle isotypique.

En présence de cellules CAR-T, le pourcentage d'expression du CD19 en extracellulaire diminue à H24, avec une proportion de cellules CD33+CD19+ atteignant 8,3 % avec les CAR-T VALTECH 1 et 5,7 % avec les CAR-T VALTECH 2 (Figures 82A et 82B). En revanche, en l'absence de cellules CAR-T, le pourcentage de cellules CD19+ reste stable autour de 90,0 %, avec une légère augmentation à chaque temps d'étude (Figures 82C et 82D). Ces résultats confirment les observations précédentes concernant la diminution de l'expression du CD19 extracellulaire en présence de cellules CAR-T.

Par ailleurs, les figures 82A, 82B et 82C montrent l'absence d'expression de l'IgG1 à la surface de toutes les cellules étudiées. La figure 82E est un exemple représentatif d'histogramme représentant l'expression d'IgG1 et nous retrouvons le même profil pour toutes les autres conditions testées (données non présentées). Cela révèle qu'aucun pic supérieur à 10^4 n'est observé pour l'expression de l'IgG1, ce qui permet de fixer le seuil de positivité pour l'expression intracellulaire du CD19 à 2×10^4 .

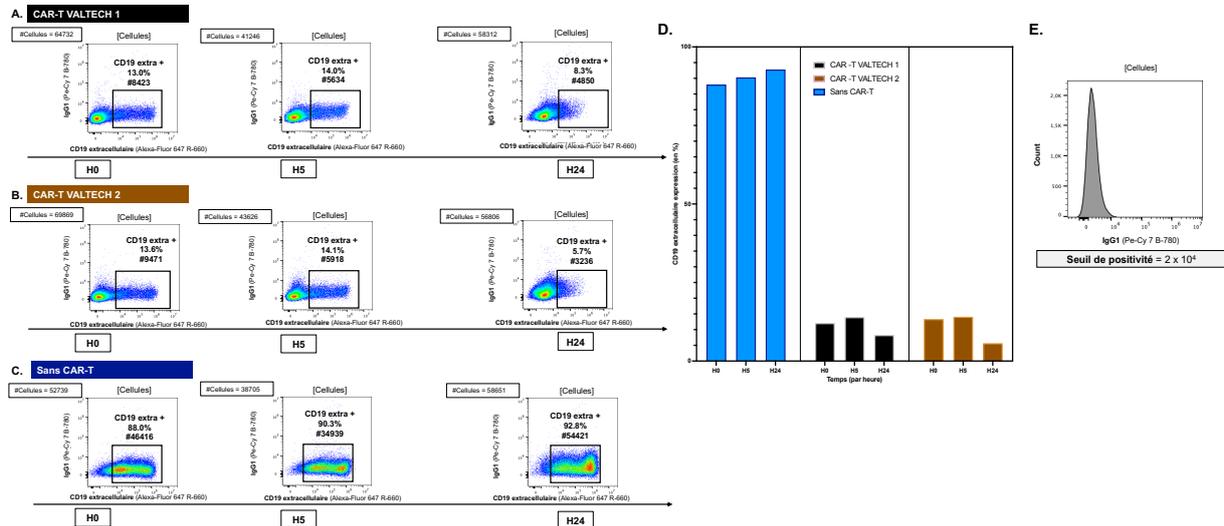


Figure 82 - Évolution des expressions extracellulaires du CD19 et de l'IgG1 des cellules MOLM-13 CD19⁺ (A), lors de la mise en coculture avec des cellules CAR-T VALTECH 1 ; **(B),** lors de la mise en coculture avec des cellules CAR-T VALTECH 2 ; **(C),** en culture seule (A, B, C à partir de FlowJo® (version 10.10.0)); **(D),** Taux de cellules CD19^{extra+} (%) au cours du temps suivant les différentes conditions (avec ou sans cellules CAR-T) (Réalisé à partir de GraphPad Prism 10® (version 10.3.1)); **(E),** Exemple d'un histogramme d'expression de l'IgG1 (À partir de FlowJo® (version 10.10.0)). # correspond au nombre de cellules.

La figure 83 illustre l'évolution du pourcentage de cellules CD19^{extra+} et CD19^{intra+} ainsi que les modifications phénotypiques observables. En présence de cellules CAR-T, les cellules initialement CD19^{intra+} CD19^{extra+} changent de phénotype pour devenir CD19^{intra+} CD19^{extra-}. En effet, le pourcentage de cellules CD19^{intra+} CD19^{extra+} diminue, atteignant 10,6 % avec les CAR-T VALTECH 1 et 11,4 % avec les CAR-T VALTECH 2 (Figures 83A et 83B). Comme précédemment décrit, les cellules exposées aux CAR-T perdent progressivement leur antigène CD19 en surface au fil du temps. En revanche, en culture isolée, le pourcentage de cellules CD19^{intra+} CD19^{extra+} augmente, passant de 81,4 % à 91,6 % après 24 heures d'incubation (Figure 83C).

Les figures 83D et 83E permettent d'approfondir l'analyse en se concentrant sur l'expression isolée du CD19, tant en extracellulaire qu'en intracellulaire. D'une part, la figure 83D confirme à nouveau les résultats antérieurs : une diminution progressive du taux de cellules CD19^{extra+} en présence de cellules CAR-T. D'autre part, la figure 83E montre une augmentation du taux de cellules CD19^{intra+} au fil du temps, suggérant une possible internalisation de ce marqueur à la suite de l'interaction avec les cellules CAR-T. Parallèlement, en absence de cellules CAR-T, les taux de cellules CD19^{intra+} ou CD19^{extra+} demeurent inchangés et très élevés (supérieurs à 90 %) au cours du temps.

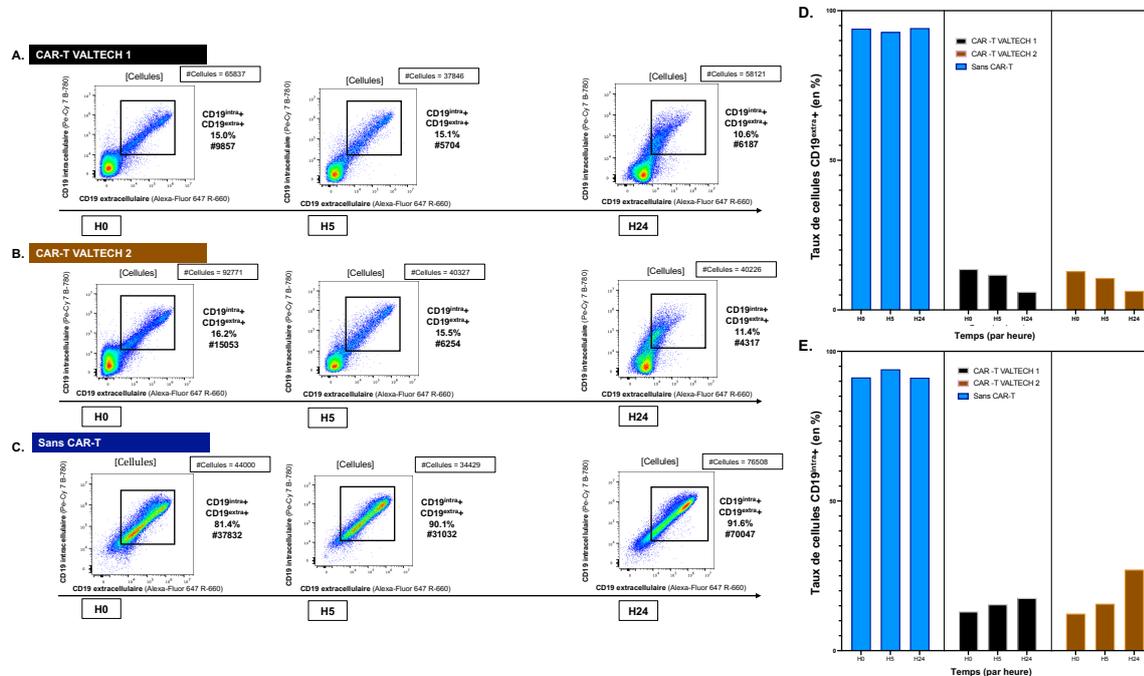


Figure 83 - Évolution des phénotypes par rapport au CD19 en extra et intracellulaires des cellules MOLM-13 CD19⁺ (A), lors de la mise en coculture avec des cellules CAR-T VALTECH 1 ; (B), lors de la mise en coculture avec des cellules CAR-T VALTECH 2 ; (C), en culture seule (A, B,C à partir de FlowJo® (version 10.10.0)) ; (D), Taux de cellules CD19^{extr+} (%) au cours du temps suivant les différentes conditions (avec ou sans cellules CAR-T); (E), Taux de cellules CD19^{intra+} (%) au cours du temps suivant les différentes conditions (avec ou sans cellules CAR-T) (Réalisées à partir de GraphPad Prism 10® (version 10.3.1)) # correspond au nombre de cellules

d) Comparaison de toutes les lignées entre elles

1. Cytotoxicité des cellules CAR-T sur les différentes lignées cellulaires au cours des deux expériences

Sur les figures 84A et 84B, que ce soit en coculture avec les cellules CAR-T ou en culture seule, les deux expériences montrent des résultats similaires :

- Pour les cellules RAJI, nous observons une augmentation du taux de cytotoxicité au fil du temps en présence de cellules CAR-T, tandis que ce taux reste stable ou diminue en leur absence.
- Pour les cellules MOLM-13 CD19⁻, aucune cytotoxicité n'est constatée en présence des cellules CAR-T.
- Pour les cellules MOLM-13 CD19⁺, la cytotoxicité des cellules CAR-T augmente au fil du temps, atteignant presque 100 % lors de la seconde expérience.
- Les résultats observés avec les MOLM-13 CD19⁺ sont similaires à ceux obtenus avec les RAJI.

Cependant, nous remarquons que le nombre de cellules RAJI 7-AAD⁺ en présence de cellules CAR-T, en valeur absolue, est plus faible lors de la seconde expérience par rapport à la première (Figures 84A et 85A). Cela pourrait être dû à un stress de culture des cellules RAJI. Toutefois, pour les deux autres lignées cellulaires, le nombre en

valeur absolue de cellules 7-AAD+ au cours de la seconde expérience a l'air d'être à peu près du même ordre de grandeur que ceux de la première malgré les modifications faites concernant le ratio E:C (Figures 84, 85B et 85C).

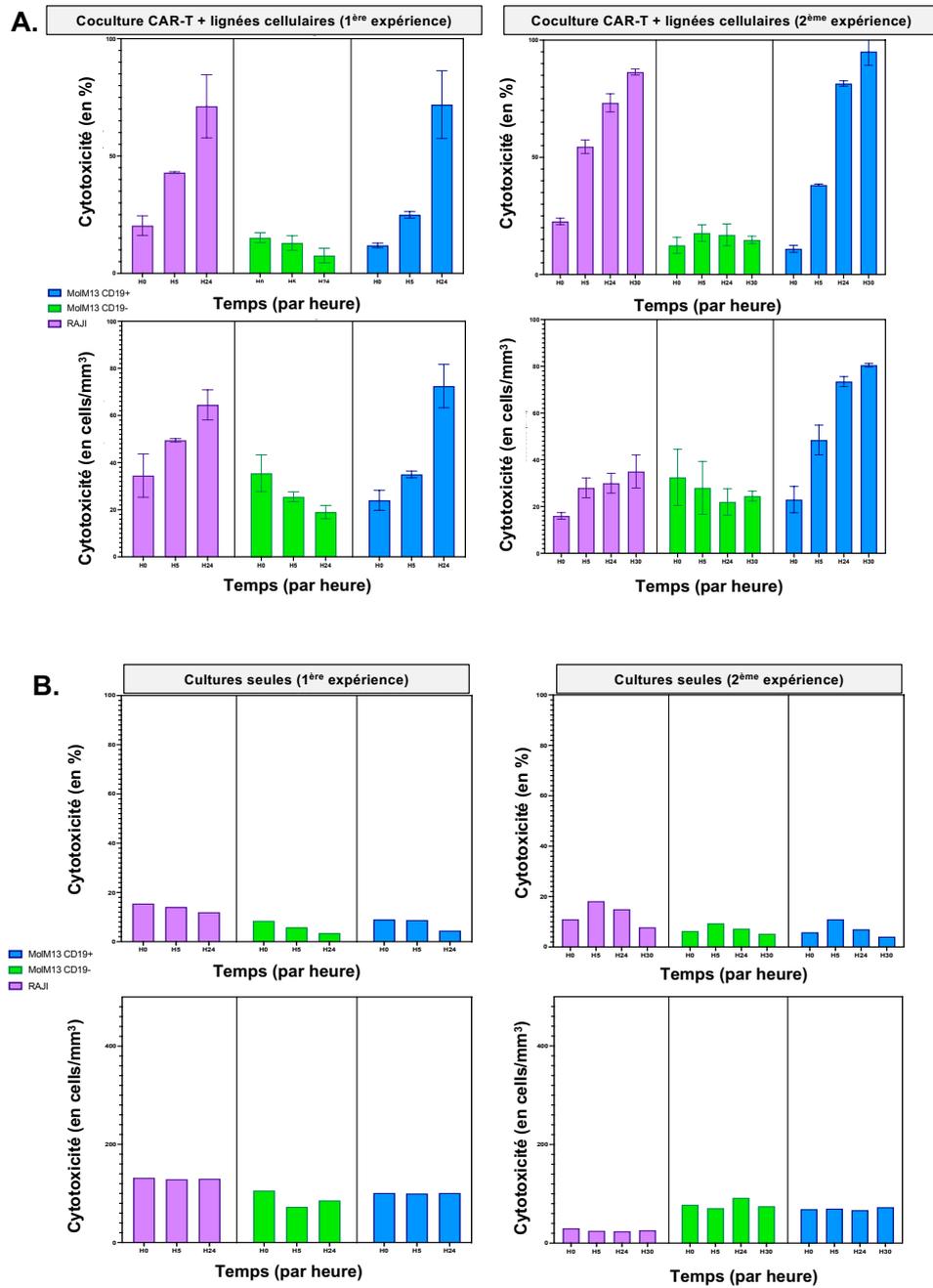


Figure 84 - Étude de la viabilité des différentes lignées cellulaires en fonction du temps dans les deux expériences réalisées (A), en présence de cellules CAR-T ; (B), en l'absence de cellules CAR-T (Réalisées à partir de GraphPad Prism 10® (version 10.3.1))

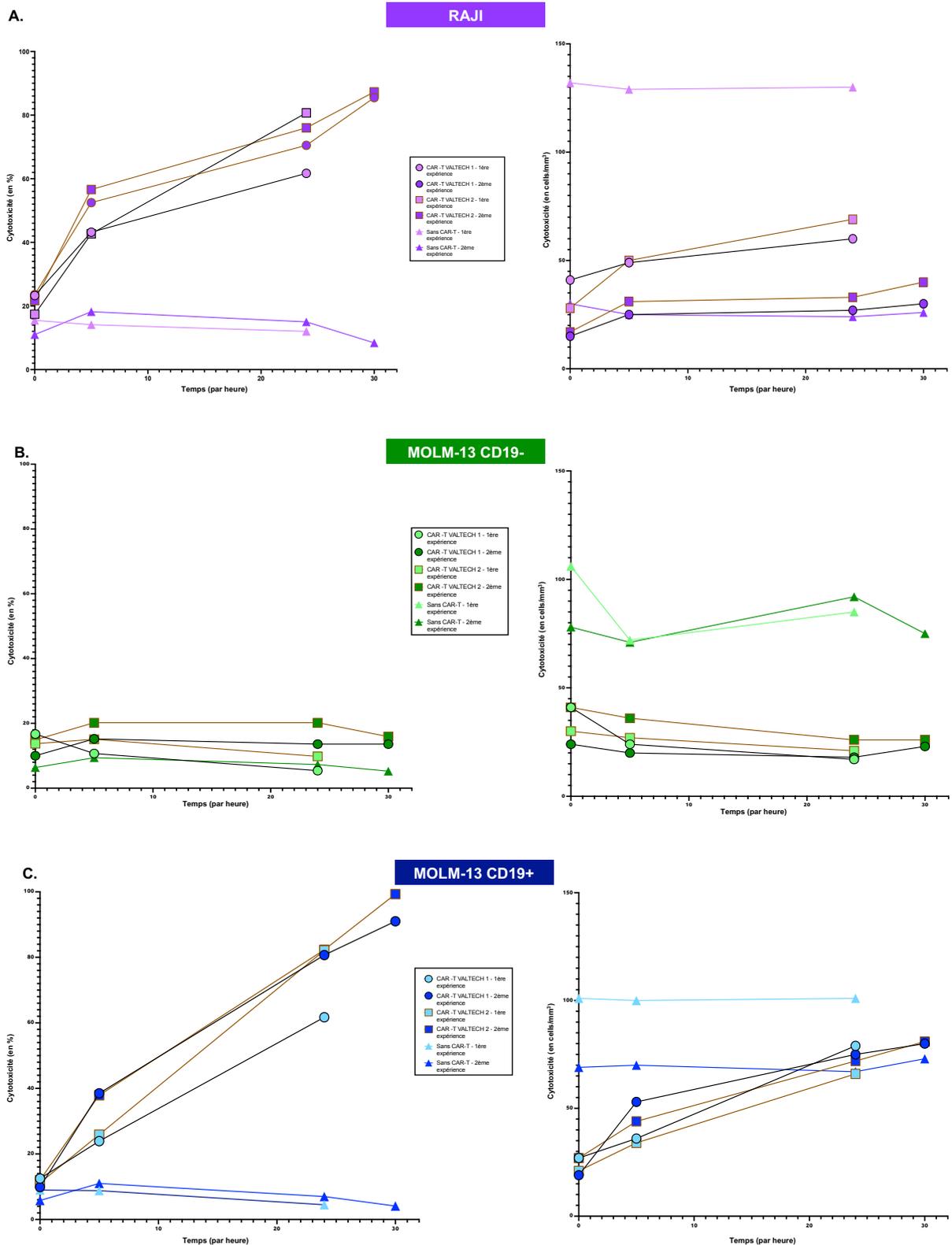


Figure 85 – Évolution de la viabilité des différentes lignées cellulaires au cours du temps en présence et absence de cellules CAR-T (A), RAJI ; (B), MOLM-13 CD19- et (C) MOLM-13 CD 19+ (Réalisées à partir de GraphPad Prism 10® (version 10.3.1))

Sur la figure 85, nous pouvons observer que la cytotoxicité des CAR-T sur les cellules RAJI et MOLM-13 CD19⁺ à H5 lors de la première expérience est plus faible que pour la deuxième expérience. En revanche, à H24, cette cytotoxicité semble être assez comparable entre les 2 expériences. En effet, la cytotoxicité moyenne des cellules

CAR-T est significativement plus importante à H5 pour la deuxième expérience par rapport à la première pour les RAJI et les MOLM-13 CD19⁺ (*p-value* < 0.05 pour les RAJI et *p-value* < 0.01 pour les MOLM-13 CD19⁺). Mais à H24, cette différence n'est statistiquement pas significative (Figure 86 et Table supplémentaire 5).

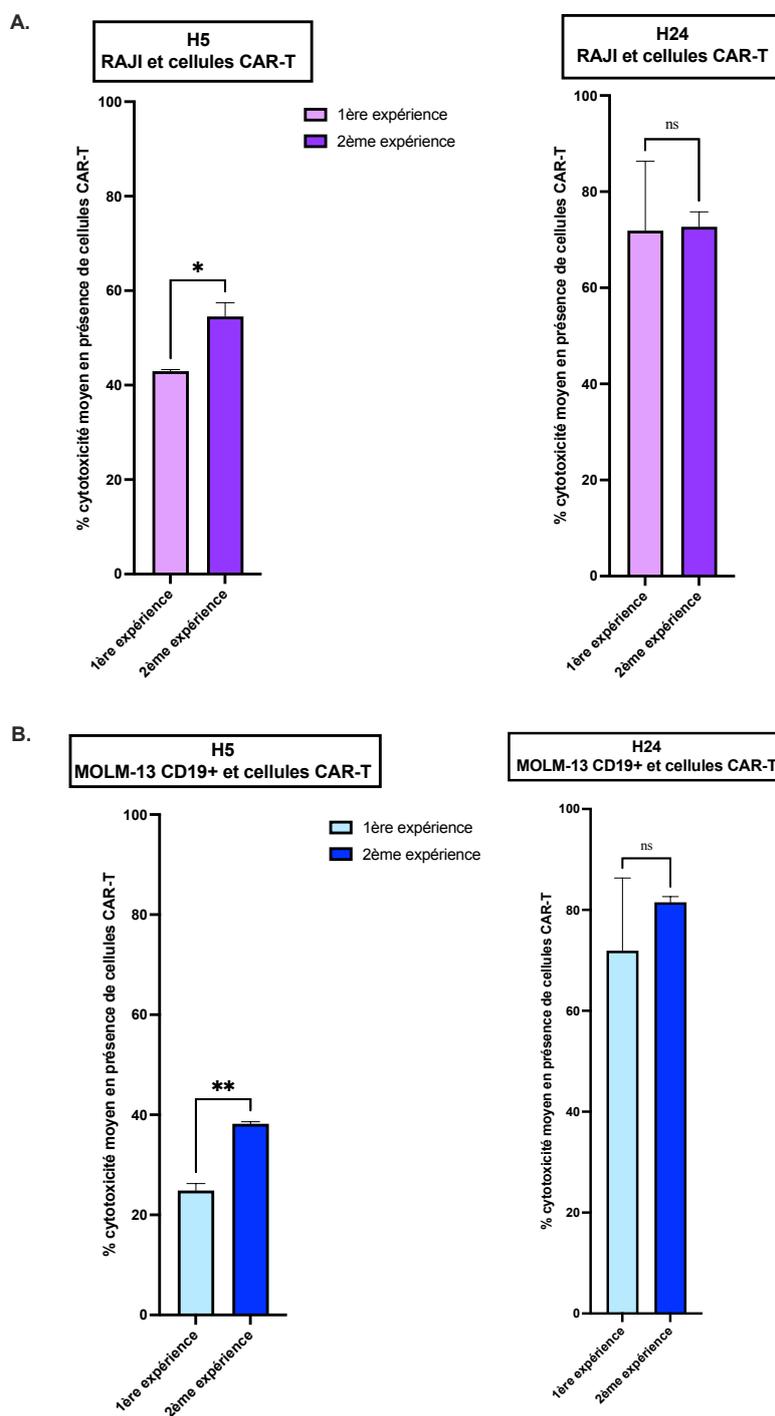


Figure 86 – Comparaison entre les deux expériences réalisées des pourcentages moyens de cytotoxicité des cellules CAR-T à H5 et H24 (A), pour les RAJI ; (B), pour les MOLM-13 CD19⁺ (Réalisées à partir de GraphPad Prism 10 (version 10.3.1) (ns, *, ** correspondent respectivement à une *p-value* non significative, *p-value* < 0.05 et *p-value* < 0.01).

Des analyses non supervisées sous forme de UMAP ont également été réalisées à partir des données de CMF issues de la seconde expérience. L'objectif était de mettre en évidence les cellules mortes à différents temps de prélèvement pour les trois

lignées cellulaires testées, que ce soit en coculture avec les cellules CAR-T ou en culture seule (Figure 87). Les trois lignées, à savoir les RAJI, les MOLM-13 CD19⁻ et les MOLM-13 CD19⁺, partagent un point commun phénotypique : elles expriment toutes le CD45 mais pas le CD3. Nous avons donc focalisé l'analyse sur cette population de cellules en fonction des différentes conditions expérimentales. Au préalable, nous avons concaténé toutes les populations CD45⁺ CD3⁻ pour chaque temps de prélèvement, en séparant celles provenant des cocultures de celles issues des cultures isolées. Les cellules mortes sont représentées en rouge sur les différentes UMAP avec comme phénotype CD45⁺ CD3⁻ 7-AAD⁺. Il est possible d'observer qu'en coculture, la proportion de cellules mortes est beaucoup plus importante qu'en culture seule. En effet, la part de cellules mortes CD45⁺ CD3⁻ issues des cultures seules est négligeable par rapport à la situation des cocultures. Plus le temps de prélèvement avance, plus la proportion de cellules mortes augmente dans les UMAPs des cocultures, ce qui traduit l'action cytotoxique progressive des cellules CAR-T sur les cellules RAJI et MOLM-13 CD19⁺. La proportion de cellules CD45⁺ CD3⁻ restantes encore vivantes à H30 correspond principalement aux cellules MOLM-13 CD19⁻, pour lesquelles aucun effet cytotoxique des cellules CAR-T n'a été observé.

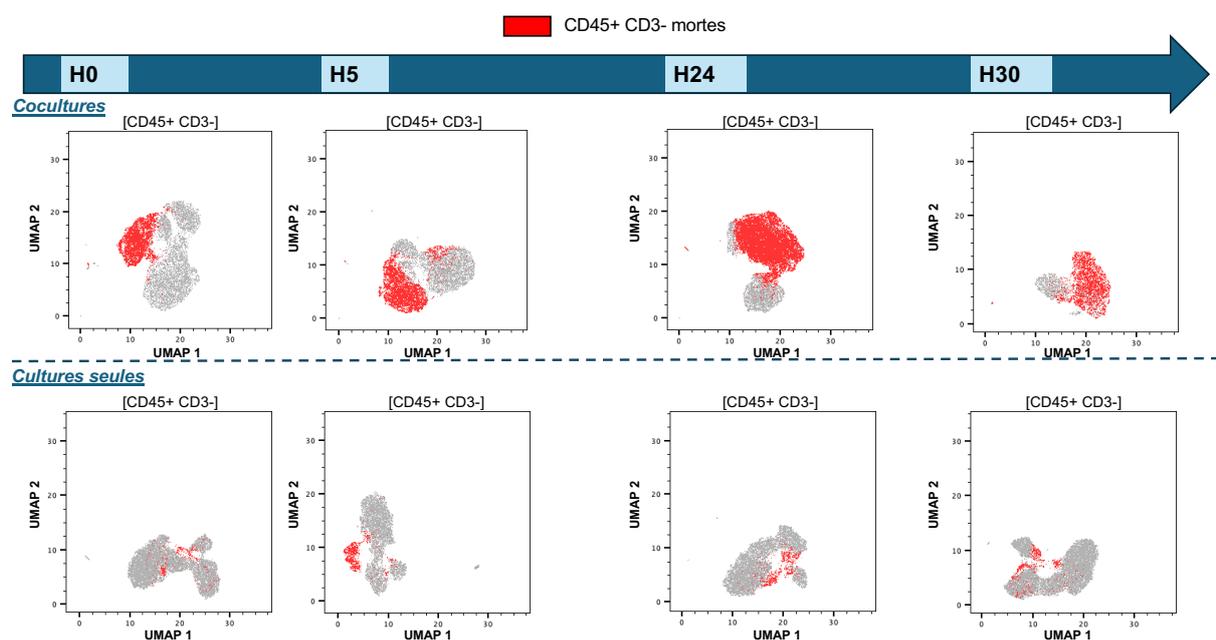


Figure 87 – Diverses UMAP représentant l'évolution en fonction du temps de la part des cellules CD45⁺ CD3⁻ mortes (7-AAD⁺) provenant des cocultures avec les cellules CAR-T ((CAR-T VALTECH 1 ou CAR-T VALTECH 2) (en haut) et cultures seules (en bas) des différentes lignées cellulaires testées (RAJI, MOLM-13 CD19⁻ et MOLM-13 CD19⁺) (Réalisées à partir de FlowJo® (version 10.10.0))

2. Évolution du taux de cellules CD19⁺ parmi les différentes lignées au cours des deux expériences

Les figures 88 et 89 illustrent, de deux façons différentes, l'évolution de l'expression du CD19 au fil du temps pour les différentes lignées cellulaires, en coculture avec les

cellules CAR-T ou en culture isolée, dans les deux expériences réalisées. D'après la figure 88, nous pouvons constater les points suivants :

- Pour les cellules RAJI et MOLM-13 CD19⁺, nous observons une diminution du pourcentage de cellules CD19⁺ au cours du temps après contact avec les cellules CAR-T (Figure 88A), tandis qu'en absence de ces dernières, le taux de cellules CD19⁺ reste stable. Néanmoins le nombre absolu de cellules augmente probablement en raison de leur prolifération (Figure 88B).
- Pour les cellules MOLM-13 CD19⁻, qu'elles soient en coculture ou en culture isolée, aucune expression de CD19 à la surface n'a été détectée, et aucun autre effet notable n'a été observé.

Toutefois, le phénomène concernant les cellules RAJI déjà observé antérieurement lors de l'étude de cytotoxicité se retrouve dans ces figures 88 et 89 : la quantité absolue de cellules RAJI exprimant initialement le CD19 est plus faible que lors de la première expérience (Figures 88A et 89A). Comme précédemment, les résultats obtenus en valeur absolue lors de la seconde expérience pour les lignées MOLM-13 sont comparables à ceux de la première (Figures 88, 89B et 89C).

Sur la figure 89C, nous pouvons remarquer que les pourcentages de cellules CD19⁺ parmi les MOLM-13 CD19⁺ à H5 et H24 en présence de cellules CAR-T sont inférieurs lors de la première expérience par rapport à la deuxième indépendamment de la cytotoxicité. En effet, le pourcentage moyen de MOLM-13 CD19⁺ exprimant le CD19 en présence de cellules CAR-T à H5 est statistiquement plus faible lors de la première expérience mais ce n'est pas le cas à H24 (p -value < 0.05 à H5) (Figure 90).

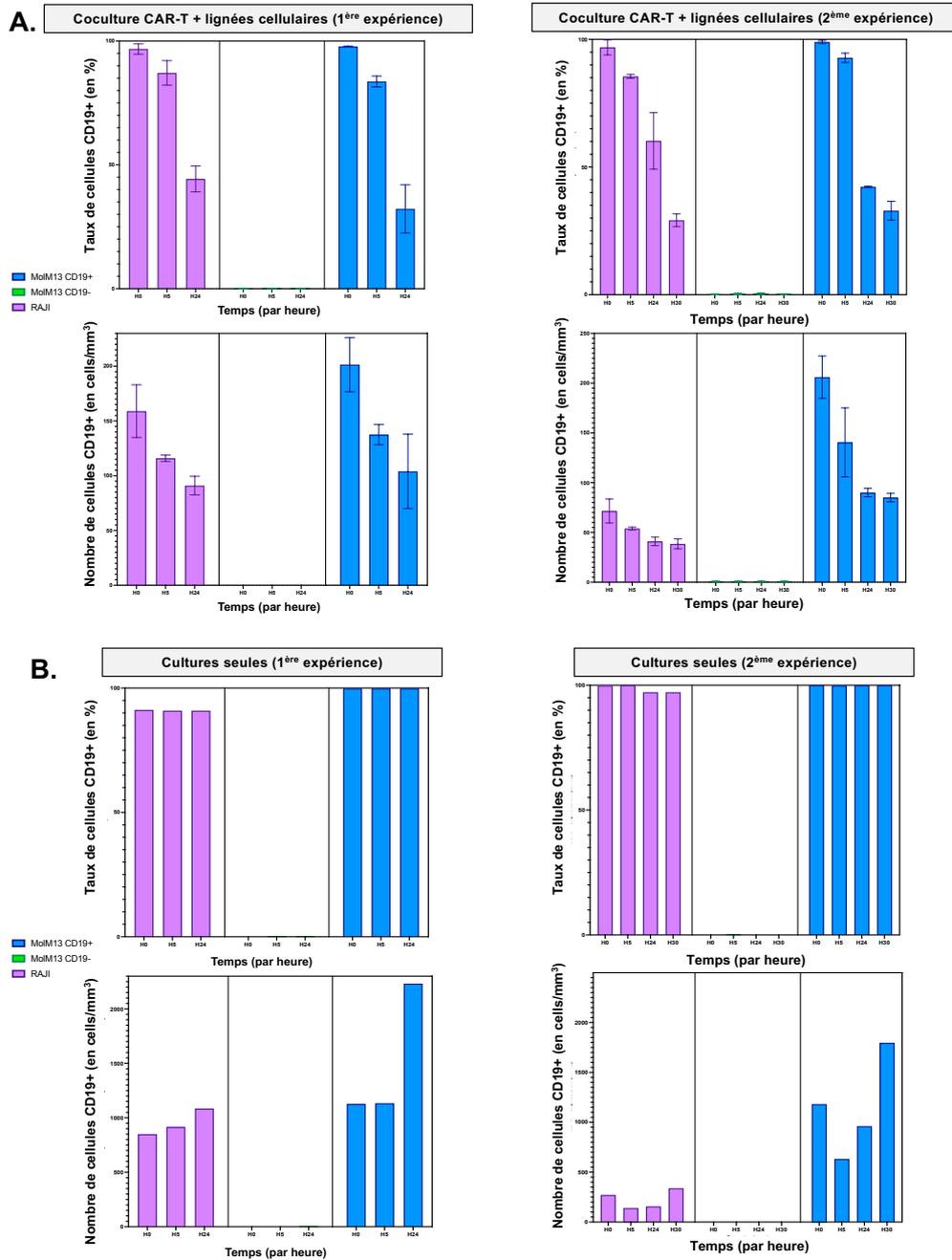


Figure 88 - Étude du taux et du nombre de cellules CD19+ des différentes lignées cellulaires en fonction du temps dans les deux expériences réalisées (A), en présence de cellules CAR-T ; (B), en l'absence de cellules CAR-T (Réalisées à partir de GraphPad Prism 10® (version 10.3.1))

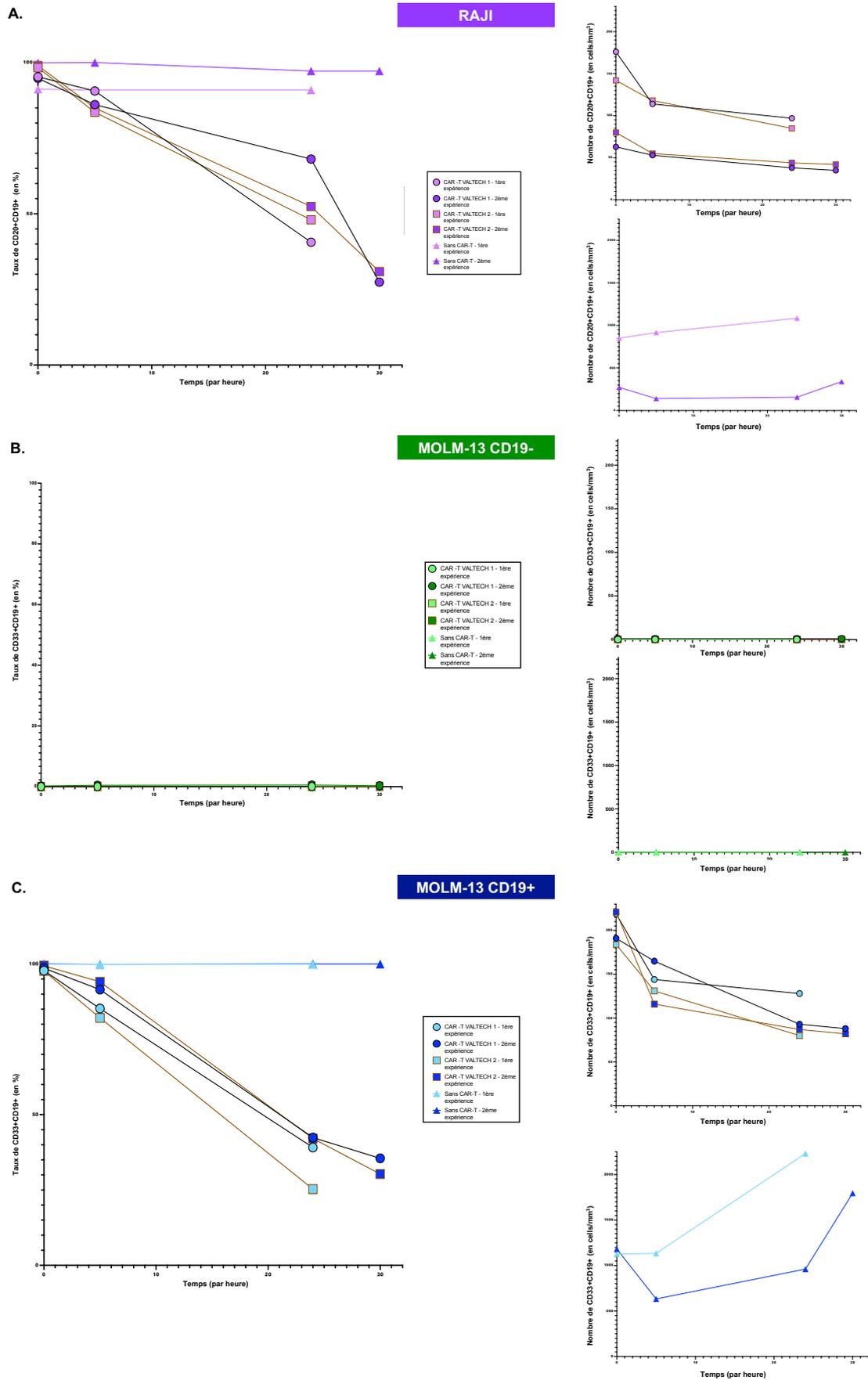


Figure 89 - Évolution du pourcentage et du nombre de cellules CD19+ au cours du temps en présence et absence de cellules CAR-T (A), pour les RAJI ; (B), les MOLM-13 CD19- ; (C), les MOLM-13 CD 19+ (Réalisées à partir de GraphPad Prism 10® (version 10.3.1))

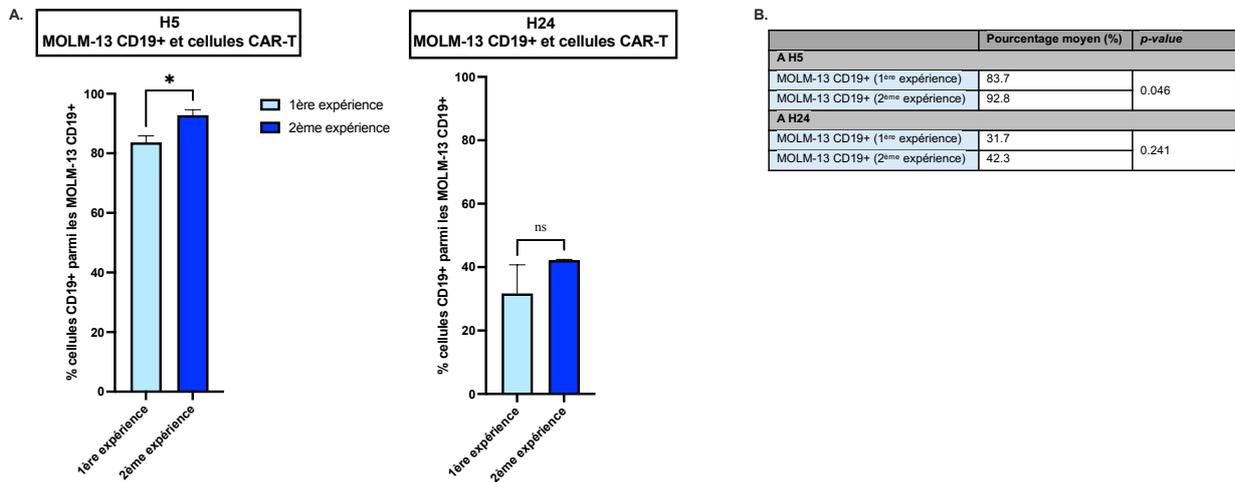


Figure 90 – Comparaison entre les deux expériences réalisées (A), Comparaison statistique des pourcentages moyens de cellules CD19+ parmi les MOLM-13 CD19+ en présence des cellules CAR-T à H5 et H24 (Réalisées à partir de GraphPad Prism 10 (version 10.3.1)(ns, *, ** correspondent respectivement à une *p-value* non significative, *p-value* < 0.05 et *p-value* < 0.01) ; **(B)**, Table rapportant les données de pourcentage moyen avec la valeur de la p-value (Statistiques réalisées à l'aide d'un test t de Student sur échantillons non appariés grâce à GraphPad Prism 10® (version 10.3.1)).

Ensuite, les analyses non supervisées en UMAP précédemment générées nous ont permis également d'examiner l'évolution du niveau d'expression du marqueur CD19 au fil du temps, en présence et en absence de cellules CAR-T (Figure 91). Cette représentation valide les résultats retrouvés précédemment, sachant que le taux de cellules CD19+ au bout de 30 heures d'incubation devient quasiment nul en condition de coculture alors qu'il reste encore élevé en culture seule. En superposant les figures 87 et 91 nous pouvons noter les observations suivantes :

- A H0 et H5, les cellules mortes concernaient des cellules qui exprimaient encore du CD19 à leur surface. Mais, à partir de H24, seulement une infime partie continuait à exprimer du CD19. Après transposition avec l'UMAP précédente (Figure 87), nous pouvons remarquer que cette partie de cellules CD19+ en figure 91 correspond à des cellules mortes.
- Toute la population cellulaire restante vivante à H30 est CD19 négative. Cela représente soit les RAJI ou MOLM-13 CD19+ encore vivantes ayant probablement perdu leur CD19 membranaire sans encore être entrées dans le processus d'apoptose soit les MOLM-13 CD19- qui n'exprimaient déjà pas initialement le CD19 et avec lesquelles aucun effet cytotoxique des cellules CAR-T n'a été démontré.

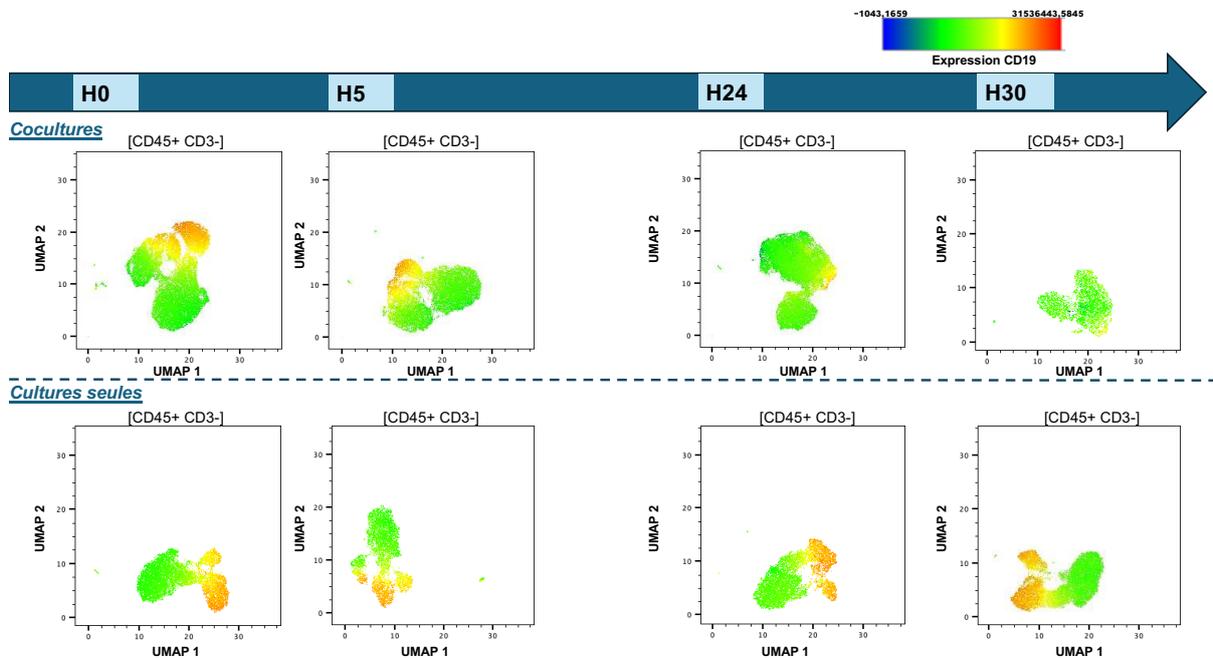


Figure 91 - Diverses UMAP représentant l'évolution en fonction du temps de l'expression du CD19 extracellulaire de la part des cellules CD45+ CD3- provenant des cocultures avec les cellules CAR-T ((CAR-T VALTECH 1 ou CAR-T VALTECH 2) (en haut) et cultures seules (en bas) en concaténant les différentes lignées cellulaires entre elles testées (RAJI, MOLM-13 CD19- et MOLM-13 CD19+)) (Réalisées à partir de FlowJo® (version 10.10.0))

C) Étude de la capacité fonctionnelle des cellules CAR-T par ELISpot

Pour évaluer la fonctionnalité des cellules CAR-T, nous avons réalisé un test ELISpot en utilisant des cellules RAJI viables et cryoconservées, des MOLM-13 CD19⁺ et des MOLM-13 CD19⁻, avec un nombre constant de 130 000 cellules par puits pour chaque lignée. Deux ELISpot ont été effectués pour une meilleure optimisation et reproductibilité de la méthode (Figure 92). Les résultats attendus pour les conditions témoins ont été validés pour les deux lots de cellules CAR-T (Figures 92A et 92B). Comme précédemment observé pour les RAJI, un effet de saturation a été noté, rendant le nombre de spots inquantifiable ou difficilement détectable. Toutefois, les réactions sont considérées comme positives. Un halo apparaît pour les puits avec les cellules RAJI en Figure 92B, sûrement dû à un défaut technique, mais cela n'a pas empêché la lecture ni de conclure sur la présence de spots dans ces puits. Par ailleurs, pour les cellules MOLM-13 CD19⁻, le nombre de spots était similaire à celui du témoin négatif, confirmant l'absence de réponse cytotoxique. Pour les MOLM-13 CD19⁺, les résultats étaient comparables à ceux du témoin positif, sans effet de saturation, indiquant une production d'IFN- γ en réponse au contact avec les cellules CAR-T (Figures 92A et 92B). Que ce soit avec les cellules CAR-T VALTECH 1 ou VALTECH 2 dans les deux ELISpot réalisés, les résultats sont similaires, confirmant la

fonctionnalité des cellules CAR-T produites à Lille sur les cellules blastiques myéloïdes d'intérêt.



Figure 92 – Étude de fonctionnalité des cellules CAR-T VALTECH 1 et VALTECH 2 produites au CHU de Lille avec un test ELISpot IFN- γ sur les différentes lignées cellulaires (RAJI, MOLM-13 CD19- et MOLM-13 CD19+). (A), ELISpot de la première expérience ; (B), ELISpot de la deuxième expérience. Lorsque la couleur rouge est assignée à une ligne du test, cela indique que la réaction sur l'ELISpot est négative. En revanche, si la couleur est verte, la réaction sur l'ELISpot est positive (- indique inférieur à 10 spots, + entre 10 et 50 spots, ++ entre 50 et 250 spots, +++ supérieur à 250 spots)

VI. DISCUSSION

La LAM CD19+ est une hémopathie maligne marquée par un risque élevé de rechute et une résistance fréquente aux traitements conventionnels. Cette situation place les cliniciens face à un véritable défi thérapeutique, avec peu d'options disponibles pour les patients atteints. Toutefois, avec l'essor de l'immunothérapie en oncologie et en hématologie, de nouvelles perspectives de traitements émergent. Parmi celles-ci, les cellules CAR-T suscitent un intérêt croissant et se sont imposées comme une option thérapeutique prometteuse. Cependant, la LAM CD19+ est une maladie touchant 2 à 3 patients par an dans un CHU tel que celui de Lille. En raison de cette faible incidence, cette indication ne représente pas une priorité pour les industriels spécialisés dans la production de cellules CAR-T. Face à ce constat, le CHU de Lille, en collaboration avec celui de Rouen, s'est engagé à développer des cellules CAR-T anti-CD19 de deuxième génération dans le cadre d'une production académique. Cette initiative vise à offrir une option thérapeutique innovante pour cette hémopathie, en dehors des circuits industriels traditionnels.

Une autorisation de production doit être obtenue auprès de l'ANSM, l'agence nationale compétente, pour initier un essai clinique impliquant l'utilisation de cellules CAR-T dans le traitement de la LAM CD19+ R/R. Par conséquent, il est nécessaire de démontrer *in vitro* la cytotoxicité des cellules CAR-T produites, afin de prouver leur efficacité thérapeutique potentielle. Parallèlement, un test fonctionnel doit être mis en place en routine pour vérifier la fonctionnalité des cellules, en respectant des critères de simplicité et de reproductibilité.

A) Cytotoxicité des cellules CAR-T in vitro sur une lignée cellulaire blastique myéloïde exprimant le CD19

Des expériences préliminaires ont été réalisées visant à mettre au point la cytotoxicité *in vitro* des cellules CAR-T. Des lymphocytes B hétérologues ont été incubés en présence de cellules CAR-T pendant 24 heures. Bien qu'aucun effet cytotoxique n'ait été observé, une diminution de la proportion de cellules CD19+ a été soulignée, indiquant un changement phénotypique des cellules B devenant CD19-. Différentes conditions et différents ratios de cocultures, incluant notamment une coculture des cellules CAR-T avec des lymphocytes B autologues pour investiguer une potentielle réaction allogénique, ont été testés. Mais, ils ont abouti aux mêmes résultats que précédemment. Ensuite, une lignée cellulaire CD19+ RAJI a été testée comme cible potentielle des cellules CAR-T anti-CD19 produites. Une mort cellulaire progressive des RAJI a pu être mise en évidence après 24 heures d'incubation, accompagnée d'une diminution de l'expression du CD19 chez les cellules RAJI survivantes. En tenant compte de ces résultats, l'objectif était ensuite de tester l'effet des CAR-T sur des cellules blastiques myéloïdes CD19- et CD19+ issus de patients leucémiques. Malheureusement, ces blastes n'ont pas survécu à la décongélation, rendant impossible l'étude de cytotoxicité des cellules CAR-T sur ces échantillons. Nous avons donc cherché une lignée cellulaire se rapprochant le plus possible de la LAM CD19+.

Après avoir finalisé la mise au point technique, nous avons ainsi mené deux expériences pour étudier la cytotoxicité des cellules CAR-T sur des lignées cellulaires modélisant une LAM CD19+ et une LAM CD19-, parallèlement à une étude sur les cellules RAJI à différents temps d'incubation (H0, H5, et H24 pour la première expérience, puis jusqu'à H30 pour la seconde). Le CHU de Rouen nous a fourni la lignée cellulaire MOLM-13, mimant des blastes myéloïdes, avec une version non modifiée et une autre transduite pour exprimer le CD19. Dès la première expérience avec les lignées MOLM-13 CD19+ et RAJI, nous avons observé une lyse progressive

des cellules par les cellules CAR-T, tandis que, comme prévu, les cellules MOLM-13 CD19⁻ sont restées viables après 24 heures d'incubation en présence des CAR-T. Nous avons également remarqué une mortalité élevée des cellules CAR-T, à H0 après décongélation. En effet, plus de 70% des cellules CAR-T VALTECH 1 ou CAR-T VALTECH 2 étaient non viables après décongélation (Figure 93). Nous avons ainsi voulu optimiser le ratio E:C dans les cocultures en prenant en compte dans son calcul le pourcentage de mortalité des cellules CAR-T pour la deuxième expérience.

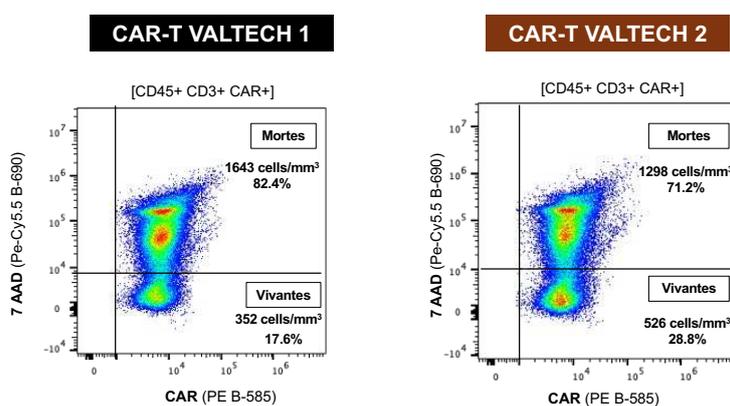


Figure 93 - Exemples de viabilité des cellules CAR-T (Réalisées à partir de FlowJo® (version 10.10.0))

Malgré cet ajustement, les résultats de cytotoxicité entre la première et la deuxième expérience sont globalement similaires, notamment à H24, où le pourcentage de mort cellulaire observé dans différentes conditions reste statistiquement comparable. Néanmoins, à H30, lors de la deuxième expérience, la cytotoxicité des cellules CAR-T sur les RAJI ou les MOLM-13 CD19⁺ augmentait encore par rapport à H24 pour s'approcher presque des 100%. Toutefois, à H5, nous notons un pourcentage moyen de mortalité cellulaire (cellules 7-AAD⁺) significativement plus élevé ($p\text{-value} < 0.05$), aussi bien pour les RAJI que pour les MOLM-13 CD19⁺ en présence de cellules CAR-T. Cela suggère une phase d'attaque légèrement plus agressive, probablement due au ratio E:C optimisé. Un temps d'étude supplémentaire entre H0 et H5 mais également entre H5 et H24 avec ce ratio optimisé pourraient permettre de définir une meilleure cinétique de la cytotoxicité des cellules CAR-T. Un autre fait intéressant à noter est que, dès H0, certaines lignées présentaient déjà une mortalité supérieure à 10%, même en absence des cellules CAR-T. Cela indique la présence d'une mortalité naturelle ou intrinsèque. Pour mieux différencier la mortalité constitutionnelle de celle induite par les cellules CAR-T, ce serait essentielle d'utiliser un deuxième marqueur de viabilité autre que le 7-AAD tel que du LIVE/DEAD ou de l'annexine V. Ceci offrirait une analyse plus fine de la cytotoxicité des cellules CAR-T, tout en réduisant les ambiguïtés liées à la mort cellulaire naturelle. De plus, la démonstration de cytotoxicité

des cellules CAR-T peut être réalisée à l'aide de diverses techniques, l'imagerie par bioluminescence avec l'emploi de luciférase, la libération d'un radio-isotope le Chrome 51 (^{51}Cr) ou la mesure d'impédance (354). Malheureusement, un problème de conservation des cellules CAR-T produites au CHU de Lille lié à un protocole de congélation inadéquat, a rendu les lots de cellules CAR-T inutilisables pour ces tests envisagés. Le protocole de congélation a depuis été modifié, en remplaçant le Cryostor® utilisé précédemment pour les cellules CAR-T VALTECH 1 et VALTECH 2 par un autre milieu de congélation (PAN-Biotech™, Aidenbach, Allemagne). Il serait nécessaire de reproduire ces études de cytotoxicité avec les nouveaux lots de cellules CAR-T produits et cryoconservés afin de comparer les résultats aux précédents. De plus, il serait enrichissant d'entreprendre des analyses transcriptomiques à chaque point de prélèvement des cocultures de MOLM-13 CD19⁺ avec les cellules CAR-T, afin de mieux comprendre les voies de signalisation, ainsi que les mécanismes d'apoptose et de lyse cellulaire impliqués. En outre, il serait aussi pertinent d'étendre ces tests de cytotoxicité aux blastes myéloïdes frais ou cryoconservés provenant de patients. Deux pistes sont envisageables :

- Collaborer avec le laboratoire d'hématologie spécialisé en CMF pour être prévenu dès qu'une LAM exprimant le CD19 de façon aberrante est diagnostiquée. Cela permettrait de récupérer rapidement des échantillons de sang et de réaliser des tests fonctionnels de cytotoxicité.
- Élaborer un protocole commun de cryoconservation des blastes myéloïdes avec ce laboratoire pour garantir la viabilité des cellules en vue de tests fonctionnels ultérieurs.

Cependant, il reste difficile d'obtenir des blastes myéloïdes frais, car un traitement cytoréducteur est généralement initié rapidement après le diagnostic d'une LAM, ce qui complique la récupération d'échantillons à temps pour ces études.

En revanche, l'équipe de Ma et al.(116) a pu employer des cellules fraîches blastiques myéloïdes initialement CD19⁺; provenant d'une patiente atteinte, et les a mises en cocultures pendant 24 heures avec des cellules CAR-T. Aucun effet cytotoxique induit par les cellules CAR-T n'a été mis en évidence sur ces blastes myéloïdes CD19⁺ frais. Mais, la disparition de l'antigène CD19 à la surface de ces cellules blastiques a pu être constatée (Figure 94).

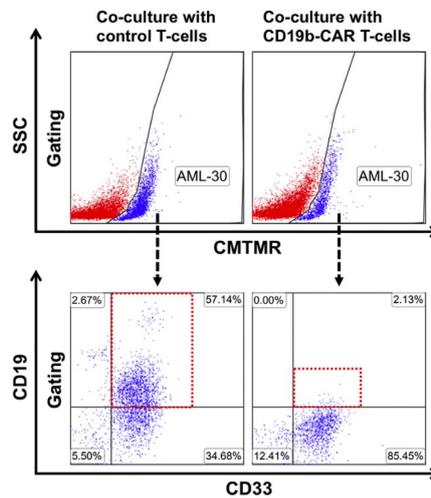


Figure 94 – Diminution du nombre de cellules CD19+ après 24 heures d’incubation de blastes frais myéloïdes CD19+ en contact avec des cellules CAR-T anti-CD19 (Extrait de Ma et al., *Leukemia Res Rep*, 2018(116))

B) Diminution du nombre de cellules CD19+ en présence de cellules CAR-T

Lors de la première expérience, de manière similaire aux cellules RAJI, les cellules MOLM-13 CD19⁺ ont subi un changement phénotypique tout au long de la coculture avec les cellules CAR-T, perdant également le marqueur CD19 à leur surface. De plus, certaines cellules MOLM-13 CD19⁺ ont également présenté une négativation de leur expression membranaire de CD33. Ce phénomène pourrait suggérer une lyse cellulaire progressive, au cours de laquelle la destruction de la membrane entraînerait le détachement des marqueurs de surface, tels que CD19 et CD33. Cependant, dans le cas des cellules RAJI, l’expression du CD20 à la surface membranaire n’avait pas suivi cette tendance de réduction d’expression probablement en raison d’une membrane plus fragile des blastes myéloïdes qui favoriserait plus aisément la survenue de la lyse cellulaire.

Comme la première expérience, la deuxième expérience a confirmé à nouveau une diminution du nombre de cellules CD19+ parmi les RAJI ou les MOLM-13CD19⁺ au cours du temps indépendamment de la cytotoxicité. Néanmoins, en comparaison avec la première expérience, le pourcentage de cellules CD19+ dans ces lignées est légèrement plus élevé lors de la deuxième expérience à H5 et H24 malgré une cytotoxicité tout aussi, voire plus importante. Par ailleurs, pour le H5 des MOLM-13 CD19⁺ en présence de cellules CAR-T, cette différence de pourcentage entre la première et la deuxième expérience est significative ($p\text{-value} < 0.05$). Cette perte de CD19 à la surface de cellules blastiques ou de RAJI pourrait refléter un mécanisme d’échappement tumoral des cellules cancéreuses *in vivo* puisque ces cellules ne pourront plus être reconnues ni ciblées par les cellules CAR-T (355). Nous pouvons

alors supposer que ce phénomène est moins prononcé lorsque le ratio E:C est optimisé. Ainsi, cela suggère qu'une dose adéquate de cellules CAR-T injectée permettrait d'éviter l'entrée dans ce processus d'échappement tumoral (356).

En effet, comme remarqué au CHU de Lille, certains patients peuvent rechuter de leur injection de cellules CAR-T. La perte ou la modulation du CD19 peut constituer un facteur potentiel de rechute (355). L'apparition de variations génétiques *de novo* au niveau du gène *CD19* ou la disparition de l'épitope ciblé par épissage alternatif (357) peuvent être des causes de perte d'expression du CD19 et donc de résistance à cette thérapie. Hamieh et al., ont d'ailleurs montré que la trogocytose, un processus intercellulaire actif par lequel l'antigène cible, CD19, est transféré à la cellule CAR-T peut induire une diminution de la densité de cette cible à la surface des cellules blastiques (356). Ainsi, cela favorise une certaine résistance et une mort cellulaire moins efficace par les cellules CAR-T. D'autres mécanismes de résistance ont été décrits comprenant la résistance par masquage de l'épitope CD19 (358) et la régulation altérée de la signalisation des récepteurs de mort par les cellules blastiques (359).

De plus, l'équipe de Im et al.(360), a également soulevé ce problème de perte du CD19 à la surface cellulaire et a cherché les mécanismes sous-jacents via des cocultures de cellules CAR-T avec d'autres lignées cellulaires CD19+ (NALM-6, REH et KOPN-8). Ils décrivent que l'interaction avec les cellules CAR-T provoque un regroupement du marqueur CD19 à l'interface entre le blaste et la cellule CAR-T entraînant par la suite, l'internalisation du CD19 par la cellule cible blastique. Cela expliquerait la diminution du CD19 membranaire parmi les cellules en interaction avec les CAR-T. Cette hypothèse nous a amené à réaliser lors de cette deuxième expérience, une perméabilisation cellulaire des MOLM-13 CD19⁺ en contact ou non avec les cellules CAR-T permettant d'observer l'évolution immunophénotypique du CD19 en extra et en intracellulaire. En effet, au cours de cette perméabilisation cellulaire, une augmentation du pourcentage de cellules CD19^{intra+} est observée au bout de 24 heures d'incubation avec des cellules CAR-T entraînant une diminution de l'expression du CD19 en surface. Ainsi, cela appuie l'hypothèse d'Im et al., d'internalisation du CD19 après interaction avec les cellules CAR-T(360). De plus comme cette équipe, nous avons pu observer que les cellules MOM-13 CD19⁺ détruites par les cellules CAR-T avaient un pourcentage de CD19 réduit après 5 et 24 heures de coculture, ce qui implique que l'internalisation du CD19 est déclenchée par des interactions CD19-CAR indépendantes des résultats de cytotoxicité ou d'apoptose (360). Im et al., par une étude transcriptomique, ont pu également constater que les cellules avec une

expression faible du CD19 étaient engagées dans des processus physiologiques d'activation et de régulation des cellules B rappelant ceux présents dans le centre germinal des cellules B normales, ce qui induirait une régulation à la baisse du CD19 au niveau transcriptionnel (360).

Physiologiquement après internalisation du CD19 (sûrement par probable endocytose), le principal moyen de dégradation de l'antigène phagocyté est réalisé par le lysosome (361). Un prétraitement des cellules par un inhibiteur lysosomal pourrait être intéressant pour observer le maintien ou non de l'expression du CD19. Par ailleurs, après un tri sur les cellules CD45⁺ CD3⁻ en coculture avec les cellules CAR-T aux différents temps de prélèvement, nous pourrions également faire une PCR quantitative pour observer si une diminution quantitative de la synthèse du gène *CD19* est apparue. De plus, l'étude des profils d'expression des gènes par *bulk* ou *single-cell RNA sequencing* permettraient de mieux comprendre les voies de signalisation impliquées dans ce phénomène de diminution du CD19 en surface après interaction avec des cellules CAR-T. Cela nous permettrait une étude multi-omique à différentes échelles et également de mieux prévenir certaines rechutes post-traitement induites par ce possible processus d'échappement tumoral.

C) Un test de fonctionnalité des cellules CAR-T en routine

L'ELISpot est déjà utilisé en routine à l'Institut d'Immunologie du CHU de Lille, notamment dans le cadre du dépistage de la tuberculose latente. La mise en place du test ELISpot pour évaluer la fonctionnalité des cellules CAR-T représente ainsi une initiative potentielle et envisageable. En effet, ce test permet de quantifier la sécrétion de cytokines spécifiques, telles que l'IFN- γ , par les cellules CAR-T en réponse à leurs cibles, ce qui est un bon indicateur de leur activité cytotoxique. Cela garantira que chaque lot produit au CHU de Lille est fonctionnel avant son utilisation clinique, notamment pour vérifier la reconnaissance et la destruction des cellules tumorales. Lors de la mise au point technique de ce test, la sensibilité et la spécificité de l'ELISpot ont été étudiées et ont ainsi permis la validation de ce test. Cependant, pour qu'il soit reproductible et simple à réaliser en routine, des culots secs de cellules CD19⁺ mais aussi des cellules CD19⁺ cryopréservées ont été testées comme cibles. Nous remarquons que ce test était valide avec les cellules cryoconservées alors qu'il ne l'était pas avec les culots secs. Les puits étaient saturés pour la plupart sauf si le nombre de cellules CD19⁺ cryopréservées était faible. Certes, il est difficile de quantifier le nombre de spots, mais le test démontre bien la présence de spots et que les cellules CAR-T VALTECH 1 et 2 produits sont bien fonctionnelles avec un relargage

d'IFN- γ . Après avoir testé ces cellules CAR-T sur des lignées cellulaires blastiques, les résultats attendus ont pu être confirmés : une absence de spots avec les MOLM-13 CD19⁻ et une sécrétion d'IFN- γ en présence des MOLM-13 CD19⁺. Une légère saturation a été observée lors du deuxième test ELISpot avec les puits contenant des cellules RAJI fraîches et des MOLM-13 CD19⁺, mais la réaction est restée positive. Toutefois, quelques problèmes techniques ont affecté la lecture des deux ELISpot pour certains puits, bien que leur positivité ou leur négativité ait pu être déduite de manière claire. Il est possible que les défauts techniques soient survenus lors de l'étape de lavage, qui est souvent critique dans les tests ELISpot. Un lavage inadéquat peut entraîner des bruits de fond ou des lectures floues. Il serait alors intéressant de réaliser un troisième test ELISpot, sans ces légers inconvénients, dès qu'un nouveau lot de cellules CAR-T sera disponible.

De plus, nous pourrions également doser la sécrétion d'autres cytokines que l'IFN- γ telles que le TNF α (produite aussi par les lymphocytes T CD4⁺ effecteurs, de type Th1), et le granzyme B, protéase sécrétée par les lymphocytes T CD8⁺ notamment impliqués dans la réponse anti-tumorale et cytotoxique. La quantification de ces cytokines permettrait de démontrer la polyfonctionnalité des cellules CAR-T, un élément clé dans leur efficacité thérapeutique (362,363). Il serait alors pertinent de pouvoir détecter ces trois cytokines sur un même test. L'équipe d'Iraguha et al., a publié un premier abstract en 2023 dont le but est de développer un test ELISpot multicolore capable d'identifier simultanément l'IFN- γ , le TNF α et le granzyme B pour une évaluation fonctionnelle des cellules CAR-T (364). En 2024, un test de fluorescence de spots multicolores (FluoroSpot Plus, Mabtech®, Suède) a été développé, optimisé et validé permettant de mesurer de façon simultanée ces trois cytokines en présence de cellules CAR-T anti-CD19 (Figure 95)(365). Cependant, nous ne possédons pas les réactifs et les kits spécifiques ainsi que l'automate (AID vSpot Spectrum, Autoimmun diagnostika GMBH®, Allemagne) et le logiciel permettant l'acquisition des données en multicolours.

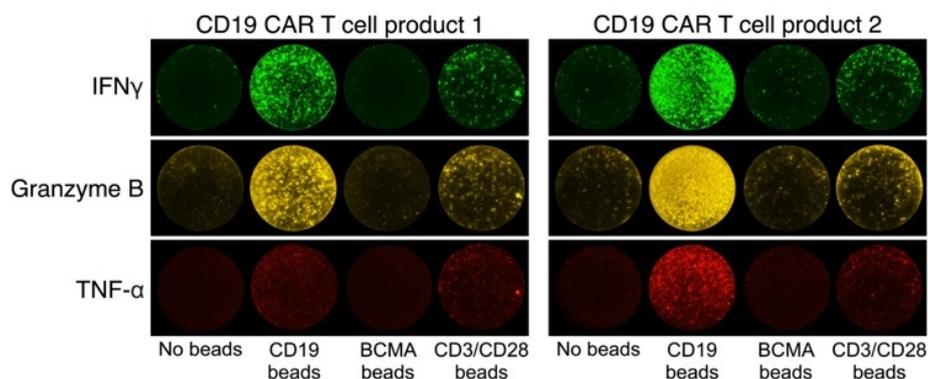


Figure 95 - Une analyse de fluorescence avec des spots multicolores détectant simultanément l'IFN- γ , le TNF α et le granzyme B pour l'utilisation potentielle de test fonctionnel des cellules CAR-T produites (Extrait de Atanackovic D et al., *Cytotherapy*, 2024(365))

D) Une production académique en cours au CHU de Lille

La mise en place d'une production académique permet, au sein d'un même centre hospitalier, la production de cellules CAR-T, leur délivrance et le traitement de patients pour lesquels cette thérapie cellulaire n'est pas disponible ni couverte par les industriels la commercialisant. Dans ce projet de thèse, les cellules CAR-T anti-CD19 produites au CHU de Lille ont été préparées sur un automate de production semi-automatisé et clos, le CliniMACS Prodigy de Miltenyi Biotec™. Ce procédé de fabrication de cellules CAR-T évite les risques de contamination et d'erreurs techniques humaines. Aujourd'hui, certains pays, comme l'Espagne (343) et Israël (366–370), ont déjà obtenu l'autorisation pour la production académique de cellules CAR-T dans les hémopathies affectant la lignée des cellules lymphocytaires B (LAL-B, lymphomes non-hodgkiniens, leucémie lymphoïde chronique). Les résultats de ces productions sont prometteurs, démontrant une efficacité et une sécurité comparables à celles des produits commerciaux disponibles sur le marché (NCT03144583 pour l'essai clinique espagnol avec le produit cellulaire CAR-T nommé ARI-0001 (344); NCT02772198 pour les essais cliniques israéliens (366–370)), tout en permettant une délivrance du produit en un temps considérablement réduit, en moyenne de 10 jours (343,366–368). Des améliorations notables sont à mettre en évidence telles qu'une meilleure persistance *in vivo* du produit cellulaire (343), la minimisation d'utilisation d'une thérapie de *bridging* (368,370) mais aussi l'abrogation du besoin de procédé de congélation du produit cellulaire (370). Ceci souligne l'intérêt croissant pour les approches académiques dans le développement des thérapies cellulaires.

Aujourd'hui, deux essais cliniques (chinois (NCT03896854) et israélien (NCT04257175)) sont en cours pour l'administration de cellules CAR-T dans la LAM CD19+ avec la translocation t(8 ;21) et en R/R . Cet essai clinique israélien utilise les cellules CAR-T issues de la production académique décrite par Jacoby et al (366) et

approuvée par les autorités israéliennes. De plus, un cas de rémission rapporté par Danylesko (117) renforce notre démarche pour la demande d'autorisation d'essai clinique concernant la production académique du CHU de Lille.

Enfin, une fois que la mise en place de l'essai clinique sera entreprise au CHU de Lille pour cette production académique, il serait intéressant d'effectuer du *bulk RNA sequencing* sur la moelle osseuse des patients LAM présentant une expression aberrante de CD19. Cela permettrait d'évaluer et de caractériser le microenvironnement immunitaire tumoral ainsi que d'explorer si ces patients présentent une exhaustion ou une sénescence accrue des cellules T et NK, ce qui pourrait induire une résistance aux cellules CAR-T anti-CD19. Plus l'état des cellules NK et T est inerte, plus les patients pourraient avoir une réponse favorable aux cellules CAR-T anti-CD19 (106). Par ailleurs, ce serait également intéressant de voir les changements transcriptomiques de ce microenvironnement immunitaire tumoral après l'administration de cellules CAR-T.

VII. CONCLUSION

Le CHU de Lille, l'un des principaux centres hospitaliers français spécialisés dans les maladies du sang, figure parmi les rares établissements en France capables de traiter les patients atteints d'hémopathies grâce aux cellules CAR-T. Face à la LAM CD19+, une hémopathie maligne rare et au pronostic défavorable qui n'est pas couverte par les industriels, le CHU de Lille a entrepris la production académique de cellules CAR-T anti-CD19. Cette initiative nécessite toutefois une autorisation de l'ANSM pour lancer un essai clinique, afin de rendre cette thérapie plus accessible aux patients atteints de LAM CD19+. Grâce à cette production académique, ils pourraient recevoir leur traitement dans des délais plus courts, ce qui est crucial pour une maladie aussi agressive et récidivante. Une étude de cytotoxicité sur une lignée cellulaire blastique mimant la LAM CD19+ a démontré l'efficacité de ces cellules CAR-T issues de la production académique dans cette indication. Un phénomène de modification immunophénotypique a cependant été également observé, suggérant un mécanisme d'échappement tumoral potentiellement responsable de résistances aux cellules CAR-T et de rechutes *in vivo* chez les patients. Il a été hypothétisé que ce phénomène pourrait résulter d'une internalisation du marqueur CD19 par les cellules cibles, car une augmentation du pourcentage de cellules exprimant le CD19 en intracellulaire a été constatée en présence de cellules CAR-T. Une étude multi-omique serait pertinente afin de mieux comprendre ces mécanismes, dans le but d'éviter d'éventuelles rechutes. Il serait également intéressant d'explorer comment ces

mécanismes pourraient influencer la réponse des patients à la thérapie CAR-T. Il faudrait essayer d'effectuer cette étude sur des blastes frais myéloïdes de patients atteints de LAM CD19+ ou CD19- afin de déterminer si les mêmes résultats sont obtenus.

Enfin, un test ELISpot a confirmé la fonctionnalité de ces cellules CAR-T anti-CD19 ainsi produites en montrant une sécrétion d'IFN- γ après leur interaction avec des cellules cibles exprimant le CD19. Cette méthode pourrait être intégrée en routine à l'Institut d'Immunologie du CHU de Lille, afin de valider la fonctionnalité de chaque lot de cellules CAR-T produit.

L'immunothérapie par les cellules CAR-T ouvre la voie à de nombreuses perspectives dans la recherche médicale et thérapeutique, promettant des avancées significatives dans le traitement de maladies au-delà des hémopathies, comme les maladies auto-immunes (par exemple, le lupus) et certains types de cancers (notamment le cancer du sein), qui peuvent être réfractaires aux traitements conventionnels. Actuellement, la recherche sur les cellules CAR-T se concentre également sur l'amélioration de la conception du CAR, le choix de la cellule transduite (avec des développements en cours pour les CAR-NK et CAR-macrophages), ainsi que sur une meilleure compréhension des effets indésirables et des voies de signalisation activées après traitement.

VIII. BIBLIOGRAPHIE

1. Travlos GS. Normal Structure, Function, and Histology of the Bone Marrow. *Toxicol Pathol.* 1 août 2006;34(5):548-65.
2. Kelly LM, Gilliland DG. Genetics of myeloid leukemias. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2002;3:179-98.
3. Bruce WR, Van Der Gaag H. A Quantitative Assay for the Number of Murine Lymphoma Cells capable of Proliferation in vivo. *Nature.* juill 1963;199(4888):79-80.
4. Wodinsky I, Swinarski J, Kensler CJ. Spleen colony studies of leukemia L1210. 3. Differential sensitivities of normal hematopoietic and resistant L1210 colony-forming cells to 6-mercaptopurine (NSC-755). *Cancer Chemother Rep.* févr 1968;52(2):251-5.
5. Park CH, Bergsagel DE, McCulloch EA. Mouse Myeloma Tumor Stem Cells: A Primary Cell Culture Assay2. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute.* 1 févr 1971;46(2):411-22.
6. Bonnet D, Dick JE. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med.* juill 1997;3(7):730-7.
7. Hope KJ, Jin L, Dick JE. Acute myeloid leukemia originates from a hierarchy of leukemic stem cell classes that differ in self-renewal capacity. *Nat Immunol.* juill 2004;5(7):738-43.
8. Passegué E, Jamieson CHM, Ailles LE, Weissman IL. Normal and leukemic hematopoiesis: Are leukemias a stem cell disorder or a reacquisition of stem cell characteristics? *Proc Natl Acad Sci U S A.* 30 sept 2003;100(Suppl 1):11842-9.
9. Dick JE. Stem cell concepts renew cancer research. *Blood.* 15 déc 2008;112(13):4793-807.
10. Wang JCY, Dick JE. Cancer stem cells: lessons from leukemia. *Trends in Cell Biology.* 1 sept 2005;15(9):494-501.
11. Genovese G, Kähler AK, Handsaker RE, Lindberg J, Rose SA, Bakhoum SF, et al. Clonal Hematopoiesis and Blood-Cancer Risk Inferred from Blood DNA Sequence. *N Engl J Med.* 25 déc 2014;371(26):2477-87.
12. Gibson CJ, Lindsley RC, Tchekmedyan V, Mar BG, Shi J, Jaiswal S, et al. Clonal Hematopoiesis Associated With Adverse Outcomes After Autologous Stem-Cell Transplantation for Lymphoma. *JCO.* 10 mai 2017;35(14):1598-605.
13. Gilliland DG. Molecular genetics of human leukemias: New insights into therapy. *Seminars in Hematology.* 1 oct 2002;39(4, Supplement):6-11.
14. Naoe T, Kiyoi H. Gene mutations of acute myeloid leukemia in the genome era. *Int J Hematol.* 1 févr 2013;97(2):165-74.
15. Papaemmanuil E, Gerstung M, Bullinger L, Gaidzik VI, Paschka P, Roberts ND, et al. Genomic Classification and Prognosis in Acute Myeloid Leukemia. *N Engl J Med.* 9 juin 2016;374(23):2209-21.
16. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton D a. G, Gralnick HR, et al. Proposals for the Classification of the Acute Leukaemias French-American-British (FAB) Co-operative Group. *British Journal of Haematology.* 1976;33(4):451-8.
17. BENNETT JM, CATOVSKY D, DANIEL MT, FLANDRIN G, GALTON DAG, GRALNICK HR, et al. Proposed Revised Criteria for the Classification of Acute Myeloid Leukemia. *Ann Intern Med.* oct 1985;103(4):620-5.
18. Cancer Genome Atlas Research Network, Ley TJ, Miller C, Ding L, Raphael BJ, Mungall AJ, et al. Genomic and epigenomic landscapes of adult de novo acute myeloid leukemia. *N Engl J Med.* 30 mai 2013;368(22):2059-74.
19. Khoury JD, Solary E, Abla O, Akkari Y, Alaggio R, Apperley JF, et al. The 5th edition of the World Health Organization Classification of Haematolymphoid Tumours: Myeloid and Histiocytic/Dendritic Neoplasms. *Leukemia.* 2022;36(7):1703-19.
20. Arber DA, Hasserjian RP, Orazi A, Mathews V, Roberts AW, Schiffer CA, et al. Classification of myeloid neoplasms/acute leukemia: Global perspectives and the international consensus classification approach. *Am J Hematol.* mai 2022;97(5):514-8.
21. Arber DA, Orazi A, Hasserjian RP, Borowitz MJ, Calvo KR, Kvasnicka HM, et al. International Consensus Classification of Myeloid Neoplasms and Acute Leukemias: integrating morphologic, clinical, and genomic data. *Blood.* 15 sept 2022;140(11):1200-28.
22. Döhner H, Estey E, Grimwade D, Amadori S, Appelbaum FR, Büchner T, et al. Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. *Blood.* 26 janv 2017;129(4):424-47.

23. Döhner H, Wei AH, Appelbaum FR, Craddock C, DiNardo CD, Dombret H, et al. Diagnosis and management of AML in adults: 2022 recommendations from an international expert panel on behalf of the ELN. *Blood*. 22 sept 2022;140(12):1345-77.
24. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ, Le Beau MM, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*. 19 mai 2016;127(20):2391-405.
25. Forghieri F, Nasillo V, Paolini A, Bettelli F, Pioli V, Giusti D, et al. NPM1-Mutated Myeloid Neoplasms with <20% Blasts: A Really Distinct Clinico-Pathologic Entity? *Int J Mol Sci*. 26 nov 2020;21(23):8975.
26. Foucar K, Anastasi J. Acute Myeloid Leukemia With Recurrent Cytogenetic Abnormalities. *Am J Clin Pathol*. juill 2015;144(1):6-18.
27. Kayser S, Hills RK, Langova R, Kramer M, Guijarro F, Sustkova Z, et al. Characteristics and outcome of patients with acute myeloid leukaemia and t(8;16)(p11;p13): results from an International Collaborative Study*. *Br J Haematol*. mars 2021;192(5):832-42.
28. Rücker FG, Schlenk RF, Bullinger L, Kayser S, Teleanu V, Kett H, et al. TP53 alterations in acute myeloid leukemia with complex karyotype correlate with specific copy number alterations, monosomal karyotype, and dismal outcome. *Blood*. 1 mars 2012;119(9):2114-21.
29. Grob T, Al Hinai ASA, Sanders MA, Kavelaars FG, Rijken M, Gradowska PL, et al. Molecular characterization of mutant TP53 acute myeloid leukemia and high-risk myelodysplastic syndrome. *Blood*. 14 avr 2022;139(15):2347-54.
30. Weinberg OK, Siddon A, Madanat YF, Gagan J, Arber DA, Dal Cin P, et al. TP53 mutation defines a unique subgroup within complex karyotype de novo and therapy-related MDS/AML. *Blood Advances*. 10 mai 2022;6(9):2847-53.
31. Patel AA, Rojek AE, Drazer MW, Weiner H, Godley LA, Le Beau MM, et al. Therapy-related myeloid neoplasms in 109 patients after radiation monotherapy. *Blood Advances*. 21 oct 2021;5(20):4140-8.
32. Wong TN, Ramsingh G, Young AL, Miller CA, Touma W, Welch JS, et al. Role of TP53 mutations in the origin and evolution of therapy-related acute myeloid leukaemia. *Nature*. 26 févr 2015;518(7540):552-5.
33. Ok CY, Patel KP, Garcia-Manero G, Routbort MJ, Fu B, Tang G, et al. Mutational profiling of therapy-related myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia by next generation sequencing, a comparison with de novo diseases. *Leukemia Research*. mars 2015;39(3):348-54.
34. Voso MT, Falconi G, Fabiani E. What's new in the pathogenesis and treatment of therapy-related myeloid neoplasms. *Blood*. 2 sept 2021;138(9):749-57.
35. McNERNEY ME, Godley LA, Le Beau MM. Therapy-related myeloid neoplasms: when genetics and environment collide. *Nat Rev Cancer*. sept 2017;17(9):513-27.
36. Dong Y, Shi O, Zeng Q, Lu X, Wang W, Li Y, et al. Leukemia incidence trends at the global, regional, and national level between 1990 and 2017. *Exp Hematol Oncol*. 19 juin 2020;9:14.
37. Jani CT, Ahmed A, Singh H, Mouchati C, Al Omari O, Bhatt PS, et al. Burden of AML, 1990-2019: Estimates From the Global Burden of Disease Study. *JCO Glob Oncol*. sept 2023;(9):e2300229.
38. Deschler B, Lübbert M. Acute myeloid leukemia: Epidemiology and etiology. *Cancer*. 2006;107(9):2099-107.
39. SPF. Estimations nationales de l'incidence et de la mortalité par cancer en France métropolitaine entre 1990 et 2018 - Hémopathies malignes : Étude à partir des registres des cancers du réseau Francim [Internet]. [cité 21 juill 2024]. Disponible sur: <https://www.santepubliquefrance.fr/import/estimations-nationales-de-l-incidence-et-de-la-mortalite-par-cancer-en-france-metropolitaine-entre-1990-et-2018-hemopathies-malignes-etude-a-pa>
40. SEER [Internet]. [cité 1 avr 2024]. Acute Myeloid Leukemia - Cancer Stat Facts. Disponible sur: <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/amyl.html>
41. Cancer Research UK [Internet]. 2015 [cité 21 juill 2024]. Acute myeloid leukaemia (AML) statistics. Disponible sur: <https://www.cancerresearchuk.org/health-professional/cancer-statistics/statistics-by-cancer-type/leukaemia-aml>

42. SPF. Survie des personnes atteintes de cancer en France métropolitaine 1989-2018 - Leucémies aigües myéloïdes [Internet]. [cité 21 juill 2024]. Disponible sur: <https://www.santepubliquefrance.fr/import/survie-des-personnes-atteintes-de-cancer-en-france-metropolitaine-1989-2018-leucemies-aiguees-myeloides>
43. West AH, Godley LA, Churpek JE. Familial myelodysplastic syndrome/acute leukemia syndromes: a review and utility for translational investigations. *Ann N Y Acad Sci.* mars 2014;1310(1):111-8.
44. Xiao H, Shi J, Luo Y, Tan Y, He J, Xie W, et al. First report of multiple CEBPA mutations contributing to donor origin of leukemia relapse after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood.* 12 mai 2011;117(19):5257-60.
45. Kobayashi S, Kobayashi A, Osawa Y, Nagao S, Takano K, Okada Y, et al. Donor cell leukemia arising from preleukemic clones with a novel germline DDX41 mutation after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Leukemia.* avr 2017;31(4):1020-2.
46. Owen CJ, Toze CL, Koochin A, Forrest DL, Smith CA, Stevens JM, et al. Five new pedigrees with inherited RUNX1 mutations causing familial platelet disorder with propensity to myeloid malignancy. *Blood.* 1 déc 2008;112(12):4639-45.
47. Galera P, Hsu AP, Wang W, Droll S, Chen R, Schwartz JR, et al. Donor-derived MDS/AML in families with germline GATA2 mutation. *Blood.* 1 nov 2018;132(18):1994-8.
48. Trottier AM, Godley LA. Inherited predisposition to haematopoietic malignancies: overcoming barriers and exploring opportunities. *British Journal of Haematology.* 2021;194(4):663-76.
49. Weinberg OK, Kuo F, Calvo KR. Germline Predisposition to Hematolymphoid Neoplasia. *Am J Clin Pathol.* août 2019;152(3):258-76.
50. Lange RD, Moloney WC, Yamawaki T. Leukemia in Atomic Bomb Survivors: I. General Observations. *Blood.* 1 juin 1954;9(6):574-85.
51. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Benzene [Internet]. Lyon (FR): International Agency for Research on Cancer; 2018 [cité 30 juill 2024]. (IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans). Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK550157/>
52. Irons RD, Chen Y, Wang X, Ryder J, Kerzic PJ. Acute myeloid leukemia following exposure to benzene more closely resembles de novo than therapy related-disease. *Genes, Chromosomes and Cancer.* 2013;52(10):887-94.
53. Snyder R. Leukemia and Benzene. *Int J Environ Res Public Health.* août 2012;9(8):2875-93.
54. Lu PCW, Shahbaz S, Winn LM. Benzene and its effects on cell signaling pathways related to hematopoiesis and leukemia. *Journal of Applied Toxicology.* 2020;40(8):1018-32.
55. Young LS, Rickinson AB. Epstein–Barr virus: 40 years on. *Nat Rev Cancer.* oct 2004;4(10):757-68.
56. Khan G, Hashim MJ. Global burden of deaths from Epstein-Barr virus attributable malignancies 1990-2010. *Infect Agent Cancer.* 17 nov 2014;9:38.
57. Matsuoka M, Jeang KT. Human T-cell leukaemia virus type 1 (HTLV-1) infectivity and cellular transformation. *Nat Rev Cancer.* avr 2007;7(4):270-80.
58. Nicot C, Harrod RL, Ciminale V, Franchini G. Human T-cell leukemia/lymphoma virus type 1 nonstructural genes and their functions. *Oncogene.* 5 sept 2005;24(39):6026-34.
59. Young LS, Murray PG. Epstein–Barr virus and oncogenesis: from latent genes to tumours. *Oncogene.* 11 août 2003;22(33):5108-21.
60. Wang K, Wei G, Liu D. CD19: a biomarker for B cell development, lymphoma diagnosis and therapy. *Exp Hematol Oncol.* 29 nov 2012;1(1):36.
61. Terstappen LW, Safford M, Könemann S, Loken MR, Zurlutter K, Büchner T, et al. Flow cytometric characterization of acute myeloid leukemia. Part II. Phenotypic heterogeneity at diagnosis. *Leukemia.* janv 1992;6(1):70-80.
62. Macedo A, Orfão A, Vidriales MB, López-Berges MC, Valverde B, González M, et al. Characterization of aberrant phenotypes in acute myeloblastic leukemia. *Ann Hematol.* avr 1995;70(4):189-94.
63. Al-Mawali A, Gillis D, Lewis I. The Role of Multiparameter Flow Cytometry for Detection of Minimal Residual Disease in Acute Myeloid Leukemia. *American Journal of Clinical Pathology.* 1 janv 2009;131(1):16-26.

64. Sarma A, Hazarika M, Das D, Rai AK, Sharma JD, Bhuyan C, et al. Expression of aberrant CD markers in acute leukemia: A study of 100 cases with immunophenotyping by multiparameter flowcytometry. *Cancer Biomarkers*. juill 2015;15(4):501-5.
65. Gökbüget N, Boissel N, Chiaretti S, Dombret H, Doubek M, Fielding A, et al. Diagnosis, prognostic factors, and assessment of ALL in adults: 2024 ELN recommendations from a European expert panel. *Blood*. 9 mai 2024;143(19):1891-902.
66. Bene MC, Castoldi G, Knapp W, Ludwig WD, Matutes E, Orfao A, et al. Proposals for the immunological classification of acute leukemias. European Group for the Immunological Characterization of Leukemias (EGIL). *Leukemia*. oct 1995;9(10):1783-6.
67. Bene MC, Bernier M, Casasnovas RO, Castoldi G, Knapp W, Lanza F, et al. The Reliability and Specificity of c-kit for the Diagnosis of Acute Myeloid Leukemias and Undifferentiated Leukemias. *Blood*. 15 juill 1998;92(2):596-9.
68. Béné MC, Lacombe F. Place de la cytométrie en flux dans le diagnostic et le suivi des leucémies aiguës. *Revue Francophone des Laboratoires*. avr 2015;2015(471):35-41.
69. Zeijlemaker W, Kelder A, Cloos J, Schuurhuis GJ. Immunophenotypic Detection of Measurable Residual (Stem Cell) Disease Using LAIP Approach in Acute Myeloid Leukemia. *CP Cytometry*. déc 2019;91(1):e66.
70. Nguyen-Khac F, Bidet A, Veronese L, Daudignon A, Penther D, Troadec MB, et al. Recommendations for cytogenomic analysis of hematologic malignancies: comments from the Francophone Group of Hematological Cytogenetics (GFCH). *Leukemia*. juin 2020;34(6):1711-3.
71. Nguyen-Khac F, Bidet A, Chapiro E, Lefebvre C, Michaux L, Troadec MB. Cytogenetics in the management of hematological malignancies: Guidelines from the Groupe Francophone de Cytogénétique Hématologique. *Current Research in Translational Medicine*. 1 oct 2023;71(4):103411.
72. McGowan-Jordan J, Hastings RJ, Moore S, éditeurs. *ISCN 2020: An International System for Human Cytogenomic Nomenclature (2020)* [Internet]. S. Karger AG; 2020 [cité 4 août 2024]. Disponible sur: <https://www.karger.com/Book/Home/279152>
73. Rack KA, van den Berg E, Haferlach C, Beverloo HB, Costa D, Espinet B, et al. European recommendations and quality assurance for cytogenomic analysis of haematological neoplasms. *Leukemia*. août 2019;33(8):1851-67.
74. Guide de bonnes pratiques en cytogénétique par l'Association des cytogénéticiens de langue française - Version 4 - 12 mars 2020 [Internet]. [cité 4 août 2024]. Disponible sur: http://www.eaclf.org/docs/GBPcyto/GBPC-ACLF_12032020.pdf
75. Ruminy P, Marchand V, Buchbinder N, Larson T, Joly B, Penther D, et al. Multiplexed targeted sequencing of recurrent fusion genes in acute leukaemia. *Leukemia*. mars 2016;30(3):757-60.
76. Kita K, Nakase K, Miwa H, Masuya M, Nishii K, Morita N, et al. Phenotypical characteristics of acute myelocytic leukemia associated with the t(8;21)(q22;q22) chromosomal abnormality: frequent expression of immature B-cell antigen CD19 together with stem cell antigen CD34. *Blood*. 15 juill 1992;80(2):470-7.
77. Reading C, Estey E, Huh Y, Claxton D, Sanchez G, Terstappen L, et al. Expression of unusual immunophenotype combinations in acute myelogenous leukemia. *Blood*. 1 juin 1993;81(11):3083-90.
78. Andrieu V, Radford-Weiss I, Troussard X, Chane C, Valensi F, Guesnu M, et al. Molecular detection of t(8;21)/AML1-ETO in AML M1/M2: correlation with cytogenetics, morphology and immunophenotype. *Br J Haematol*. mars 1996;92(4):855-65.
79. Meena JP, Makkar H, Gupta AK, Bakhshi S, Gupta R, Thakral D, et al. A comprehensive analysis of cytogenetics, molecular profile, and survival among pediatric acute myeloid leukemia: a prospective study from a tertiary referral center. *Am J Blood Res*. 15 déc 2022;12(6):177-89.
80. Ferrara F, Di Noto R, Annunziata M, Copia C, LO Pardo C, Boccuni P, et al. Immunophenotypic analysis enables the correct prediction of t(8;21) in acute myeloid leukaemia. *British Journal of Haematology*. 1998;102(2):444-8.
81. Walter K, Cockerill PN, Barlow R, Clarke D, Hoogenkamp M, Follows GA, et al. Aberrant expression of CD19 in AML with t(8;21) involves a poised chromatin structure and PAX5. *Oncogene*. 20 mai 2010;29(20):2927-37.

82. Luquet I, Bidet A, Cuccuini W, Lafage-Pochitaloff M, Mozziconacci MJ, Terré C. Cytogenetics in the management of acute myeloid leukemia: an update by the Groupe francophone de cytogénétique hématologique (GFCH). *Annales de biologie clinique*. sept 2016;74(5):535-46.
83. Chen S -W., Li C -F., Chuang S -S., Tzeng C -C., Hsieh Y -C., Lee P -S., et al. Aberrant co-expression of CD19 and CD56 as surrogate markers of acute myeloid leukemias with t(8;21) in Taiwan. *Int J Lab Hematology*. avr 2008;30(2):133-8.
84. Piñero P, Morillas M, Gutierrez N, Barragán E, Such E, Breña J, et al. Identification of Leukemia-Associated Immunophenotypes by Database-guided Flow Cytometry Provides a Highly Sensitive and Reproducible Strategy for the Study of Measurable Residual Disease in Acute Myeloblastic Leukemia. *Cancers (Basel)*. 19 août 2022;14(16):4010.
85. Hurwitz CA, Raimondi SC, Head D, Krance R, Mirro J, Kalwinsky DK, et al. Distinctive immunophenotypic features of t(8;21)(q22;q22) acute myeloblastic leukemia in children. *Blood*. 15 déc 1992;80(12):3182-8.
86. Jun KR, Lee JN, Park JA, Kim HR, Shin JH, Oh SH, et al. Three-way Translocation of *MLL/MLLT3*, t(1;9;11)(p34.2;p22;q23), in a Pediatric Case of Acute Myeloid Leukemia. *Ann Lab Med*. 1 avr 2011;31(2):127-9.
87. Döhner H, Estey EH, Amadori S, Appelbaum FR, Büchner T, Burnett AK, et al. Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood*. 21 janv 2010;115(3):453-74.
88. Tallman MS, Gilliland DG, Rowe JM. Drug therapy for acute myeloid leukemia. *Blood*. 15 août 2005;106(4):1154-63.
89. Appelbaum FR, Gundacker H, Head DR, Slovak ML, Willman CL, Godwin JE, et al. Age and acute myeloid leukemia. *Blood*. 1 mai 2006;107(9):3481-5.
90. Giles FJ, Borthakur G, Ravandi F, Faderl S, Verstovsek S, Thomas D, et al. The haematopoietic cell transplantation comorbidity index score is predictive of early death and survival in patients over 60 years of age receiving induction therapy for acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol*. févr 2007;136(4):624-7.
91. Chilton L, Hills RK, Harrison CJ, Burnett AK, Grimwade D, Moorman AV. Hyperdiploidy with 49–65 chromosomes represents a heterogeneous cytogenetic subgroup of acute myeloid leukemia with differential outcome. *Leukemia*. févr 2014;28(2):321-8.
92. Perea G, Lasa A, Aventín A, Domingo A, Villamor N, Queipo de Llano MP, et al. Prognostic value of minimal residual disease (MRD) in acute myeloid leukemia (AML) with favorable cytogenetics [t(8;21) and inv(16)]. *Leukemia*. janv 2006;20(1):87-94.
93. Shang L, Chen X, Liu Y, Cai X, Shi Y, Shi L, et al. The immunophenotypic characteristics and flow cytometric scoring system of acute myeloid leukemia with t(8;21) (q22;q22); RUNX1-RUNX1T1. *International Journal of Laboratory Hematology*. 2019;41(1):23-31.
94. World Health Organization classification of tumors of haematopoietic and lymphoid tissues, international agency for research on cancer. 2017.
95. Solary E, Casasnovas RO, Campos L, Béné MC, Faure G, Maingon P, et al. Surface markers in adult acute myeloblastic leukemia: correlation of CD19+, CD34+ and CD14+/DR-phenotypes with shorter survival. *Groupe d'Etude Immunologique des Leucémies (GEIL)*. *Leukemia*. mai 1992;6(5):393-9.
96. Jourdan E, Boissel N, Chevret S, Delabesse E, Renneville A, Cornillet P, et al. Prospective evaluation of gene mutations and minimal residual disease in patients with core binding factor acute myeloid leukemia. *Blood*. 21 mars 2013;121(12):2213-23.
97. Gustafson SA, Lin P, Chen SS, Chen L, Abruzzo LV, Luthra R, et al. Therapy-Related Acute Myeloid Leukemia With t(8;21) (q22;q22) Shares Many Features With De Novo Acute Myeloid Leukemia With t(8;21)(q22;q22) but Does Not Have a Favorable Outcome. *American Journal of Clinical Pathology*. 1 mai 2009;131(5):647-55.
98. Pinheiro LHS, Trindade LD, Costa F de O, Silva N de L, Sandes AF, Nunes MAP, et al. Aberrant Phenotypes in Acute Myeloid Leukemia and Its Relationship with Prognosis and Survival: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Int J Hematol Oncol Stem Cell Res*. 1 oct 2020;14(4):274-88.
99. Iriyama N, Hatta Y, Takeuchi J, Ogawa Y, Ohtake S, Sakura T, et al. CD56 expression is an independent prognostic factor for relapse in acute myeloid leukemia with t(8;21). *Leuk Res*. sept 2013;37(9):1021-6.

100. Ball ED, Davis RB, Griffin JD, Mayer RJ, Davey FR, Arthur DC, et al. Prognostic Value of Lymphocyte Surface Markers in Acute Myeloid Leukemia. *Blood*. 15 mai 1991;77(10):2242-50.
101. Wang H feng, Cheng Y zhi, Wang H ping, Chen Z mei, Lou J yu, Jin J. CD19-positive acute myeloblastic leukemia with trisomy 21 as a sole acquired karyotypic abnormality. *J Zhejiang Univ Sci B*. nov 2009;10(11):833-8.
102. Rege K, Swansbury GJ, Atra AA, Horton C, Min T, Dainton MG, et al. Disease Features in Acute Myeloid Leukemia with t(8;21)(q22;q22). Influence of Age, Secondary Karyotype Abnormalities, CD19 Status, and Extramedullar Leukemia on Survival. *Leukemia & Lymphoma*. janv 2000;40(1-2):67-77.
103. Huang L, Abruzzo LV, Valbuena JR, Medeiros LJ, Lin P. Acute myeloid leukemia associated with variant t(8;21) detected by conventional cytogenetic and molecular studies: a report of four cases and review of the literature. *Am J Clin Pathol*. févr 2006;125(2):267-72.
104. Lai YY, Qiu JY, Jiang B, Lu XJ, Huang XJ, Zhang Y, et al. Characteristics and prognostic factors of acute myeloid leukemia with t (8; 21) (q22; q22). *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi*. oct 2005;13(5):733-40.
105. Harada H, Nasu K, Harada Y, Niki Y, Tomono N, Akasaka K, et al. [Clinical and cytological features of acute myelogenous leukemia with 8; 21 chromosome translocation]. *Rinsho Ketsueki*. juill 1991;32(7):751-7.
106. Barneh F, Koedijk JB, Wijnen NE, Meulendijks T, Ashtiani M, Dunnebach E, et al. Repurposing CD19-directed immunotherapies for pediatric t(8;21) acute myeloid leukemia [Internet]. 2024 [cité 22 août 2024]. Disponible sur: <http://biorxiv.org/lookup/doi/10.1101/2024.04.19.590200>
107. Richard M. Stone, M.D., Sumithra J. Mandrekar, Ph.D., Ben L. Sanford, M.S., Kristina Laumann, B.A., Susan Geyer, Ph.D., Clara D. Bloomfield, M.D., Christian Thiede, M.D., Thomas W. Prior, Ph.D., Konstanze Döhner, M.D., Guido Marcucci, M.D., Francesco Lo-Coco, M.D., Rebecca B. Klisovic, M.D., Andrew Wei, M.B., B.S., Ph.D., Jorge Sierra, M.D., Ph.D., Miguel A. Sanz, M.D., Ph.D., Joseph M. Brandwein, M.D., Theo de Witte, M.D., Dietger Niederwieser, M.D., Frederick R. Appelbaum, M.D., Bruno C. Medeiros, M.D., Martin S. Tallman, M.D., Jürgen Krauter, M.D., Richard F. Schlenk, M.D., Arnold Ganser, M.D., Hubert Serve, M.D., Gerhard Ehninger, M.D., Sergio Amadori, M.D., Richard A. Larson, M.D., and Hartmut Döhner, M.D. Midostaurin plus Chemotherapy for Acute Myeloid Leukemia with a FLT3 Mutation | *New England Journal of Medicine* [Internet]. [cité 11 août 2024]. Disponible sur: <https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMoa1614359>
108. Erba HP, Montesinos P, Kim HJ, Patkowska E, Vrhovac R, Žák P, et al. Quizartinib plus chemotherapy in newly diagnosed patients with FLT3-internal-tandem-duplication-positive acute myeloid leukaemia (QuANTUM-First): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *The Lancet*. 13 mai 2023;401(10388):1571-83.
109. Cornelissen JJ, Blaise D. Hematopoietic stem cell transplantation for patients with AML in first complete remission. *Blood*. 7 janv 2016;127(1):62-70.
110. Roboz GJ, DiNardo CD, Stein EM, de Botton S, Mims AS, Prince GT, et al. Ivosidenib induces deep durable remissions in patients with newly diagnosed IDH1-mutant acute myeloid leukemia. *Blood*. 13 févr 2020;135(7):463-71.
111. Heinicke T, Krahl R, Kahl C, Cross M, Scholl S, Wolf HH, et al. Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation improves long-term outcome for relapsed AML patients across all ages: results from two East German Study Group Hematology and Oncology (OSHO) trials. *Ann Hematol*. 2021;100(9):2387-98.
112. Shimony S, Stahl M, Stone RM. Acute myeloid leukemia: 2023 update on diagnosis, risk-stratification, and management. *Am J Hematol*. mars 2023;98(3):502-26.
113. Tasian SK. Acute myeloid leukemia chimeric antigen receptor T-cell immunotherapy: how far up the road have we traveled? *Therapeutic Advances in Hematology*. 1 juin 2018;9(6):135-48.
114. Newell LF, Cook RJ. Advances in acute myeloid leukemia. *BMJ*. 6 oct 2021;n2026.
115. Plesa A, Labussière-Wallet H, Hayette S, Salles G, Thomas X, Sujobert P. Efficiency of blinatumomab in a t(8;21) acute myeloid leukemia expressing CD19. *Haematologica*. 1 oct 2019;104(10):e487-8.

116. Ma G, Wang Y, Ahmed T, Zaslav AL, Hogan L, Avila C, et al. Anti-CD19 chimeric antigen receptor targeting of CD19 + acute myeloid leukemia. *Leukemia Research Reports*. 1 janv 2018;9:42-4.
117. Danylesko I, Jacoby E, Yerushalmi R, Shem-Tov N, Besser MJ, Vernitsky H, et al. Remission of acute myeloid leukemia with t(8;21) following CD19 CAR T-cells. *Leukemia*. juill 2020;34(7):1939-42.
118. Perna F, Berman S, Soni R, Mansilla-Soto J, Eyquem J, Hamieh M, et al. Integrating proteomics and transcriptomics for systematic combinatorial chimeric antigen receptor therapy of AML. *Cancer Cell*. 9 oct 2017;32(4):506-519.e5.
119. Kim MY, Yu KR, Kenderian SS, Ruella M, Chen S, Shin TH, et al. Genetic Inactivation of CD33 in Hematopoietic Stem Cells to Enable CAR T Cell Immunotherapy for Acute Myeloid Leukemia. *Cell*. mai 2018;173(6):1439-1453.e19.
120. Yang L, Han Y, Saurez Saiz F, Minden MD. A tumor suppressor and oncogene: the WT1 story. *Leukemia* (08876924). mai 2007;21(5):868-76.
121. Krauth MT, Alpermann T, Bacher U, Eder C, Dicker F, Ulke M, et al. WT1 mutations are secondary events in AML, show varying frequencies and impact on prognosis between genetic subgroups. *Leukemia*. mars 2015;29(3):660-7.
122. Kochenderfer JN, Yu Z, Frasheri D, Restifo NP, Rosenberg SA. Adoptive transfer of syngeneic T cells transduced with a chimeric antigen receptor that recognizes murine CD19 can eradicate lymphoma and normal B cells. *Blood*. 11 nov 2010;116(19):3875-86.
123. Rosenberg SA, Spiess P, Lafreniere R. A new approach to the adoptive immunotherapy of cancer with tumor-infiltrating lymphocytes. *Science*. 19 sept 1986;233(4770):1318-21.
124. Kuwana Y, Asakura Y, Utsunomiya N, Nakanishi M, Arata Y, Itoh S, et al. Expression of chimeric receptor composed of immunoglobulin-derived V regions and T-cell receptor-derived C regions. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. déc 1987;149(3):960-8.
125. 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 USA*. déc 1989;86(24):10024-8.
126. Mitra A, Barua A, Huang L, Ganguly S, Feng Q, He B. From bench to bedside: the history and progress of CAR T cell therapy. *Front Immunol*. 2023;14:1188049.
127. 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 USA*. 15 janv 1993;90(2):720-4.
128. Park JR, DiGiusto DL, Slovak M, Wright C, Naranjo A, Wagner J, et al. Adoptive Transfer of Chimeric Antigen Receptor Re-directed Cytolytic T Lymphocyte Clones in Patients with Neuroblastoma. *Molecular Therapy*. avr 2007;15(4):825-33.
129. Kershaw MH, Westwood JA, Parker LL, Wang G, Eshhar Z, Mavroukakis SA, et al. A Phase I Study on Adoptive Immunotherapy Using Gene-Modified T Cells for Ovarian Cancer. *Clinical Cancer Research*. 15 oct 2006;12(20):6106-15.
130. Gong MC, Latouche JB, Krause A, Heston WDW, Bander NH, Sadelain M. Cancer Patient T Cells Genetically Targeted to Prostate-Specific Membrane Antigen Specifically Lyse Prostate Cancer Cells and Release Cytokines in Response to Prostate-Specific Membrane Antigen. *Neoplasia*. juin 1999;1(2):123-7.
131. 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. *The Journal of Experimental Medicine*. 17 août 1998;188(4):619-26.
132. Lenschow DJ, Walunas TL, Bluestone JA. CD28/B7 SYSTEM OF T CELL COSTIMULATION. *Annu Rev Immunol*. avr 1996;14(1):233-58.
133. Maher J, Brentjens RJ, Gunset G, Rivière I, Sadelain M. Human T-lymphocyte cytotoxicity and proliferation directed by a single chimeric TCR ζ /CD28 receptor. *Nat Biotechnol*. janv 2002;20(1):70-5.
134. Kwon BS, Weissman SM. cDNA sequences of two inducible T-cell genes. *Proc Natl Acad Sci USA*. mars 1989;86(6):1963-7.

135. Imai C, Mihara K, Andreansky M, Nicholson IC, Pui CH, Geiger TL, et al. Chimeric receptors with 4-1BB signaling capacity provoke potent cytotoxicity against acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*. 1 avr 2004;18(4):676-84.
136. Brentjens RJ, Santos E, Nikhamin Y, Yeh R, Matsushita M, La Perle K, et al. Genetically Targeted T Cells Eradicate Systemic Acute Lymphoblastic Leukemia Xenografts. *Clinical Cancer Research*. 15 sept 2007;13(18):5426-35.
137. Milone MC, Fish JD, Carpenito C, Carroll RG, Binder GK, Teachey D, et al. Chimeric Receptors Containing CD137 Signal Transduction Domains Mediate Enhanced Survival of T Cells and Increased Antileukemic Efficacy In Vivo. *Molecular Therapy*. août 2009;17(8):1453-64.
138. Enblad G, Karlsson H, Gammelgård G, Wenthe J, Lövgren T, Amini RM, et al. A Phase I/IIa Trial Using CD19-Targeted Third-Generation CAR T Cells for Lymphoma and Leukemia. *Clinical Cancer Research*. 15 déc 2018;24(24):6185-94.
139. Ramos CA, Rouce R, Robertson CS, Reyna A, Narala N, Vyas G, et al. In Vivo Fate and Activity of Second- versus Third-Generation CD19-Specific CAR-T Cells in B Cell Non-Hodgkin's Lymphomas. *Molecular Therapy*. déc 2018;26(12):2727-37.
140. Xiong X, Xi J, Liu Q, Wang C, Jiang Z, Yue S, et al. Co-expression of IL-7 and PH20 promote anti-GPC3 CAR-T tumour suppressor activity in vivo and in vitro. *Berasain C, éditeur. Liver International*. mai 2021;41(5):1033-43.
141. Zheng Z, Li S, Liu M, Chen C, Zhang L, Zhou D. Fine-Tuning through Generations: Advances in Structure and Production of CAR-T Therapy. *Cancers*. 3 juill 2023;15(13):3476.
142. Hartmann J, Schüßler-Lenz M, Bondanza A, Buchholz CJ. Clinical development of CAR T cells—challenges and opportunities in translating innovative treatment concepts. *EMBO Mol Med*. sept 2017;9(9):1183-97.
143. Chmielewski M, Abken H. TRUCKs: the fourth generation of CARs. *Expert Opinion on Biological Therapy*. 3 août 2015;15(8):1145-54.
144. Rubio MT, Galaine J, Borg C, Daguindau É. Biologie, concepts et principes des CAR-T cells. *Bulletin du Cancer*. déc 2018;105:S135-46.
145. 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 Research*. 1 sept 2011;71(17):5697-706.
146. Mirzaei HR, Rodriguez A, Shepphird J, Brown CE, Badie B. Chimeric Antigen Receptors T Cell Therapy in Solid Tumor: Challenges and Clinical Applications. *Front Immunol*. 22 déc 2017;8:1850.
147. Ren J, Liu X, Fang C, Jiang S, June CH, Zhao Y. Multiplex Genome Editing to Generate Universal CAR T Cells Resistant to PD1 Inhibition. *Clinical Cancer Research*. 1 mai 2017;23(9):2255-66.
148. Guercio M, Manni S, Boffa I, Caruso S, Di Cecca S, Sinibaldi M, et al. Inclusion of the Inducible Caspase 9 Suicide Gene in CAR Construct Increases Safety of CAR.CD19 T Cell Therapy in B-Cell Malignancies. *Front Immunol*. 19 oct 2021;12:755639.
149. Labanieh L, Majzner RG, Klysz D, Sotillo E, Fisher CJ, Vilches-Moure JG, et al. Enhanced safety and efficacy of protease-regulated CAR-T cell receptors. *Cell*. mai 2022;185(10):1745-1763.e22.
150. Mehrabadi AZ, Ranjbar R, Farzanehpour M, Shahriary A, Dorostkar R, Hamidinejad MA, et al. Therapeutic potential of CAR T cell in malignancies: A scoping review. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. févr 2022;146:112512.
151. Kagoya Y, Tanaka S, Guo T, Anczurowski M, Wang CH, Saso K, et al. A novel chimeric antigen receptor containing a JAK–STAT signaling domain mediates superior antitumor effects. *Nat Med*. mars 2018;24(3):352-9.
152. Tokarew N, Ogonek J, Endres S, Von Bergwelt-Baildon M, Kobold S. Teaching an old dog new tricks: next-generation CAR T cells. *Br J Cancer*. janv 2019;120(1):26-37.
153. Urbanska K, Lanitis E, Poussin M, Lynn RC, Gavin BP, Kelderman S, et al. A Universal Strategy for Adoptive Immunotherapy of Cancer through Use of a Novel T-cell Antigen Receptor. *Cancer Research*. 1 avr 2012;72(7):1844-52.
154. Cho JH, Collins JJ, Wong WW. Universal Chimeric Antigen Receptors for Multiplexed and Logical Control of T Cell Responses. *Cell*. mai 2018;173(6):1426-1438.e11.

155. Depil S, Duchateau P, Grupp SA, Mufti G, Poirot L. 'Off-the-shelf' allogeneic CAR T cells: development and challenges. *Nat Rev Drug Discov.* mars 2020;19(3):185-99.
156. Tomasik J, Jasiński M, Basak GW. Next generations of CAR-T cells - new therapeutic opportunities in hematology? *Front Immunol.* 28 oct 2022;13:1034707.
157. Maude SL, Laetsch TW, Buechner J, Rives S, Boyer M, Bittencourt H, et al. Tisagenlecleucel in Children and Young Adults with B-Cell Lymphoblastic Leukemia. *N Engl J Med.* févr 2018;378(5):439-48.
158. 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.
159. 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.
160. 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.
161. 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.
162. 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. *The Lancet.* juill 2021;398(10297):314-24.
163. Zhong Y, Liu J. Emerging roles of CAR-NK cell therapies in tumor immunotherapy: current status and future directions. *Cell Death Discov.* 10 juill 2024;10(1):318.
164. Sabbah M, Jondreville L, Lacan C, Norol F, Vieillard V, Roos-Weil D, et al. CAR-NK Cells: A Chimeric Hope or a Promising Therapy? *Cancers (Basel).* 8 août 2022;14(15):3839.
165. Li J, Chen P, Ma W. The next frontier in immunotherapy: potential and challenges of CAR-macrophages. *Exp Hematol Oncol.* 5 août 2024;13(1):76.
166. Parlement européen et le conseil de l'union européenne. RÈGLEMENT (CE) N o 1394/2007 DU PARLEMENT EUROPÉEN ET DU CONSEIL - concernant les médicaments de thérapie innovante et modifiant la directive 2001/83/CE ainsi que le règlement (CE) n o 726/2004. *Journal officiel de l'Union européenne;* 2007.
167. 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 ? *Bulletin du Cancer.* déc 2018;105:S198-204.
168. LOI n° 2011-302 du 22 mars 2011 portant diverses dispositions d'adaptation de la législation au droit de l'Union européenne en matière de santé, de travail et de communications électroniques [Internet]. *JOURNAL OFFICIEL DE LA RÉPUBLIQUE FRANÇAISE;* 2011. Disponible sur: <https://www.legifrance.gouv.fr/jorf/id/JORFTEXT000023751262>
169. Benmebarek MR, Karches CH, Cadilha BL, Lesch S, Endres S, Kobold S. Killing Mechanisms of Chimeric Antigen Receptor (CAR) T Cells. *IJMS.* 14 mars 2019;20(6):1283.
170. Hassin D, Garber OG, Meiraz A, Schiffenbauer YS, Berke G. Cytotoxic T lymphocyte perforin and Fas ligand working in concert even when Fas ligand lytic action is still not detectable: CTL perforin and FasL complementation. *Immunology.* juin 2011;133(2):190-6.
171. Laetsch TW, Maude SL, Rives S, Hiramatsu H, Bittencourt H, Bader P, et al. Three-Year Update of Tisagenlecleucel in Pediatric and Young Adult Patients With Relapsed/Refractory Acute Lymphoblastic Leukemia in the ELIANA Trial. *JCO.* 20 mars 2023;41(9):1664-9.
172. Schuster SJ, Tam CS, Borchmann P, Worel N, McGuirk JP, Holte H, et al. Long-term clinical outcomes of tisagenlecleucel in patients with relapsed or refractory aggressive B-cell lymphomas (JULIET): a multicentre, open-label, single-arm, phase 2 study. *The Lancet Oncology.* oct 2021;22(10):1403-15.
173. European Medicines Agency. EMA. Assessment report: KYMRIA. International non-proprietary name: tisagen- lecleucel. Procedure No. EMEA/H/C/004090/0000. avr 2023;

- Disponible sur: https://www.ema.europa.eu/fr/documents/product-information/kymriah-epar-product-information_fr.pdf
174. 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.
 175. Dreyling M, Fowler NH, Dickinson M, Martinez-Lopez J, Kolstad A, Butler J, et al. Durable response after tisagenlecleucel in adults with relapsed/refractory follicular lymphoma: ELARA trial update. *Blood*. 25 avr 2024;143(17):1713-25.
 176. Nakayama H. Three-year update outcomes of the first chimeric antigen receptor-T therapy for children and young adults with relapsed/refractory acute lymphoblastic leukemia. *Transl Pediatr*. avr 2024;13(4):535-6.
 177. European Medicines Agency. EMA.Assessment report: YESCARTA. juill 2023; Disponible sur: https://www.ema.europa.eu/fr/documents/product-information/yescarta-epar-product-information_fr.pdf
 178. 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.
 179. 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. *The Lancet Oncology*. janv 2022;23(1):91-103.
 180. Neelapu SS, Chavez JC, Sehgal AR, Epperla N, Ulrickson M, Bachy E, et al. Three-year follow-up analysis of axicabtagene ciloleucel in relapsed/refractory indolent non-Hodgkin lymphoma (ZUMA-5). *Blood*. 8 févr 2024;143(6):496-506.
 181. 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.
 182. Westin JR, Oluwole OO, Kersten MJ, Miklos DB, Perales MA, Ghobadi A, et al. Survival with Axicabtagene Ciloleucel in Large B-Cell Lymphoma. *N Engl J Med*. 13 juill 2023;389(2):148-57.
 183. Bachy E, Le Gouill S, Di Blasi R, Sesques P, Manson G, Cartron G, et al. A real-world comparison of tisagenlecleucel and axicabtagene ciloleucel CAR T cells in relapsed or refractory diffuse large B cell lymphoma. *Nat Med*. oct 2022;28(10):2145-54.
 184. Cappell KM, Kochenderfer JN. A comparison of chimeric antigen receptors containing CD28 versus 4-1BB costimulatory domains. *Nat Rev Clin Oncol*. nov 2021;18(11):715-27.
 185. 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.
 186. Wang M, Munoz J, Goy A, Locke FL, Jacobson CA, Hill BT, et al. Three-Year Follow-Up of KTE-X19 in Patients With Relapsed/Refractory Mantle Cell Lymphoma, Including High-Risk Subgroups, in the ZUMA-2 Study. *JCO*. 20 janv 2023;41(3):555-67.
 187. 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. *The Lancet*. août 2021;398(10299):491-502.
 188. Oluwole OO, Ghobadi A, Cassaday RD, Park JH, Houot R, Logan A, et al. Long-term survival outcomes of patients (pts) with relapsed or refractory B-cell acute lymphoblastic leukemia (R/R B-ALL) treated with brexucabtagene autoleucel (brexu-cel) in ZUMA-3. *JCO*. 1 juin 2024;42(16_suppl):6531-6531.
 189. Sabatino M, Choi K, Chiruvolu V, Better M. Production of Anti-CD19 CAR T Cells for ZUMA-3 and -4: Phase 1/2 Multicenter Studies Evaluating KTE-C19 in Patients With Relapsed/Refractory B-Precursor Acute Lymphoblastic Leukemia (R/R ALL). *Blood*. 2 déc 2016;128(22):1227-1227.
 190. 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*. sept 2020;396(10254):839-52.

191. Abramson JS, Palomba ML, Gordon LI, Lunning M, Wang M, Arnason J, et al. Two-year follow-up of lisocabtagene maraleucel in relapsed or refractory large B-cell lymphoma in TRANSCEND NHL 001. *Blood*. 1 févr 2024;143(5):404-16.
192. Wang M, Siddiqi T, Gordon LI, Kamdar M, Lunning M, Hirayama AV, et al. Lisocabtagene Maraleucel in Relapsed/Refractory Mantle Cell Lymphoma: Primary Analysis of the Mantle Cell Lymphoma Cohort From TRANSCEND NHL 001, a Phase I Multicenter Seamless Design Study. *JCO*. 1 avr 2024;42(10):1146-57.
193. 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*. juin 2022;399(10343):2294-308.
194. European Medicines Agency. EMA.Assessment report: BREYANZI. avr 2022; Disponible sur: https://www.ema.europa.eu/fr/documents/product-information/breyanzi-epar-product-information_fr.pdf
195. Morschhauser F, Dahiya S, Palomba ML, Martin Garcia-Sancho A, Reguera Ortega JL, Kuruvilla J, et al. Lisocabtagene maraleucel in follicular lymphoma: the phase 2 TRANSCEND FL study. *Nat Med*. août 2024;30(8):2199-207.
196. Madry C. The characterization of murine BCMA gene defines it as a new member of the tumor necrosis factor receptor superfamily. *International Immunology*. 1 nov 1998;10(11):1693-702.
197. O'Connor BP, Raman VS, Erickson LD, Cook WJ, Weaver LK, Ahonen C, et al. BCMA Is Essential for the Survival of Long-lived Bone Marrow Plasma Cells. *The Journal of Experimental Medicine*. 5 janv 2004;199(1):91-8.
198. Bellucci R, Alyea EP, Chiaretti S, Wu CJ, Zorn E, Weller E, et al. Graft-versus-tumor response in patients with multiple myeloma is associated with antibody response to BCMA, a plasma-cell membrane receptor. *Blood*. 15 mai 2005;105(10):3945-50.
199. Tai YT, Li XF, Breitzkreutz I, Song W, Neri P, Catley L, et al. Role of B-Cell-Activating Factor in Adhesion and Growth of Human Multiple Myeloma Cells in the Bone Marrow Microenvironment. *Cancer Research*. 1 juill 2006;66(13):6675-82.
200. Darce JR, Arendt BK, Wu X, Jelinek DF. Regulated Expression of BAFF-Binding Receptors during Human B Cell Differentiation. *The Journal of Immunology*. 1 déc 2007;179(11):7276-86.
201. 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.
202. Chari A, Vogl DT, Gavriatopoulou M, Nooka AK, Yee AJ, Huff CA, et al. Oral Selinexor–Dexamethasone for Triple-Class Refractory Multiple Myeloma. *N Engl J Med*. 22 août 2019;381(8):727-38.
203. Lonial S, Lee HC, Badros A, Trudel S, Nooka AK, Chari A, et al. Belantamab mafodotin for relapsed or refractory multiple myeloma (DREAMM-2): a two-arm, randomised, open-label, phase 2 study. *The Lancet Oncology*. févr 2020;21(2):207-21.
204. Ferment B, Lambert J, Caillot D, Lafon I, Karlin L, Lazareth A, et al. French early nationwide idecabtagene vicleucel chimeric antigen receptor T-cell therapy experience in patients with relapsed/refractory multiple myeloma (FENIX): A real-world IFM study from the DESCAR-T registry. *Br J Haematol*. 15 mai 2024;bjh.19505.
205. Rodriguez-Otero P, Ailawadhi S, Arnulf B, Patel K, Cavo M, Nooka AK, et al. Ide-cel or Standard Regimens in Relapsed and Refractory Multiple Myeloma. *N Engl J Med*. 16 mars 2023;388(11):1002-14.
206. Delforge M, Patel K, Eliason L, Dhanda D, Shi L, Guo S, et al. Health-related quality of life in patients with triple-class exposed relapsed and refractory multiple myeloma treated with idecabtagene vicleucel or standard regimens: patient-reported outcomes from the phase 3, randomised, open-label KarMMa-3 clinical trial. *The Lancet Haematology*. mars 2024;11(3):e216-27.
207. Martin TG, Madduri D, Pacaud L, Usmani SZ. Cilta-cel, a BCMA-targeting CAR-T therapy for heavily pretreated patients with relapsed/refractory multiple myeloma. *Future Oncol*. nov 2023;19(34):2297-311.

208. Martin T, Usmani SZ, Berdeja JG, Agha M, Cohen AD, Hari P, et al. Ciltacabtagene Autoleucel, an Anti-B-cell Maturation Antigen Chimeric Antigen Receptor T-Cell Therapy, for Relapsed/Refractory Multiple Myeloma: CARTITUDE-1 2-Year Follow-Up. *JCO*. 20 févr 2023;41(6):1265-74.
209. San-Miguel J, Dhakal B, Yong K, Spencer A, Anguille S, Mateos MV, et al. Cilta-cel or Standard Care in Lenalidomide-Refractory Multiple Myeloma. *N Engl J Med*. 27 juill 2023;389(4):335-47.
210. Dhakal B, Yong K, Harrison SJ, Mateos MV, Moreau P, Van De Donk NWCJ, et al. First phase 3 results from CARTITUDE-4: Cilta-cel versus standard of care (PVd or DPd) in lenalidomide-refractory multiple myeloma. *JCO*. 10 juin 2023;41(17_suppl):LBA106-LBA106.
211. Einsele H, Yong K, Harrison S, Mateos MV, Moreau P, Van De Donk NWCJ, et al. S100: FIRST PHASE 3 RESULTS FROM CARTITUDE-4: CILTA-CEL VERSUS STANDARD OF CARE (PVD OR DPD) IN LENALIDOMIDE-REFRACTORY MULTIPLE MYELOMA. *HemaSphere*. 8 août 2023;7(S3):e471416f.
212. Mina R, Mylin AK, Yokoyama H, Magen H, Alsdorf W, Minnema MC, et al. Patient-Reported Outcomes in the Phase 3 CARTITUDE-4 Study of Ciltacabtagene Autoleucel Vs Standard of Care in Patients with Lenalidomide-Refractory Multiple Myeloma after 1-3 Lines of Therapy. *Blood*. 2 nov 2023;142(Supplement 1):1063-1063.
213. Martin T, Usmani SZ, Schechter JM, Vogel M, Jackson CC, Deraedt W, et al. Matching-adjusted indirect comparison of efficacy outcomes for ciltacabtagene autoleucel in CARTITUDE-1 versus idcabtagene vicleucel in KarMMa for the treatment of patients with relapsed or refractory multiple myeloma. *Current Medical Research and Opinion*. 3 oct 2021;37(10):1779-88.
214. Martin T, Usmani SZ, Schechter JM, Rocchia T, Jackson CC, Deraedt W, et al. Updated results from a matching-adjusted indirect comparison of efficacy outcomes for ciltacabtagene autoleucel in CARTITUDE-1 versus idcabtagene vicleucel in KarMMa for the treatment of patients with relapsed or refractory multiple myeloma. *Current Medical Research and Opinion*. 2 janv 2023;39(1):81-9.
215. Rejeski K, Jain MD, Shah NN, Perales MA, Subklewe M. Immune effector cell-associated haematotoxicity after CAR T-cell therapy: from mechanism to management. *The Lancet Haematology*. juin 2024;11(6):e459-70.
216. Wat J, Barmettler S. Hypogammaglobulinemia After Chimeric Antigen Receptor (CAR) T-Cell Therapy: Characteristics, Management, and Future Directions. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice*. févr 2022;10(2):460-6.
217. Kampouri E, Walti CS, Gauthier J, Hill JA. Managing hypogammaglobulinemia in patients treated with CAR-T-cell therapy: key points for clinicians. *Expert Review of Hematology*. 3 avr 2022;15(4):305-20.
218. Bonifant CL, Jackson HJ, Brentjens RJ, Curran KJ. Toxicity and management in CAR T-cell therapy. *Molecular Therapy - Oncolytics*. 2016;3:16011.
219. Brudno JN, Kochenderfer JN. Toxicities of chimeric antigen receptor T cells: recognition and management. *Blood*. 30 juin 2016;127(26):3321-30.
220. 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.
221. Brudno JN, Kochenderfer JN. Recent advances in CAR T-cell toxicity: Mechanisms, manifestations and management. *Blood Reviews*. mars 2019;34:45-55.
222. Schubert ML, Schmitt M, Wang L, Ramos CA, Jordan K, Müller-Tidow C, et al. Side-effect management of chimeric antigen receptor (CAR) T-cell therapy. *Annals of Oncology*. janv 2021;32(1):34-48.
223. Cao JX, Wang H, Gao WJ, You J, Wu LH, Wang ZX. The incidence of cytokine release syndrome and neurotoxicity of CD19 chimeric antigen receptor-T cell therapy in the patient with acute lymphoblastic leukemia and lymphoma. *Cytotherapy*. avr 2020;22(4):214-26.
224. Sheth VS, Gauthier J. Taming the beast: CRS and ICANS after CAR T-cell therapy for ALL. *Bone Marrow Transplant*. mars 2021;56(3):552-66.
225. Davila ML, Riviere I, Wang X, Bartido S, Park J, Curran K, et al. Efficacy and Toxicity Management of 19-28z CAR T Cell Therapy in B Cell Acute Lymphoblastic Leukemia. *Sci*

- Transl Med [Internet]. 19 févr 2014 [cité 30 août 2024];6(224). Disponible sur: <https://www.science.org/doi/10.1126/scitranslmed.3008226>
226. 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.
 227. 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. *The Lancet*. févr 2015;385(9967):517-28.
 228. Filioglou D, Husnain M, Khurana S, Simpson RJ, Katsanis E. Has the shortage of fludarabine altered the current paradigm of lymphodepletion in favor of bendamustine? *Front Immunol*. 22 nov 2023;14:1329850.
 229. Zhang X, Lu X an, Yang J, Zhang G, Li J, Song L, et al. Efficacy and safety of anti-CD19 CAR T-cell therapy in 110 patients with B-cell acute lymphoblastic leukemia with high-risk features. *Blood Advances*. 26 mai 2020;4(10):2325-38.
 230. Kochenderfer JN, Dudley ME, Feldman SA, Wilson WH, Spaner DE, Maric I, et al. B-cell depletion and remissions of malignancy along with cytokine-associated toxicity in a clinical trial of anti-CD19 chimeric-antigen-receptor–transduced T cells. *Blood*. 22 mars 2012;119(12):2709-20.
 231. Liu Y, Fang Y, Chen X, Wang Z, Liang X, Zhang T, et al. Gasdermin E–mediated target cell pyroptosis by CAR T cells triggers cytokine release syndrome. *Sci Immunol*. 3 janv 2020;5(43):eaax7969.
 232. Deng T, Tang C, Zhang G, Wan X. DAMPs released by pyroptotic cells as major contributors and therapeutic targets for CAR-T-related toxicities. *Cell Death Dis*. 27 janv 2021;12(1):129.
 233. Maude SL, Frey N, Shaw PA, Aplenc R, Barrett DM, Bunin NJ, et al. Chimeric Antigen Receptor T Cells for Sustained Remissions in Leukemia. *N Engl J Med*. 16 oct 2014;371(16):1507-17.
 234. Teachey DT, Lacey SF, Shaw PA, Melenhorst JJ, Maude SL, Frey N, et al. Identification of Predictive Biomarkers for Cytokine Release Syndrome after Chimeric Antigen Receptor T-cell Therapy for Acute Lymphoblastic Leukemia. *Cancer Discovery*. 1 juin 2016;6(6):664-79.
 235. Giavridis T, Van Der Stegen SJC, Eyquem J, Hamieh M, Piersigilli A, Sadelain M. CAR T cell–induced cytokine release syndrome is mediated by macrophages and abated by IL-1 blockade. *Nat Med*. juin 2018;24(6):731-8.
 236. Hao Z, Li R, Meng L, Han Z, Hong Z. Macrophage, the potential key mediator in CAR-T related CRS. *Exp Hematol Oncol*. déc 2020;9(1):15.
 237. 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.
 238. Singh N, Hofmann TJ, Gershenson Z, Levine BL, Grupp SA, Teachey DT, et al. Monocyte lineage–derived IL-6 does not affect chimeric antigen receptor T-cell function. *Cytotherapy*. juill 2017;19(7):867-80.
 239. Aldinucci D, Poletto D, Nanni P, Degan M, Rupolo M, Pinto A, et al. CD40L induces proliferation, self-renewal, rescue from apoptosis, and production of cytokines by CD40-expressing AML blasts. *Experimental Hematology*. nov 2002;30(11):1283-92.
 240. 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.
 241. Freyer CW, Porter DL. Cytokine release syndrome and neurotoxicity following CAR T-cell therapy for hematologic malignancies. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. nov 2020;146(5):940-8.
 242. Lee DW, Santomasso BD, Locke FL, Ghobadi A, Turtle CJ, Brudno JN, et al. ASTCT Consensus Grading for Cytokine Release Syndrome and Neurologic Toxicity Associated with Immune Effector Cells. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*. avr 2019;25(4):625-38.
 243. Tudesq JJ, Yakoub-Agha M, Bay JO, Courbon C, Paul F, Picard M, et al. Prise en charge du syndrome de relargage cytokinique et du syndrome d'activation macrophagique

- après traitement par CAR-T cells : recommandations de la SFGM-TC. *Bulletin du Cancer*. févr 2023;110(2):S116-22.
244. 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). *Bulletin du Cancer*. janv 2019;106(1):S102-9.
 245. 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.
 246. 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.
 247. Picard M, Sterin A, Bay JO, Courbon C, Moreau AS, Paul F, et al. Prise en charge du syndrome de neurotoxicité associée au traitement par cellules CAR-T chez l'adulte et l'enfant : recommandations de la SFGM-TC. *Bulletin du Cancer*. févr 2023;110(2):S123-31.
 248. Gazeau N, Liang EC, Wu Q "Vicky", Voutsinas JM, Barba P, Iacoboni G, et al. Anakinra for Refractory Cytokine Release Syndrome or Immune Effector Cell-Associated Neurotoxicity Syndrome after Chimeric Antigen Receptor T Cell Therapy. *Transplantation and Cellular Therapy*. juill 2023;29(7):430-7.
 249. Sandler RD, Tattersall RS, Schoemans H, Greco R, Badoglio M, Labopin M, et al. Diagnosis and Management of Secondary HLH/MAS Following HSCT and CAR-T Cell Therapy in Adults; A Review of the Literature and a Survey of Practice Within EBMT Centres on Behalf of the Autoimmune Diseases Working Party (ADWP) and Transplant Complications Working Party (TCWP). *Front Immunol*. 31 mars 2020;11:524.
 250. Major A, Collins J, Craney C, Heitman AK, Bauer E, Zerante E, et al. Management of hemophagocytic lymphohistiocytosis (HLH) associated with chimeric antigen receptor T-cell (CAR-T) therapy using anti-cytokine therapy: an illustrative case and review of the literature. *Leuk Lymphoma*. juill 2021;62(7):1765-9.
 251. Santomasso BD, Park JH, Salloum D, Riviere I, Flynn J, Mead E, et al. Clinical and Biological Correlates of Neurotoxicity Associated with CAR T-cell Therapy in Patients with B-cell Acute Lymphoblastic Leukemia. *Cancer Discovery*. 1 août 2018;8(8):958-71.
 252. Hunter BD, Jacobson CA. CAR T-Cell Associated Neurotoxicity: Mechanisms, Clinicopathologic Correlates, and Future Directions. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*. 1 juill 2019;111(7):646-54.
 253. 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 Discovery*. 1 déc 2017;7(12):1404-19.
 254. Karschnia P, Jordan JT, Forst DA, Arrillaga-Romany IC, Batchelor TT, Baehring JM, et al. Clinical presentation, management, and biomarkers of neurotoxicity after adoptive immunotherapy with CAR T cells. *Blood*. 16 mai 2019;133(20):2212-21.
 255. Hu Y, Sun J, Wu Z, Yu J, Cui Q, Pu C, et al. Predominant cerebral cytokine release syndrome in CD19-directed chimeric antigen receptor-modified T cell therapy. *J Hematol Oncol*. déc 2016;9(1):70.
 256. Neelapu SS, Tummala S, Kebriaei P, Wierda W, Gutierrez C, Locke FL, et al. Chimeric antigen receptor T-cell therapy — assessment and management of toxicities. *Nat Rev Clin Oncol*. janv 2018;15(1):47-62.
 257. Johnson LA, June CH. Driving gene-engineered T cell immunotherapy of cancer. *Cell Res*. janv 2017;27(1):38-58.
 258. Turtle CJ, Hay KA, Hanafi LA, Li D, Cherian S, Chen X, et al. Durable Molecular Remissions in Chronic Lymphocytic Leukemia Treated With CD19-Specific Chimeric Antigen Receptor–Modified T Cells After Failure of Ibrutinib. *JCO*. 10 sept 2017;35(26):3010-20.
 259. Mailliet 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.

260. Rice J, Nagle S, Randall J, Hinson HE. Chimeric Antigen Receptor T Cell-Related Neurotoxicity: Mechanisms, Clinical Presentation, and Approach to Treatment. *Curr Treat Options Neurol.* août 2019;21(8):40.
261. Sofroniew MV. Astrocyte barriers to neurotoxic inflammation. *Nat Rev Neurosci.* mai 2015;16(5):249-63.
262. Argaw AT, Asp L, Zhang J, Navrazhina K, Pham T, Mariani JN, et al. Astrocyte-derived VEGF-A drives blood-brain barrier disruption in CNS inflammatory disease. *J Clin Invest.* 2 juill 2012;122(7):2454-68.
263. Page AV, Liles WC. Biomarkers of endothelial activation/dysfunction in infectious diseases. *Virulence.* 15 août 2013;4(6):507-16.
264. Gu T, Hu K, Si X, Hu Y, Huang H. Mechanisms of immune effector CELL-ASSOCIATED neurotoxicity syndrome after CAR-T treatment. *WIREs Mechanisms of Disease.* nov 2022;14(6):e1576.
265. 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.
266. Rustenhoven J, Jansson D, Smyth LC, Dragunow M. Brain Pericytes As Mediators of Neuroinflammation. *Trends in Pharmacological Sciences.* mars 2017;38(3):291-304.
267. Gust J, Finney OC, Li D, Brakke HM, Hicks RM, Futrell RB, et al. Glial injury in neurotoxicity after pediatric CD19-directed chimeric antigen receptor T cell therapy. *Annals of Neurology.* juill 2019;86(1):42-54.
268. Torre M, Solomon IH, Sutherland CL, Nikiforow S, DeAngelo DJ, Stone RM, et al. Neuropathology of a Case With Fatal CAR T-Cell-Associated Cerebral Edema. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology.* 1 oct 2018;77(10):877-82.
269. Shah NN, Johnson BD, Fenske TS, Raj RV, Hari P. Intrathecal chemotherapy for management of steroid-refractory CAR T-cell-associated neurotoxicity syndrome. *Blood Advances.* 26 mai 2020;4(10):2119-22.
270. 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. *Biology of Blood and Marrow Transplantation.* janv 2020;26(1):26-33.
271. Vora SB, Waghmare A, Englund JA, Qu P, Gardner RA, Hill JA. Infectious Complications Following CD19 Chimeric Antigen Receptor T-cell Therapy for Children, Adolescents, and Young Adults. *Open Forum Infectious Diseases.* 1 mai 2020;7(5):ofaa121.
272. Los-Arcos I, Iacoboni G, Aguilar-Guisado M, Alsina-Manrique L, Díaz De Heredia C, Fortuny-Guasch C, et al. Recommendations for screening, monitoring, prevention, and prophylaxis of infections in adult and pediatric patients receiving CAR T-cell therapy: a position paper. *Infection.* avr 2021;49(2):215-31.
273. Maus MV, Alexander S, Bishop MR, Brudno JN, Callahan C, Davila ML, et al. Society for Immunotherapy of Cancer (SITC) clinical practice guideline on immune effector cell-related adverse events. *J Immunother Cancer.* déc 2020;8(2):e001511.
274. Hill JA, Giralt S, Torgerson TR, Lazarus HM. CAR-T – and a side order of IgG, to go? – Immunoglobulin replacement in patients receiving CAR-T cell therapy. *Blood Reviews.* nov 2019;38:100596.
275. Hill JA, Seo SK. How I prevent infections in patients receiving CD19-targeted chimeric antigen receptor T cells for B-cell malignancies. *Blood.* 20 août 2020;136(8):925-35.
276. Hill JA, Li D, Hay KA, Green ML, Cherian S, Chen X, et al. Infectious complications of CD19-targeted chimeric antigen receptor-modified T-cell immunotherapy. *Blood.* 4 janv 2018;131(1):121-30.
277. Rejeski K, Subklewe M, Aljurf M, Bachy E, Balduzzi A, Barba P, et al. Immune effector cell-associated hematotoxicity: EHA/EBMT consensus grading and best practice recommendations. *Blood.* 7 sept 2023;142(10):865-77.
278. Jain T, Olson TS, Locke FL. How I Treat Cytopenias after CAR T-cell Therapy. *Blood.* 17 févr 2023;blood.2022017415.
279. Fried S, Avigdor A, Bieleorai 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.

280. Xia Y, Zhang J, Li J, Zhang L, Li J, Fan L, et al. Cytopenias following anti-CD19 chimeric antigen receptor (CAR) T cell therapy: a systematic analysis for contributing factors. *Annals of Medicine*. 31 déc 2022;54(1):2950-64.
281. Logue JM, Peres LC, Hashmi H, Colin-Leitzinger CM, Shrewsbury AM, Hosoya H, et al. Early cytopenias and infections after standard of care idecabtagene vicleucel in relapsed or refractory multiple myeloma. *Blood Advances*. 27 déc 2022;6(24):6109-19.
282. Wudhikarn K, Pennisi M, Garcia-Recio M, Flynn JR, Afuye A, Silverberg ML, et al. DLBCL patients treated with CD19 CAR T cells experience a high burden of organ toxicities but low nonrelapse mortality. *Blood Advances*. 14 juill 2020;4(13):3024-33.
283. 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.
284. Juluri KR, Wu QV, Voutsinas J, Hou J, Hirayama AV, Mullane E, et al. Severe cytokine release syndrome is associated with hematologic toxicity following CD19 CAR T-cell therapy. *Blood Advances*. 12 avr 2022;6(7):2055-68.
285. 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 Advances*. 11 août 2020;4(15):3776-87.
286. Pascutti MF, Erkelens MN, Nolte MA. Impact of Viral Infections on Hematopoiesis: From Beneficial to Detrimental Effects on Bone Marrow Output. *Front Immunol [Internet]*. 16 sept 2016 [cité 1 sept 2024];7. Disponible sur: <http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fimmu.2016.00364/abstract>
287. Hines MR, Knight TE, McNerney KO, Leick MB, Jain T, Ahmed S, et al. Immune Effector Cell-Associated Hemophagocytic Lymphohistiocytosis-Like Syndrome. *Transplant Cell Ther*. juill 2023;29(7):438.e1-438.e16.
288. Strati P, Li X, Deng Q, Marques-Piubelli ML, Henderson J, Watson G, et al. Prolonged cytopenia following CD19 CAR T cell therapy is linked with bone marrow infiltration of clonally expanded IFN γ -expressing CD8 T cells. *Cell Rep Med*. 15 août 2023;4(8):101158.
289. Sharma N, Reagan PM, Liesveld JL. Cytopenia after CAR-T Cell Therapy-A Brief Review of a Complex Problem. *Cancers (Basel)*. 15 mars 2022;14(6):1501.
290. Kitamura W, Asada N, Naoi Y, Abe M, Fujiwara H, Ennishi D, et al. Bone marrow microenvironment disruption and sustained inflammation with prolonged haematologic toxicity after CAR T-cell therapy. *Br J Haematol*. juill 2023;202(2):294-307.
291. Rejeski K, Perez A, Iacoboni G, Blumenberg V, Bücklein VL, Völkl S, et al. Severe hematotoxicity after CD19 CAR-T therapy is associated with suppressive immune dysregulation and limited CAR-T expansion. *Sci Adv*. 22 sept 2023;9(38):eadg3919.
292. Alsuliman T, Aubrun C, Bay JO, Beguin Y, Bigenwald C, Brissot E, et al. Toxicités hématologiques après CAR-T cells, recommandations de la Société francophone de greffe de moelle et de thérapie cellulaire (SFGM-TC). *Bulletin du Cancer*. avr 2024;S000745512400119X.
293. Galli E, Fresa A, Bellesi S, Metafuni E, Maiolo E, Pansini I, et al. Hematopoiesis and immune reconstitution after CD19 directed chimeric antigen receptor T-cells (CAR-T): A comprehensive review on incidence, risk factors and current management. *Eur J Haematol*. févr 2024;112(2):184-96.
294. Teipel R, Kroschinsky F, Kramer M, Kretschmann T, Egger-Heidrich K, Krüger T, et al. Prevalence and variation of CHIP in patients with aggressive lymphomas undergoing CD19-directed CAR T-cell treatment. *Blood Advances*. 22 mars 2022;6(6):1941-6.
295. Food and Drug Administration. FDA investigating serious risk of T-cell malignancy following BCMA-directed or CD19-directed autologous chimeric antigen receptor (CAR) T cell immunotherapies. [Internet]. 2023. Disponible sur: <https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/safety-availability-biologics/fda-investigating-serious-risk-t-cell-malignancy-following-bcma-directed-or-cd19-directed-autologous>
296. Bishop DC, Clancy LE, Simms R, Burgess J, Mathew G, Moezzi L, et al. Development of CAR T-cell lymphoma in 2 of 10 patients effectively treated with *piggyBac*-modified CD19 CAR T cells. *Blood*. 21 oct 2021;138(16):1504-9.
297. Micklethwaite KP, Gowrishankar K, Gloss BS, Li Z, Street JA, Moezzi L, et al. Investigation of product-derived lymphoma following infusion of *piggyBac*-modified CD19 chimeric antigen receptor T cells. *Blood*. 21 oct 2021;138(16):1391-405.

298. Harrison SJ, Nguyen T, Rahman M, Er J, Li J, Li K, et al. CAR+ T-Cell Lymphoma Post Ciltacabtagene Autoleucl Therapy for Relapsed Refractory Multiple Myeloma. *Blood*. 2 nov 2023;142(Supplement 1):6939-6939.
299. Ghilardi G, Fraietta JA, Gerson JN, Van Deerlin VM, Morrisette JJD, Caponetti GC, et al. T cell lymphoma and secondary primary malignancy risk after commercial CAR T cell therapy. *Nat Med*. avr 2024;30(4):984-9.
300. Zhou Z, Zhang G, Xu Y, Yang S, Wang J, Li Z, et al. The underlying mechanism of chimeric antigen receptor (CAR)-T cell therapy triggering secondary T-cell cancers: Mystery of the Sphinx? *Cancer Letters*. août 2024;597:217083.
301. Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature*. déc 2002;420(6917):860-7.
302. Elinav E, Nowarski R, Thaiss CA, Hu B, Jin C, Flavell RA. Inflammation-induced cancer: crosstalk between tumours, immune cells and microorganisms. *Nat Rev Cancer*. nov 2013;13(11):759-71.
303. Willyard C. Do cutting-edge CAR-T-cell therapies cause cancer? What the data say. *Nature*. 2 mai 2024;629(8010):22-4.
304. Steffin DHM, Muhsen IN, Hill LC, Ramos CA, Ahmed N, Hegde M, et al. Long-term follow-up for the development of subsequent malignancies in patients treated with genetically modified IECs. *Blood*. 7 juill 2022;140(1):16-24.
305. Benjamini O, Jain P, Trinh L, Qiao W, Strom SS, Lerner S, et al. Second cancers in patients with chronic lymphocytic leukemia who received frontline fludarabine, cyclophosphamide and rituximab therapy: distribution and clinical outcomes. *Leukemia & Lymphoma*. 3 juin 2015;56(6):1643-50.
306. Sacchi S, Marcheselli L, Bari A, Marcheselli R, Pozzi S, Luminari S, et al. Secondary malignancies after treatment for indolent non-Hodgkin's lymphoma: a 16-year follow-up study. *Haematologica*. 1 mars 2008;93(3):398-404.
307. Banerjee R, Poh C, Hirayama AV, Gauthier J, Cassaday RD, Shadman M, et al. Answering the "Doctor, can CAR-T therapy cause cancer?" question in clinic. *Blood Advances*. 27 févr 2024;8(4):895-8.
308. Martin LJ, Whitmore JB, Shen RR, Neumann F. T-cell malignancies with anti-CD19 chimeric antigen receptor T-cell therapy. *Blood Advances*. 13 août 2024;8(15):4144-8.
309. Fraietta JA, Nobles CL, Sammons MA, Lundh S, Carty SA, Reich TJ, et al. Disruption of TET2 promotes the therapeutic efficacy of CD19-targeted T cells. *Nature*. juin 2018;558(7709):307-12.
310. Shah NN, Qin H, Yates B, Su L, Shalabi H, Raffeld M, et al. Clonal expansion of CAR T cells harboring lentivector integration in the CBL gene following anti-CD22 CAR T-cell therapy. *Blood Adv*. 13 août 2019;3(15):2317-22.
311. Steensma DP, Bejar R, Jaiswal S, Lindsley RC, Sekeres MA, Hasserjian RP, et al. Clonal hematopoiesis of indeterminate potential and its distinction from myelodysplastic syndromes. *Blood*. 2 juill 2015;126(1):9-16.
312. Guermouche H, Ravalet N, Gallay N, Deswarte C, Foucault A, Beaud J, et al. High prevalence of clonal hematopoiesis in the blood and bone marrow of healthy volunteers. *Blood Advances*. 11 août 2020;4(15):3550-7.
313. Miller PG, Sperling AS, Brea EJ, Leick MB, Fell GG, Jan M, et al. Clonal hematopoiesis in patients receiving chimeric antigen receptor T-cell therapy. *Blood Advances*. 10 août 2021;5(15):2982-6.
314. Saini NY, Swoboda DM, Greenbaum U, Ma J, Patel RD, Devashish K, et al. Clonal Hematopoiesis Is Associated with Increased Risk of Severe Neurotoxicity in Axicabtagene Ciloleucl Therapy of Large B-Cell Lymphoma. *Blood Cancer Discovery*. 6 sept 2022;3(5):385-93.
315. Hsieh EM, Myers RM, Yates B, Annesley C, John S, Taraseviciute A, et al. Low rate of subsequent malignant neoplasms after CD19 CAR T-cell therapy. *Blood Advances*. 13 sept 2022;6(17):5222-6.
316. Chong EA, Ruella M, Schuster SJ. Five-Year Outcomes for Refractory B-Cell Lymphomas with CAR T-Cell Therapy. *N Engl J Med*. 18 févr 2021;384(7):673-4.
317. Neelapu SS, Jacobson CA, Ghobadi A, Miklos DB, Lekakis LJ, Oluwole OO, et al. 5-Year Follow-Up Supports Curative Potential of Axicabtagene Ciloleucl in Refractory Large B-Cell Lymphoma (ZUMA-1). *Blood*. 23 févr 2023;blood.2022018893.

318. Strati P, Varma A, Adkins S, Nastoupil LJ, Westin J, Hagemester FB, et al. Hematopoietic recovery and immune reconstitution after axicabtagene ciloleucel in patients with large B-cell lymphoma. *Haematologica*. 1 oct 2021;106(10):2667-72.
319. Lin Y, Raje NS, Berdeja JG, Siegel DS, Jagannath S, Madduri D, et al. Idecabtagene vicleucel for relapsed and refractory multiple myeloma: post hoc 18-month follow-up of a phase 1 trial. *Nat Med*. sept 2023;29(9):2286-94.
320. Vainstein V, Avni B, Grisariu S, Kfir-Erenfeld S, Asherie N, Nachmias B, et al. Clonal Myeloid Dysplasia Following CAR T-Cell Therapy: Chicken or the Egg? *Cancers (Basel)*. 3 juill 2023;15(13):3471.
321. Home | ClinicalTrials.gov [Internet]. [cité 22 juill 2024]. Disponible sur: <https://clinicaltrials.gov/>
322. Müller F, Taubmann J, Bucci L, Wilhelm A, Bergmann C, Völkl S, et al. CD19 CAR T-Cell Therapy in Autoimmune Disease — A Case Series with Follow-up. *N Engl J Med*. 22 févr 2024;390(8):687-700.
323. Mackensen A, Müller F, Mougiakakos D, Böltz S, Wilhelm A, Aigner M, et al. Anti-CD19 CAR T cell therapy for refractory systemic lupus erythematosus. *Nat Med*. oct 2022;28(10):2124-32.
324. Prommersberger S, Reiser M, Beckmann J, Danhof S, Amberger M, Quade-Lyssy P, et al. CARAMBA: a first-in-human clinical trial with SLAMF7 CAR-T cells prepared by virus-free Sleeping Beauty gene transfer to treat multiple myeloma. *Gene Ther*. sept 2021;28(9):560-71.
325. Borchmann P, Vandenberghe P, Urbano-Ispizua A, Haioun C, Lemonnier F, Griskevicius L, et al. Trial in Progress: A Randomized Phase II Study of MB-CART2019.1 Compared to Standard of Care Therapy in Patients with Relapsed/Refractory DLBCL Ineligible for High-Dose Chemotherapy and Autologous Stem Cell Transplantation - DALY 2-EU Trial. *Blood*. 15 nov 2022;140(Supplement 1):12784-5.
326. Study Details | Combination of an Anti-PD1 Antibody With Tisagenlecleucel Reinfusion in Children, Adolescents and Young Adults With Acute Lymphoblastic Leukemia After Loss of Persistence | ClinicalTrials.gov [Internet]. [cité 23 juill 2024]. Disponible sur: <https://clinicaltrials.gov/study/NCT05310591?term=captirall&rank=1>
327. Li AM, Hucks GE, Dinofia AM, Seif AE, Teachey DT, Baniewicz D, et al. Checkpoint Inhibitors Augment CD19-Directed Chimeric Antigen Receptor (CAR) T Cell Therapy in Relapsed B-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia. *Blood*. 29 nov 2018;132(Supplement 1):556-556.
328. Myers RM, Devine K, Li Y, Lawrence S, Leahy AB, Liu H, et al. Reinfusion of CD19 CAR T cells for relapse prevention and treatment in children with acute lymphoblastic leukemia. *Blood Advances*. 14 mai 2024;8(9):2182-92.
329. Cornillon J, Hadhoum N, Roth-Guepin G, Quessar A, Platon L, Ouachée-Chardin M, et al. Prise en charge pratique d'une encéphalopathie liée au traitement par cellules CAR-T chez l'adulte et l'enfant : recommandations de la Société francophone de greffe de moelle et de thérapie cellulaire (SFGM-TC). *Bulletin du Cancer*. janv 2020;107(1):S12-7.
330. Beauvais D, Andriane C, Aubrun C, Berquier M, Bole S, Caulier A, et al. Le parcours de soins du patient dans le cadre des CAR T-cell : recommandations de la Société francophone de greffe de moelle et de thérapie cellulaire (SFGM-TC). *Bulletin du Cancer*. déc 2020;107(12):S170-7.
331. 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). *Bulletin du Cancer*. déc 2021;108(12):S53-64.
332. Creative diagnostics. Flow cytometry guide [Internet]. Disponible sur: <https://www.creative-diagnostics.com/flow-cytometry-guide.htm>
333. Demaret J, Varlet P, Trauet J, Beauvais D, Grossemy A, Hégo F, et al. Monitoring CAR T-cells using flow cytometry. *Cytometry Part B: Clinical Cytometry*. 2021;100(2):218-24.
334. Lin HT, Okumura T, Yatsuda Y, Ito S, Nakauchi H, Otsu M. Application of Droplet Digital PCR for Estimating Vector Copy Number States in Stem Cell Gene Therapy. *Human Gene Therapy Methods*. oct 2016;27(5):197-208.

335. Mika T, Maghnouj A, Klein-Scory S, Ladigan-Badura S, Baraniskin A, Thomson J, et al. Digital-Droplet PCR for Quantification of CD19-Directed CAR T-Cells. *Front Mol Biosci.* 15 mai 2020;7:84.
336. Wang H, Du X, Chen WH, Lou J, Xiao HL, Pan YM, et al. Establishment of a Quantitative Polymerase Chain Reaction Assay for Monitoring Chimeric Antigen Receptor T Cells in Peripheral Blood. *Transplantation Proceedings.* janv 2018;50(1):104-9.
337. Fehse B, Badbaran A, Berger C, Sonntag T, Riecken K, Geffken M, et al. Digital PCR Assays for Precise Quantification of CD19-CAR-T Cells after Treatment with Axicabtagene Ciloleucel. *Molecular Therapy - Methods & Clinical Development.* mars 2020;16:172-8.
338. Véronique A, Marie-Laure C, Stéphane B, Marianne B, Corinne F, Kadidia T, et al. LTR real-time PCR for HIV-1 DNA quantitation in blood cells for early diagnosis in infants born to seropositive mothers treated in HAART area (ANRS CO 01). *Journal of Medical Virology.* févr 2009;81(2):217-23.
339. Baras A, Bocket L, Beauvais D, Hallaert C, Varlet P, Yakoub-Agha I, et al. A Real-Time Quantitative PCR Targeting the Viral Vector for the Monitoring of Patients Treated with Axicabtagene Ciloleucel. *The Journal of Molecular Diagnostics.* avr 2021;23(4):447-54.
340. Deschamps M, Decot V, Giverne C, Pinturaud M, Vaissié A, Parquet N, et al. Prérequis pour une production académique des cellules CART conforme aux bonnes pratiques pharmaceutiques (BPF). *Recommandations de la Société francophone de greffe de moelle et de thérapie cellulaire (SFGM-TC).* Bulletin du Cancer. janv 2020;107(1):S85-93.
341. EMA. Guideline on quality, non-clinical and clinical aspects of medicinal products containing genetically modified cells [Internet]. 2021. Disponible sur: <https://www.ema.europa.eu/en/quality-non-clinical-clinical-aspects-medicinal-products-containing-genetically-modified-cells-scientific-guideline>
342. ANSM. Bonnes pratiques de fabrication de médicaments à usage humain [Internet]. 2024. Disponible sur: <https://ansm.sante.fr/documents/referance/bonnes-pratiques-de-fabrication-de-medicaments-a-usage-humain>
343. 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.
344. Ortiz-Maldonado V, Rives S, Castellà M, Alonso-Saladríguez A, Benítez-Ribas D, Caballero-Baños M, et al. CART19-BE-01: A Multicenter Trial of ARI-0001 Cell Therapy in Patients with CD19+ Relapsed/Refractory Malignancies. *Molecular Therapy.* févr 2021;29(2):636-44.
345. Agencia Española del Medicamento y Productos Sanitarios (AEMPS). Résumé des caractéristique du produit ARI-0001. [Internet]. 2021. Disponible sur: https://www.aemps.gob.es/investigacionClinica/terapiasAvanzadas/docs/ARI-0001_ficha-tecnica.pdf?x74012.
346. HAS, Haute Autorité de Santé. CRYOPRÉSERVATION DE TISSUS, CELLULES ET LIQUIDES BIOLOGIQUES ISSUS DU SOIN - Recommandations de bonne pratique [Internet]. 2009. Disponible sur: https://www.has-sante.fr/upload/docs/application/pdf/2010-02/cryopreservation_-_recommandations.pdf
347. Pulvertaft RJV. CYTOLOGY OF BURKITT'S TUMOUR (AFRICAN LYMPHOMA). *The Lancet.* févr 1964;283(7327):238-40.
348. Drexler HG, Minowada J. History and Classification of Human Leukemia-Lymphoma Cell Lines. *Leukemia & Lymphoma.* janv 1998;31(3-4):305-16.
349. Matsuo Y, MacLeod R, Uphoff C, Drexler H, Nishizaki C, Katayama Y, et al. Two acute monocytic leukemia (AML-M5a) cell lines (MOLM-13 and MOLM-14) with interclonal phenotypic heterogeneity showing MLL-AF9 fusion resulting from an occult chromosome insertion, ins(11;9)(q23;p22p23). *Leukemia.* 1 sept 1997;11(9):1469-77.
350. Miltenyi Biotech CliniMACS Prodigy® Instrument [Internet]. Disponible sur: <https://www.miltenyibiotec.com/DE-en/products/clinimacs-prodigy.html#200-075-301>
351. Eyles JE, Vessillier S, Jones A, Stacey G, Schneider CK, Price J. Cell therapy products: focus on issues with manufacturing and quality control of chimeric antigen receptor T-cell therapies. *J of Chemical Tech & Biotech.* avr 2019;94(4):1008-16.
352. Roddie C, O'Reilly M, Dias Alves Pinto J, Vispute K, Lowdell M. Manufacturing chimeric antigen receptor T cells: issues and challenges. *Cytotherapy.* mars 2019;21(3):327-40.

353. Czerkinsky CC, Nilsson LÅ, Nygren H, Ouchterlony Ö, Tarkowski A. A solid-phase enzyme-linked immunospot (ELISPOT) assay for enumeration of specific antibody-secreting cells. *Journal of Immunological Methods*. déc 1983;65(1-2):109-21.
354. Kiesgen S, Messinger JC, Chintala NK, Tano Z, Adusumilli PS. Comparative analysis of assays to measure CAR T-cell-mediated cytotoxicity. *Nat Protoc*. mars 2021;16(3):1331-42.
355. Shah NN, Fry TJ. Mechanisms of resistance to CAR T cell therapy. *Nat Rev Clin Oncol* [Internet]. 5 mars 2019 [cité 22 sept 2024]; Disponible sur: <https://www.nature.com/articles/s41571-019-0184-6>
356. Hamieh M, Dobrin A, Cabriolu A, Van Der Stegen SJC, Giavridis T, Mansilla-Soto J, et al. CAR T cell trogocytosis and cooperative killing regulate tumour antigen escape. *Nature*. avr 2019;568(7750):112-6.
357. Sotillo E, Barrett DM, Black KL, Bagashev A, Oldridge D, Wu G, et al. Convergence of Acquired Mutations and Alternative Splicing of CD19 Enables Resistance to CART-19 Immunotherapy. *Cancer Discov*. déc 2015;5(12):1282-95.
358. Ruella M, Xu J, Barrett DM, Fraietta JA, Reich TJ, Ambrose DE, et al. Induction of resistance to chimeric antigen receptor T cell therapy by transduction of a single leukemic B cell. *Nat Med*. oct 2018;24(10):1499-503.
359. Singh N, Lee YG, Shestova O, Ravikumar P, Hayer KE, Hong SJ, et al. Impaired Death Receptor Signaling in Leukemia Causes Antigen-Independent Resistance by Inducing CAR T-cell Dysfunction. *Cancer Discovery*. 1 avr 2020;10(4):552-67.
360. Im NG, Guillaumet-Adkins A, Wal M, Rogers AJ, Frede J, Havig CC, et al. Regulatory Programs of B-cell Activation and Germinal Center Reaction Allow B-ALL Escape from CD19 CAR T-cell Therapy. *Cancer Immunology Research*. 1 sept 2022;10(9):1055-68.
361. Li D, Wang W, Xie S, Ge M, Wang R, Xu Q, et al. A T-cell independent universal cellular therapy strategy through antigen depletion. *Theranostics*. 2022;12(3):1148-60.
362. Fridman WH, Pagès F, Sautès-Fridman C, Galon J. The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. *Nat Rev Cancer*. avr 2012;12(4):298-306.
363. Malandro N, Budhu S, Kuhn NF, Liu C, Murphy JT, Cortez C, et al. Clonal Abundance of Tumor-Specific CD4 + T Cells Potentiates Efficacy and Alters Susceptibility to Exhaustion. *Immunity*. janv 2016;44(1):179-93.
364. Iraguha T, Omili D, Gebru E, Hardy NM, Luetkens T, Rapoport AP, et al. A Novel Multicolor Enzyme-linked Immunosorbent Spot Assay for the Functional Assessment of CAR T Cell Products. *The Journal of Immunology*. 1 mai 2023;210(1_Supplement):68.15-68.15.
365. Atanackovic D, Iraguha T, Omili D, Avila SV, Fan X, Kocoglu M, et al. A novel multicolor fluorescent spot assay for the functional assessment of chimeric antigen receptor (CAR) T-cell products. *Cytotherapy*. avr 2024;26(4):318-24.
366. Jacoby E, Bielora B, Avigdor A, Itzhaki O, Hutt D, Nussboim V, et al. Locally produced CD19 CAR T cells leading to clinical remissions in medullary and extramedullary relapsed acute lymphoblastic leukemia. *American J Hematol*. déc 2018;93(12):1485-92.
367. Itzhaki O, Jacoby E, Nissani A, Levi M, Nagler A, Kubi A, et al. Head-to-head comparison of in-house produced CD19 CAR-T cell in ALL and NHL patients. *J Immunother Cancer*. mars 2020;8(1):e000148.
368. Kedmi M, Shouval R, Fried S, Bomze D, Fein J, Cohen Z, et al. Point-of-care anti-CD19 CAR T-cells for treatment of relapsed and refractory aggressive B-cell lymphoma. *Transplantation and Cellular Therapy*. mai 2022;28(5):251-7.
369. Fried S, Shouval R, Varda-Bloom N, Besser MJ, Yerushalmi R, Shem-Tov N, et al. Point-of-care CAR T-cell therapy as salvage strategy for out-of-specification tisagenlecleucel. *Leukemia & Lymphoma*. 6 déc 2022;63(14):3385-93.
370. Fried S, Shkury E, Itzhaki O, Sdayoor I, Yerushalmi R, Shem-Tov N, et al. Point-of-care anti-CD19 chimeric antigen receptor T-cell therapy for relapsed/refractory follicular lymphoma. *Leukemia & Lymphoma*. 15 oct 2023;64(12):1956-63.

IX. LISTE DES FIGURES

Figure 1 – Différents stades de différenciations des cellules hématopoïétiques humaines : De la cellule souche à la cellule mature.....	19
Figure 2 - Les modèles expliquant l'hétérogénéité des cellules leucémiques au sein d'un tissu tumoral ou leucémique	21
Figure 3 - Classification hiérarchique 2022 de l'ICC des LAMs	24
Figure 4 – Taux d'incidence selon la classe d'âge et le sexe en France en 2018 pour les leucémies aiguës myéloïdes.	26
Figure 5 – Survie nette standardisée à 1 (en bleu) et 5 ans (en rouge) selon l'âge au diagnostic avec intervalle de confiance à 95% pour les LAM de patients entre 2010 et 2015 en France.	27
Figure 6 – (A), Taux de mortalité en excès (en nombre de décès par personne-année) ; (B), Survie nette selon le temps depuis le diagnostic pour différents âges en France entre 2010 et 2015	27
Figure 7 – Sélection des patients LAM CD19+ au CHU de Lille.	53
Figure 8 – Répartition des traitements d'entretien des LAM CD19+ de notre étude de patients.	62
Figure 9 – Analyse Kaplan-Meier de la survie sans évènements et survie globale dans les LAM CD19+	66
Figure 10 – Structure des différentes générations de CAR.....	74
Figure 11 – Méthodes d'optimisation des cellules CAR-T : « Smart T cells »	75
Figure 12 – Les différentes étapes principales de la production de CAR-T jusqu'à l'administration au patient.....	77
Figure 13 - Mécanisme d'action des cellules CAR-T	78
Figure 14 – Chronologie des approbations des différentes spécialités composées de cellules CAR-T.....	79
Figure 15 – Survie globale suivant le produit CAR-T utilisé (p-value = 0.0072) d'après l'étude rétrospective française DESCAR-T comparant Yescarta® et Kymriah®.....	83
Figure 16 – Efficacité et survie de Carvykti®.	88
Figure 17 – Effets indésirables possibles du traitement par cellules CAR-T.....	89
Figure 18 – Les différents mécanismes physiopathologiques du syndrome de relargage de cytokines.	90
Figure 19 - Les toxicités du syndrome de relargage de cytokines par organe.....	91
Figure 20 - Gestion de la prise en charge du syndrome de relargage de cytokines en fonction des différents grades de sévérité déterminés par Lee et al., Biol Bone Marrow Transplant, 2019	92
Figure 21 – Prise en charge du syndrome d'activation macrophagique secondaire au syndrome de relargage de cytokines (SAM/CRS)	93
Figure 22 - Pathogénèse couplée du CRS et de l'ICANS	95
Figure 23 - Activation endothéliale entraînant une perméabilité de la BHE	96
Figure 24 – Synthèse de la pathogénèse de l'ICANS suite à une injection de cellules CAR-T	97
Figure 25 - IRM cérébral de 4 patients avec une neurotoxicité sévère après une injection de cellules CAR-T	97
Figure 26 – Prise en charge de l'ICANS en fonction des différents grades de sévérité déterminés par Lee et al.....	98
Figure 27 – Frise chronologique d'apparition des infections opportunistes après traitement par cellules CAR-T anti-CD19	101
Figure 28 - CAR-HEMATOTOX score.....	102
Figure 29 - Mécanismes possibles de la pathogénèse de l'ICAHT	104

Figure 30 - Algorithme de traitement des ICAHT	106
Figure 31 - ICAHT au cours du temps après injection de cellules CAR-T.....	107
Figure 32 - Carte du monde avec les essais cliniques qui font participer les cellules CAR-T	112
Figure 33 - Répartition des indications des essais cliniques sur les CAR-T	114
Figure 34 - Histogramme de tous les essais cliniques en cours dans le Monde avec une distinction entre les essais nationaux, internationaux, européens et américains.....	115
Figure 35 - Carte de l'Europe montrant la répartition des essais cliniques	116
Figure 36 – (A), Répartition par ville des essais cliniques sur les CAR-T en cours en France. ; (B), Distribution des différentes indications des essais cliniques avec les CAR-T au CHU de Lille	117
Figure 37 – (A), Activité prévisionnelle des réinjections de CAR-T au CHU de Lille. ; (B), Activité réelle des réinjections de CAR-T au CHU de Lille.....	118
Figure 38 – Répartition graphique des centres initiateurs de demandes pour la réinjection de CAR-T au CHU de Lille.	120
Figure 39 - Indications suivant les CAR-T utilisés	122
Figure 40 – Répartition des raisons d’annulation de réinjection des CAR-T.....	123
Figure 41 – (A), Répartition des CRS observés après réinjection de cellules CAR-T suivant les différents grades ; (B), Répartition des ICANS après réinjection de cellules CAR-T suivant les différents grades.	126
Figure 42 – (A), Répartition des CRS en fonction des cibles de cellules CAR-T., (B), Répartition des ICANS en fonction des cibles de cellules CAR-T	127
Figure 43 – (A), Courbe de survie sans évènement (rechute) après réinjection de cellules CAR-T au cours du temps ; (B), Courbe de survie sans évènement (rechute) après réinjection de cellules CAR-T au cours du temps en fonction des cibles de CAR-T	130
Figure 44 – Rechutes et décès après CAR-T suivant leurs cibles	130
Figure 45 – (A), Courbe de survie globale après cellules CAR-T; (B), Courbe de survie globale après cellules CAR-T en fonction des cibles ; (C), Courbe de survie globale après injection de cellules CAR-T en fonction de la présence de rechute ou non des patients après réinjection	132
Figure 46 – Différents matrices de prélèvement et analyses réalisées pour le suivi immunologique du traitement par cellules CAR-T	135
Figure 47 - Principe de la cytométrie en flux.....	136
Figure 48 – Agenda de suivi immunologique des cellules CAR-T dans le sang des patients au CHU de Lille.	138
Figure 49 – Principales méthodes de détection des cellules CAR-T.....	139
Figure 50 – Exemples d’immunophénotypages de cellules CAR-T par CMF au CHU de Lille.	140
Figure 51 – Exemple d’un suivi d’une expansion de cellules CAR-T dans le sang en nombre absolu (cells/ μ L) et pour les sous-ensembles de cellules CAR-T CD4+ et CD8+.....	141
Figure 52 - Recommandations de la SFGM-TC dans le suivi des patients traités par cellules CAR-T	143
Figure 53 - Présentation des lignées cellulaires utilisées.....	148
Figure 54 – CliniMACS Prodigy® (Miltenyi BiotechTM, Allemagne).....	149
Figure 55 – Production des cellules CAR-T	150
Figure 56 - Exemple de stratégie d'analyse d'une coculture avec des cellules CAR-T et des lymphocytes B.	154
Figure 57 – Stratégies de fenêtrage exposées pour les cultures seules et cocultures des cellules CAR-T avec (A), les RAJI ; (B), les MOLM-13 CD19- ; (C), et les MOLM-13 CD19+	155

Figure 58 - Principe de perméabilisation des MOLM-13 CD19+	157
Figure 59 - Stratégies de fenêtrage après perméabilisation cellulaire pour les cultures seules et cocultures des MOLM-13 CD19+ avec les cellules CAR-T permettant d'observer l'expression extra et intracellulaire du CD19	158
Figure 60 - Principe de l'ELISpot.....	159
Figure 61 – Viabilité des lymphocytes B in vitro lors d'une coculture de cellules CAR-T VALTECH 1 et de lymphocytes B hétérologues (ratio 1 :4)	161
Figure 62 – Évolution du phénotype des lymphocytes B lors d'une coculture de cellules CAR-T VALTECH 1 à un ratio 1 :4.....	161
Figure 63 – Évolution du phénotype des lymphocytes B en coculture.....	162
Figure 64 – Cytotoxicité des cellules CAR-T sur les cellules RAJI.	163
Figure 65 - Exemple d'évolution du phénotype des cellules RAJI lors de la mise en coculture avec des cellules CAR-T VALTECH 1	164
Figure 66 - Exemple démontrant la viabilité des blastes LAM CD19+ à H0 après décongélation	165
Figure 67 - Mise au point de l'ELISpot via (A), un test de validation ; (B), de sensibilité ; (C), et de spécificité	165
Figure 68 - Simplification du test ELISpot - γ avec les cellules CAR-T	166
Figure 69 - Essai de fonctionnalité des cellules CAR-T VALTECH 1 et VALTECH 2 produites au CHU de Lille avec un test ELISpot IFN- γ	167
Figure 70 – Cytotoxicité sur les cellules RAJI (première expérience).....	168
Figure 71 - Cytotoxicité sur les cellules RAJI (deuxième expérience)	169
Figure 72 – Évolution du phénotype des cellules RAJI (première expérience).....	170
Figure 73 - Évolution du phénotype des cellules RAJI (deuxième expérience).....	171
Figure 74 - Cytotoxicité sur les cellules MOLM-13 CD19- (première expérience).	172
Figure 75 - Cytotoxicité sur les cellules MOLM-13 CD19- (deuxième expérience).....	173
Figure 76 - Évolution du marqueur CD19 des cellules MOLM-13 CD19- (première expérience)	174
Figure 77 - Évolution du marqueur CD19 des cellules MOLM-13 CD19- (deuxième expérience).....	174
Figure 78 - Cytotoxicité sur les cellules MOLM-13 CD19+ (première expérience)	175
Figure 79 - Cytotoxicité sur les cellules MOLM-13 CD19+ (deuxième expérience).....	176
Figure 80 - Évolution du phénotype des cellules MOLM-13 CD19+ (première expérience)	177
Figure 81 - Évolution du phénotype des cellules MOLM-13 CD19+ (deuxième expérience)	178
Figure 82 - Évolution des expressions extracellulaires du CD19 et de l'IgG1 des cellules MOLM-13 CD19+	180
Figure 83 - Évolution des phénotypes par rapport au CD19 en extra et intracellulaires des cellules MOLM-13 CD19+	181
Figure 84 - Étude de la viabilité des différentes lignées cellulaires en fonction du temps dans les deux expériences réalisées	182
Figure 85 – Évolution de la viabilité des différentes lignées cellulaires au cours du temps en présence et absence de cellules CAR-T	183
Figure 86 – Comparaison entre les deux expériences réalisées des pourcentages moyens de cytotoxicité des cellules CAR-T à H5 et H24.....	184
Figure 87 – Diverses UMAP représentant l'évolution en fonction du temps de la part des cellules CD45+ CD3- mortes (7-AAD+) provenant des cocultures avec les cellules CAR-T	185
Figure 88 - Étude du taux et du nombre de cellules CD19+ des différentes lignées cellulaires en fonction du temps dans les deux expériences réalisées	187

Figure 89 - Évolution du pourcentage et du nombre de cellules CD19+ au cours du temps en présence et absence de cellules CAR-T	188
Figure 90 – Comparaison entre les deux expériences réalisées.	189
Figure 91 - Diverses UMAP représentant l'évolution en fonction du temps de l'expression du CD19 extracellulaire de la part des cellules CD45+ CD3- provenant des cocultures avec les cellules CAR-T	190
Figure 92 – Étude de fonctionnalité des cellules CAR-T VALTECH 1 et VALTECH 2 produites au CHU de Lille avec un test ELISpot IFN- γ sur les différentes lignées cellulaires (RAJI, MOLM-13 CD19- et MOLM-13 CD19+).....	191
Figure 93 - Exemples de viabilité des cellules CAR-T	193
Figure 94 – Diminution du nombre de cellules CD19+ après 24 heures d'incubation de blastes frais myéloïdes CD19+ en contact avec des cellules CAR-T anti-CD19.....	195
Figure 95 - Une analyse de fluorescence avec des spots multicolores détectant simultanément l' IFN- γ , le TNF α et le granzyme B pour l'utilisation potentielle de test fonctionnel des cellules CAR-T produites.....	199

X. LISTE DES TABLES

Table 1 - Classification diagnostique de l'ICC 2022 pour les LAMs	25
Table 2 – Prédipositions germinales des néoplasies myéloïdes d'après l'ICC et l'ELN 2022	29
Table 3 – Expression de marqueurs cytoplasmiques et de surface pour le diagnostic de LAM et de LA bi-ou multilinéale d'après l'ELN 2022.....	34
Table 4 – Système de score pour déterminer une LA biphénotypique d'après l'EGIL (European Group of Immunology of Leukemia) 1998	36
Table 5 – Classification du risque pronostique au moment du diagnostic initial d'après l'ELN 2022	45
Table 6 – Caractéristiques démographiques et clinico-biologiques des patients LAM CD19+, au moment du diagnostic.	54
Table 7 – Caractéristiques des cas de LAM CD19+ suivant les analyses spécialisées d'hématologie (en cytogénétique, cytométrie en flux et biologie moléculaire).	57
Table 8 - Classification diagnostique des cas de LAM CD19+ selon l'ICC 2022.....	58
Table 9 - Classification pronostique des cas selon l'ELN 2022 au moment de leur diagnostic en tant que LAM CD19+	59
Table 10 – Traitements d'induction et de consolidation reçus par les patients.	61
Table 11 – Caractéristiques démographiques, biologiques et cliniques des LAM CD19+ en rechute ou/et réfractaire observées au CHU de Lille.	64
Table 12 – Traitements au moment des rechutes et/ou des états réfractaires et les possibles évènements survenus après les rechutes ou échecs de traitement.	66
Table 13 – Analyse de l'impact pronostique sur la survie sans évènement (rechutes et états réfractaires) dans cette population de LAM CD19+.	68
Table 14 - Analyse de l'impact pronostique sur la survie globale dans cette population de LAM CD19+.	70
Table 15 – Spécialités à base de cellules CAR-T approuvées actuellement sur le marché européen, américain et français.	80
Table 16 – Diagnostic différentiel des ICAHT et les examens complémentaires à réaliser en conséquence	105
Table 17 - Lieux des différents essais cliniques dans le Monde.....	113
Table 18 - Indications pour lesquelles les cellules CAR-T sont inscrits dans des essais cliniques dans le Monde	114
Table 20 - Caractéristiques des essais cliniques dans le Monde.....	115
Table 21 – Résumé de l'activité CAR-T au CHU de Lille	118
Table 22 – Activité démographique des cellules CAR-T au CHU de Lille	119
Table 23 – Caractéristiques des patients ayant reçu des cellules CAR-T au CHU de Lille..	121
Table 24 - Différentes spécialités de CAR-T utilisées au CHU de Lille	121
Table 25 – Résumé des patients prévus mais non réinjectés par des cellules CAR-T (N= 20).	123
Table 26 – Résumé des patients ayant reçu une double réinjection de CAR-T.	125
Table 27 - Effets indésirables après une réinjection de CAR-T.	126
Table 28 – Tableau récapitulatif des rechutes post-CAR-T.....	129
Table 29 - Tableau récapitulatif des décès post-CAR-T.....	133
Table 30 – Marqueurs antigéniques utilisés pour un immunophénotypage lymphocytaire standard et celui des sous-populations lymphocytaires T.	137
Table 31 – Récapitulatif des techniques utilisées au CHU de Lille en virologie en fonction des types de CAR-T administrés.....	142
Table 32 - Efficacité de transduction et phénotypage des cellules CAR-T VALTECH 1 et 2.	150

Table 33 – Panel d’anticorps utilisés pour les cocultures.....	153
Table 34 – Panel d’anticorps utilisé pour le contrôle isotypique et le marquage du CD19 en extracellulaire	157
Table 35 – Panel d’anticorps utilisé pour le marquage en intra et en extra-cellulaire des MOLM-13 CD19+ en cocultures ou seules	157
Table 36 – Moyenne des valeurs absolues en cellules RAJI viables/ μ L lorsqu’elles sont en cocultures suivant différentes conditions.....	164

XI. ANNEXE

Code patient	Étude cytogénétique
CD19LAM01	46, XY, t(15;17)(q22;q21)
CD19LAM02	46, XY
CD19LAM03	46, X, -X, t(8;21)(q22;q22), + 8
CD19LAM04	45, XX,-7,t(8;21)(q22;q22)
CD19LAM05	46, XX, t(8;21) (q22;q22)
CD19LAM06	45,X,-Y,t(8;21)(q22;q22)
CD19LAM07	46,XY,t(8;21)(q22;q22)
CD19LAM08	46,X,-X,t(8;21)(q22;q22),+8
CD19LAM09	47, XY, t(8;21)(q22;q22),+8
CD19LAM10	46, XX, t(8;21) (q22;q22)
CD19LAM11	53-58,X,-X,del(5)(q15q35),add(8)(p12),add(10)(p11),+10,-13,-18,der(19)t(13;19)(q11;p13)+8-10 idic(21)(q22), minx2[cp7]
CD19LAM12	46,XY,t(8;21)(q22;q22)
CD19LAM13	46,XY,del(14)(q22q31 [6] / 46,sl,t(16;17)(p13;q12) [1] / 46,XY,t(14;15)(q32;q11) [5] / 46,XY [11] //46,XX [7]
CD19LAM14	"46,XX,t(8;21)(q22;q22) [4] / 45,X,-X,t(8;21)(q22;q22) [12]"
CD19LAM15	46,XY,t(8;21)(q22;q22)
CD19LAM16	45, X, -X, t(8;16;21)(q21;p13,q22)
CD19LAM17	46, XY, t(1;11)(p32;q23),del(13)(q12q31)
CD19LAM18	46,XX,t(9;22)(q34;q11).ish 9q34 (ABL+,BCR-) 22q11(ABL+,BCR+)
CD19LAM19	46,XX,t(8;21)(q22;q22)
CD19LAM20	45, X, -X, t(8;21)(q22;q22)
CD19LAM21	46,XY,del(7)(q22q32).ish(D7S486x2,CEP7x2)
CD19LAM22	46,XX,del(7)(q32q34),t(8;21)(q22;q22) [14] / 47,idem,+6 [3]
CD19LAM23	47,XX,add(2)(q37),+6 [18] / 46,XX [6]
CD19LAM24	46,XX,t(8;21)(q22;q22) [19] / 45?,sl,-10 [2]
CD19LAM25	47, XY, der(7),t(7;12)(p14;p15)t8,der(8)t(8;21)(q22;q22),der(12),t(8;12)(q15;q24),t(16;17)(p13;q22),der(21)(21p13->21q22::8q22->8q24::7p14->7p22)[CP8] 47, XYY [2]
CD19LAM26	46,XY
CD19LAM27	46,XX,t(8;21;11)(q22;q22;q23)
CD19LAM28	46,XX
CD19LAM29	46,XX,t(8;21)(q22;q22)
CD19LAM30	46,XY,del(16)(q22).ish16q22(3'CBF-,5'CBF-)
CD19LAM31	46, XY, t(8;21)(q22;q22) [2] / 45, sl, -X, del(9)(q22) [1]
CD19LAM32	46,XX
CD19LAM33	45,XY,-7,t(8;21)(q22;q22)[14]/45,sl1,del(9)(q22)[4]/46,sl2,+der(21)t(8;21)[2]
CD19LAM34	46, XY, t(8;21)(q22;q22), del(9)(q22;q34)
CD19LAM35	46,XY,t(8;21)(q22;q22), del(11), der(16), t(1;16)
CD19LAM36	47,XX,t(8;21)(q22;q22),+21
CD19LAM37	45, XY, t(1;4)(q42;q35), add(7)(q22), der(9;12)(q10;q10)
CD19LAM38	45,X,-Y,t(8;21)(q22;q22)
CD19LAM39	46, XY, t(9;22)(q34;q11)
CD19LAM40	46,XY,t(8;21)(q22;q22) [19] / 46,XY [1]
CD19LAM41	46,XY
CD19LAM42	47, XX, + 21 c(20) (anomalie cytogénétique non acquise mais constitutionnelle)
CD19LAM43	46,XY,t(8;21)(q22;q22)
CD19LAM44	46,XY,t(8;21)(q22;q22)
CD19LAM45	47,XY, t(8;21)(q22)del(9)(q22)[6]/48,SL1,+del(9)(q22)[25]/46,SL2,-y[3]

Table supplémentaire 1 – Recueil de toutes les analyses cytogénétiques pour les N = 45 patients.

Code patient	Analyse de biologie moléculaire
CD19LAM01	<i>PML::RARA</i>
CD19LAM02	<i>BCORL1</i> (exon 3, c.2715delinsGGT : p.N905Kfs*21 (VAF = 59%)) Surexpression faible <i>EVI1</i> <i>FLT3</i> (exon 14, c.1837_1837+1ins60 : p.F612_G613ins20 (VAF 5%)) exon 14, c.1801_1802ins27 : p.D600_L601insRPREEYEYD (VAF 2%) exon 14, c.1836_1837ins69 : p.F612_G613ins23 (VAF 28%)) Duplication <i>FLT3 (FLT3-ITD)</i> <i>RUNX1</i> (exon 9, c.1022_1023insAGGA : p.I342Gfs*259 (VAF 37%)) <i>SF3B1</i> (exon 14, c.1998G>T : p.K666N (VAF 37%)) <i>WT1</i> (exon 7, c.1148dup : p.E384X (VAF 30%))
CD19LAM03	<i>RUNX1::RUNX1T1</i>
CD19LAM04	<i>RUNX1::RUNX1T1</i> <i>KIT</i> (exon 8, c.1253A>C : p.Y418S (VAF 4%)) exon 8, c.1254C>A : p.Y418S (VAF 4%) exon 8, c.1255_1257delGAC : p.D419del (VAF 4%) exon 8, c.1256_1257delinsGCCTC : p.D419delinsGL (VAF 1%) exon 8, c.1256A>C : p.D419A (VAF 5%) exon 8, c.1258A>T : p.R420W (VAF 5%) exon 1,7 c.2459A>G : p.D820G (VAF 15%))
CD19LAM05	<i>RUNX1::RUNX1T1</i> Surexpression <i>WT1</i>
CD19LAM06	<i>RUNX1::RUNX1T1</i> <i>EZH2</i> (exon 8, c.847_848insGGGA : p.T283RfsX6 (VAF 11%)) exon 18, c.2050C>T : p.R684C (VAF 8%))
CD19LAM07	<i>RUNX1::RUNX1T1</i> <i>NRAS</i> (exon 3, c.183A>C : p.Q61H) Surexpression <i>WT1</i>
CD19LAM08	<i>RUNX1::RUNX1T1</i>
CD19LAM09	<i>RUNX1::RUNX1T1</i> <i>NRAS</i> (exon 3, c.183A>C : p.Q61H (VAF 28%)) exon 3, c.178_179insACCTTG : p.A59_G60insDL (VAF 15%)) Surexpression <i>WT1</i>
CD19LAM10	<i>RUNX1::RUNX1T1</i>
CD19LAM11	Surexpression <i>WT1</i> <i>TP53</i> (exon 10, c.1024C>T : p.R342X (VAF 43%))
CD19LAM12	<i>RUNX1::RUNX1T1</i> <i>ASXL1</i> (exon 12, c.1900_1922del : p.E635RfsX15) <i>PHF6</i> (exon 7, c.649dupG : p.V217GfsX7 (VAF 22%))
CD19LAM13	Duplication <i>FLT3 (FLT3-ITD)</i> Variant <i>NPM1</i> Surexpression <i>WT1</i>
CD19LAM14	<i>RUNX1::RUNX1T1</i>
CD19LAM15	<i>RUNX1::RUNX1T1</i> Surexpression <i>WT1</i> <i>ASXL1</i> (exon 12, c.1934dup : p.G646WfsX12 (VAF 26%))
CD19LAM16	<i>RUNX1::RUNX1T1</i> Surexpression <i>WT1</i> <i>EZH2</i> (exon 20, c.2234A>G : p.E745G (VAF 37%))
CD19LAM17	<i>FLT3 (FLT3-TKD)</i> , exon 20, c.2508_2510delCAT : p.I836del (VAF 22%)) Surexpression <i>WT1</i>
CD19LAM18	<i>BCR::ABL1 (M-BCR)</i> (transcrit a2b3) Surexpression <i>WT1</i>
CD19LAM19	<i>RUNX1::RUNX1T1</i>
CD19LAM20	<i>RUNX1::RUNX1T1</i> Surexpression <i>WT1</i>
CD19LAM21	Surexpression <i>WT1</i>
CD19LAM22	<i>RUNX1::RUNX1T1</i> Surexpression <i>WT1</i>
CD19LAM23	Duplication <i>FLT3 (FLT3-ITD)</i> Surexpression <i>WT1</i>
CD19LAM24	<i>RUNX1::RUNX1T1</i>
CD19LAM25	<i>RUNX1::RUNX1T1</i> <i>ASXL2</i> (exon 12, c.1840C>T : p.R614X (VAF 39%)) <i>IDH2</i> (exon 4, c.419G>A : p.R140Q (VAF 40%)) <i>NRAS</i> (exon 2, c.34G>A : p.G12S (VAF 40%)) Surexpression <i>WT1</i>
CD19LAM26	<i>CEBPA</i> (état homozygote) (exon 1, c.899G>T : p.R300L (Profil homozygote)) Surexpression <i>WT1</i> <i>EZH2</i> (exon 18, c.2083T>C : p.S695P (VAF 4%)) <i>GATA2</i> (exon 4, c.923G>C : p.R308P (VAF 35%)) <i>NRAS</i> (exon 2, c.38G>T : p.G13V (VAF 19%))
CD19LAM27	<i>RUNX1::RUNX1T1</i> <i>c-KIT</i> (délétion de 3 paires de bases, exon 8) Surexpression <i>WT1</i>
CD19LAM28	Duplication <i>FLT3 (FLT3-ITD)</i> <i>NPM1</i> (exon 11, c.863_864insCCTG : p.W288Cfs*12) Surexpression <i>WT1</i>

Code patient	Rémission clinique	Traitements reçus
CD19LAM01	Oui	Aracytine - Trioxyde d'arsenic
CD19LAM02	Non	Gilteritinib - Soins palliatifs
CD19LAM11	Non	Azacitidine - Soins palliatifs
CD19LAM13	Non	F14512 - Cytarabine
CD19LAM15	Oui	Daunorubicine - Cytarabine
CD19LAM17	Non	Amsacrine - Cytarabine - Midostaurine - Azacitidine - Venetoclax
CD19LAM21	Non	Fludarabine - Cytarabine - Mitoxantrone - Azacitidine - Acide tout trans rétinolique - Dépakine
CD19LAM22	Oui	Cytarabine - Mitoxantrone - IT (MTX, cytarabine, hydrocortisone) - Amsacrine - Étoposide - Daunorubicine - L-asparaginase
CD19LAM23	Non	Daunorubicine - Cytarabine - Amsacrine - Azacitidine
CD19LAM25	Oui	Cytarabine - Amsacrine
CD19LAM27	Oui	Cytarabine - Mitoxantrone - IT (MTX, cytarabine, hydrocortisone) - Amsacrine - Étoposide - Daunorubicine - L-asparaginase - IL-2
CD19LAM28	Oui	Cytarabine - Mitoxantrone - IT (MTX, cytarabine, hydrocortisone) - Amsacrine - Étoposide - Daunorubicine - L-asparaginase
CD19LAM29	Oui	Blinatumomab - Azacitidine - Venetoclax
CD19LAM30	Oui	Amsacrine - Cytarabine
CD19LAM31	Oui	Cytarabine - Daunorubicine
CD19LAM32	Oui	Daunorubicine - Amsacrine - Cytarabine - Azacitidine
CD19LAM35	Oui	Cytarabine - Daunorubicine - IT (MTX, cytarabine)
CD19LAM36	Non	Cytarabine
CD19LAM37	Non	Cytarabine - Amsacrine - Decitabine - Venetoclax
CD19LAM40	Oui	Cytarabine - Mitoxantrone - IT (MTX, cytarabine, hydrocortisone) - Amsacrine - Étoposide - Daunorubicine - L-asparaginase
CD19LAM41	Oui	Daunorubicine - Cytarabine
CD19LAM43	Oui	Daunorubicine - Cytarabine
CD19LAM45	Oui	Daunorubicine - Cytarabine

Table supplémentaire 3 – Principes actifs reçus avant la rechute et l'état réfractaire pour chaque patient LAM CD19+ (en rechute et/ou réfractaire). Abréviations : IT, intrathécale ; MTX, méthotrexate.

Méthodes	Principes
Relargage d'isotopes radioactifs	Mesure de la radioactivité émise par la lyse des cellules cibles incorporant préalablement un isotope radioactif (exemple : Chrome 51) (1)
Bioluminescence	Mesure d'une émission de photon par les cellules cibles transduites avec le gène de la luciférase(2)
Impédance	Mesure d'une décroissance d'impédance due à la lyse des cellules cibles (3)
Relargage d'enzymes intracellulaires	Dosage d'enzyme intracellulaire (LDH) dans le surnageant cellulaire(4)
Étude directe des cellules cible	CMF : Viabilité par l'étude de la lyse des cellules cibles : marquage par 7-AAD(5)
	CMF : Prolifération des cellules cibles (6)
	Par mesure de la radioactivité : incorporation de la thymidine tritiée dans l'ADN des cellules cibles (7)

Table supplémentaire 4 - Exemples de tests pouvant servir de contrôles de cytotoxicité des cellules CAR-T Abréviations : ADN, acide désoxyribonucléique ; CMF, cytométrie en flux ; LDH, lactate déshydrogénase ; 7-AAD, 7-Aminoactinomycine D, (Adaptée de la thèse du Docteur Thibault Pajot)

	Pourcentage moyen (%)	p-value
A H5		
RAJI (1 ^{ère} expérience)	43.0	0.030
RAJI (2 ^{ème} expérience)	54.6	
MOLM-13 CD19+ (1 ^{ère} expérience)	24.9	0.006
MOLM-13 CD19+ (2 ^{ème} expérience)	38.2	
A H24		
RAJI (1 ^{ère} expérience)	71.9	0.946
RAJI (2 ^{ème} expérience)	72.7	
MOLM-13 CD19+ (1 ^{ère} expérience)	71.9	0.447
MOLM-13 CD19+ (2 ^{ème} expérience)	81.5	

Table supplémentaire 5 - Différences de pourcentages moyens entre la première et la deuxième expérience à H5 et H24 en présence de cellules CAR-T (Statistiques réalisées à l'aide d'un test t de Student sur échantillons non appariés grâce à GraphPad Prism 10® (version 10.3.1))

Bibliographie (annexe):

1. Kiesgen S, Messinger JC, Chintala NK, Tano Z, Adusumilli PS. Comparative analysis of assays to measure CAR T-cell-mediated cytotoxicity. *Nat Protoc.* mars 2021;16(3):1331-42.
2. Omokoko TA, Luxemburger U, Bardissi S, Simon P, Utsch M, Breitkreuz A, et al. Luciferase mRNA Transfection of Antigen Presenting Cells Permits Sensitive Nonradioactive Measurement of Cellular and Humoral Cytotoxicity. *Journal of Immunology Research.* 2016;2016:1-13.
3. Peper JK, Schuster H, Löffler MW, Schmid-Horch B, Rammensee HG, Stevanović S. An impedance-based cytotoxicity assay for real-time and label-free assessment of T-cell-mediated killing of adherent cells. *Journal of Immunological Methods.* mars 2014;405:192-8.
4. Hussain RF, Nouri AME, Oliver RTD. A new approach for measurement of cytotoxicity using colorimetric assay. *Journal of Immunological Methods.* janv 1993;160(1):89-96.
5. Liu L, Chahroudi A, Silvestri G, Wernett ME, Kaiser WJ, Safrit JT, et al. Visualization and quantification of T cell-mediated cytotoxicity using cell-permeable fluorogenic caspase substrates. *Nat Med.* févr 2002;8(2):185-9.
6. Mirzaei HR, Jamali A, Jafarzadeh L, Masoumi E, Alishah K, Fallah Mehrjardi K, et al. Construction and functional characterization of a fully human anti-CD19 chimeric antigen receptor (huCAR)-expressing primary human T cells. *Journal Cellular Physiology.* juin 2019;234(6):9207-15.
7. Griffiths M, Sundaram H. Drug Design and Testing: Profiling of Antiproliferative Agents for Cancer Therapy Using a Cell-Based Methyl-[3H]-Thymidine Incorporation Assay. In: Cree IA, éditeur. *Cancer Cell Culture [Internet].* Totowa, NJ: Humana Press; 2011 [cité 22 sept 2024]. p. 451-65. (Methods in Molecular Biology; vol. 731). Disponible sur: http://link.springer.com/10.1007/978-1-61779-080-5_36

Université de Lille
UFR3S-Pharmacie
DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE
Année Universitaire 2023/2024

Nom : BITAN
Prénom : Joan

Titre de la thèse : Validation de la cytotoxicité des cellules CAR-T anti-CD19 dans un contexte de leucémie aiguë myéloïde en rechute ou réfractaire exprimant le CD19

Mots-clés : Cellules CAR-T, Leucémie aiguë myéloïde, Antigène CD19, production académique, test de cytotoxicité immunologique, ELISpot

Résumé :

Contexte : La leucémie aiguë myéloïde CD19+ est une hémopathie maligne rare au pronostic défavorable. Le CHU de Lille développe une production académique de cellules CAR-T anti-CD19 pour traiter cette pathologie, non couverte par les industriels. L'autorisation de l'agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé nécessite la validation de l'efficacité et de la fonctionnalité des cellules CAR-T pour chaque lot produit.

Méthode : Après une mise au point technique, la cytotoxicité *in vitro* de deux lots différents de cellules CAR-T est évaluée par coculture avec des lignées CD19+, telles que RAJI, et des lignées blastiques myéloïdes MOLM-13 (CD19- et CD19+). La viabilité cellulaire est analysée par cytométrie en flux via le marqueur 7-Aminoactinomycine. La fonctionnalité est mesurée par *enzyme-linked immunospot* (ELISpot), évaluant la sécrétion d'interféron gamma (IFN- γ).

Résultats : Les deux lots de cellules CAR-T testés ont montré une cytotoxicité progressive au fil du temps, atteignant à H30 un taux supérieur à 85% sur les lignées RAJI et MOLM-13 CD19+. En revanche, pour la lignée MOLM-13 CD19-, ce taux reste inchangé, en présence ou non de cellules CAR-T. Par ailleurs, le test ELISpot a confirmé la libération d'IFN- γ avec les lignées RAJI et MOLM-13 CD19+ en contact avec les cellules CAR-T, attestant de leur fonctionnalité.

Conclusion : La validation de ces tests de cytotoxicité et de fonctionnalité permettra de soumettre une demande d'essai clinique pour offrir une nouvelle option thérapeutique aux patients atteints de LAM CD19+ sans alternative de traitement.

Membres du jury :

Président :

Madame le Professeur Annabelle DUPONT, PU-PH, CHU de Lille

Directeur de thèse :

Madame le Docteur Julie DEMARET, MCU-PH, CHU de Lille

Assesseurs :

Madame le Professeur Myriam LABALETTE, PU-PH, CHU de Lille

Monsieur le Professeur Ibrahim YAKOUB-AGHA, PU-PH, CHU de Lille