

Instituts  
thématiques



**Inserm**

Institut national  
de la santé et de la recherche médicale



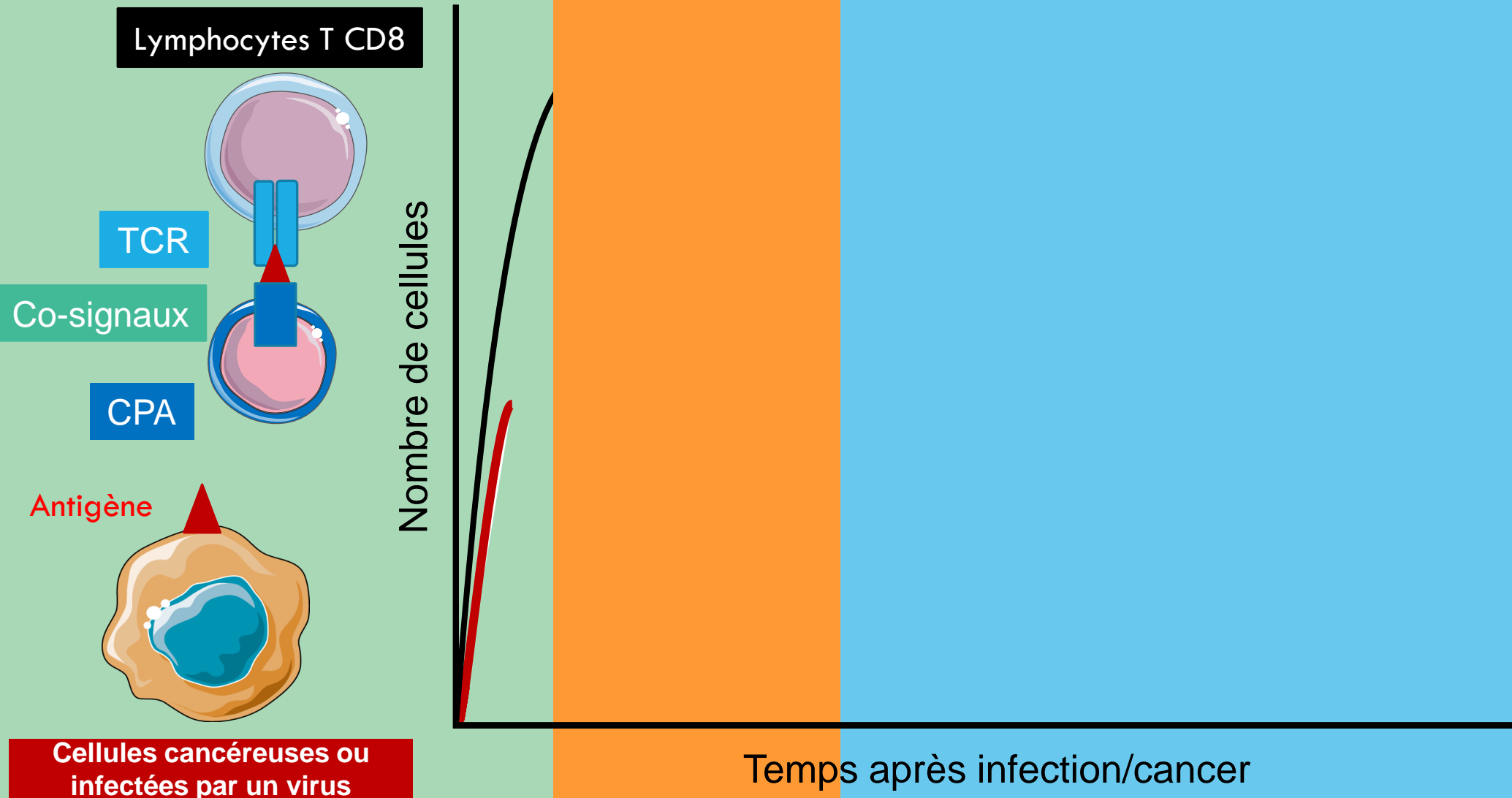
**RÔLE D'UNE MUTATION GAIN DE FONCTION DE CXCR4 DANS  
LA TAILLE DU COMPARTIMENT MÉMOIRE DES  
LYMPHOCYTES T CD8**

Pierre-Edouard Debureau

Stage de Master 2 – Supervision : Dr. Mélanie Wencker

SFH 2021 – Jeudi 8 septembre 2021

# VIE D'UN LYMPHOCYTE T CD8

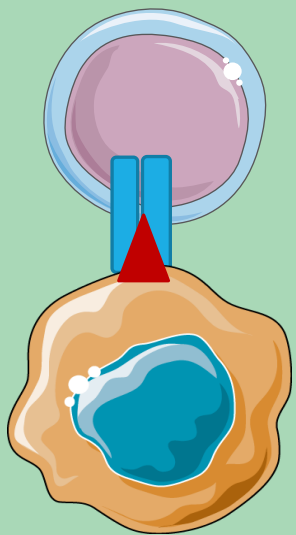


# VIE D'UN LYMPHOCYTE T CD8

Expansion

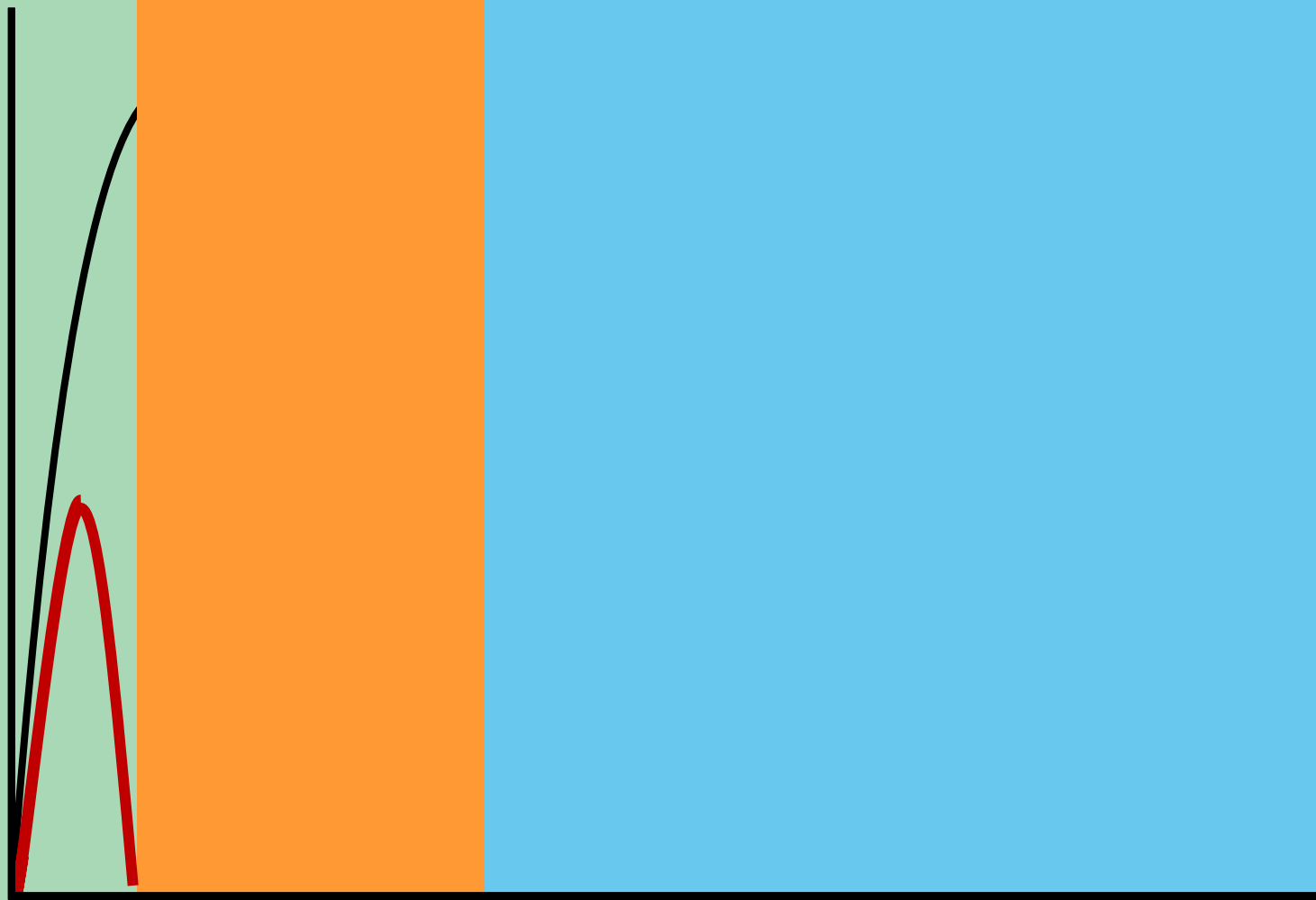
Lymphocytes T CD8

Nombre de cellules



Cellules cancéreuses ou infectées par un virus

Temps après infection/cancer

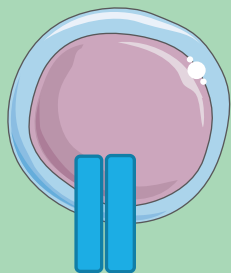


# VIE D'UN LYMPHOCYTE T CD8

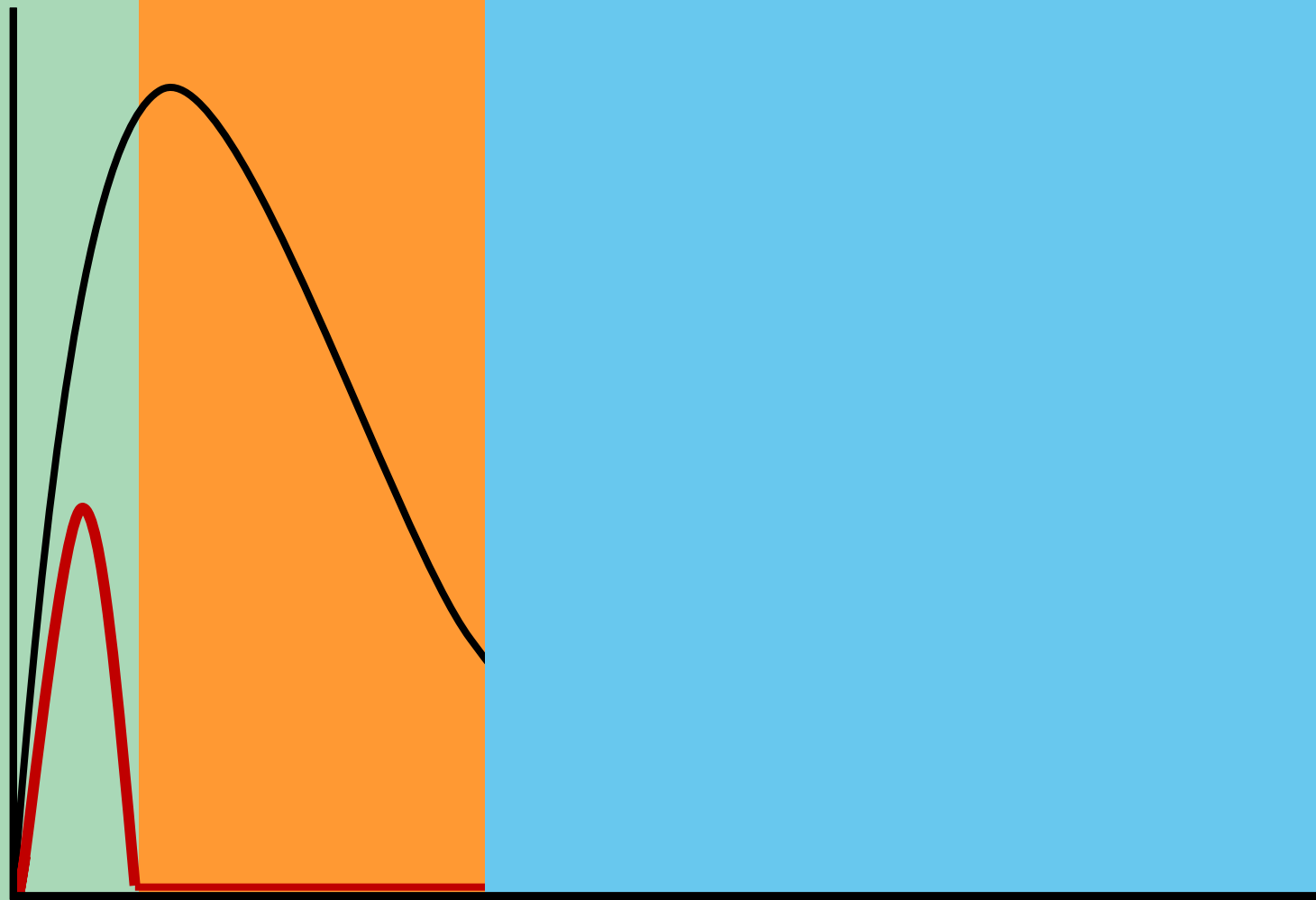
Expansion

Contraction

Lymphocytes T CD8



Nombre de cellules



Temps après infection/cancer

# VIE D'UN LYMPHOCYTE T CD8

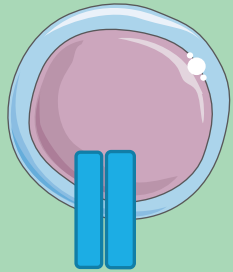
Expansion

Contraction

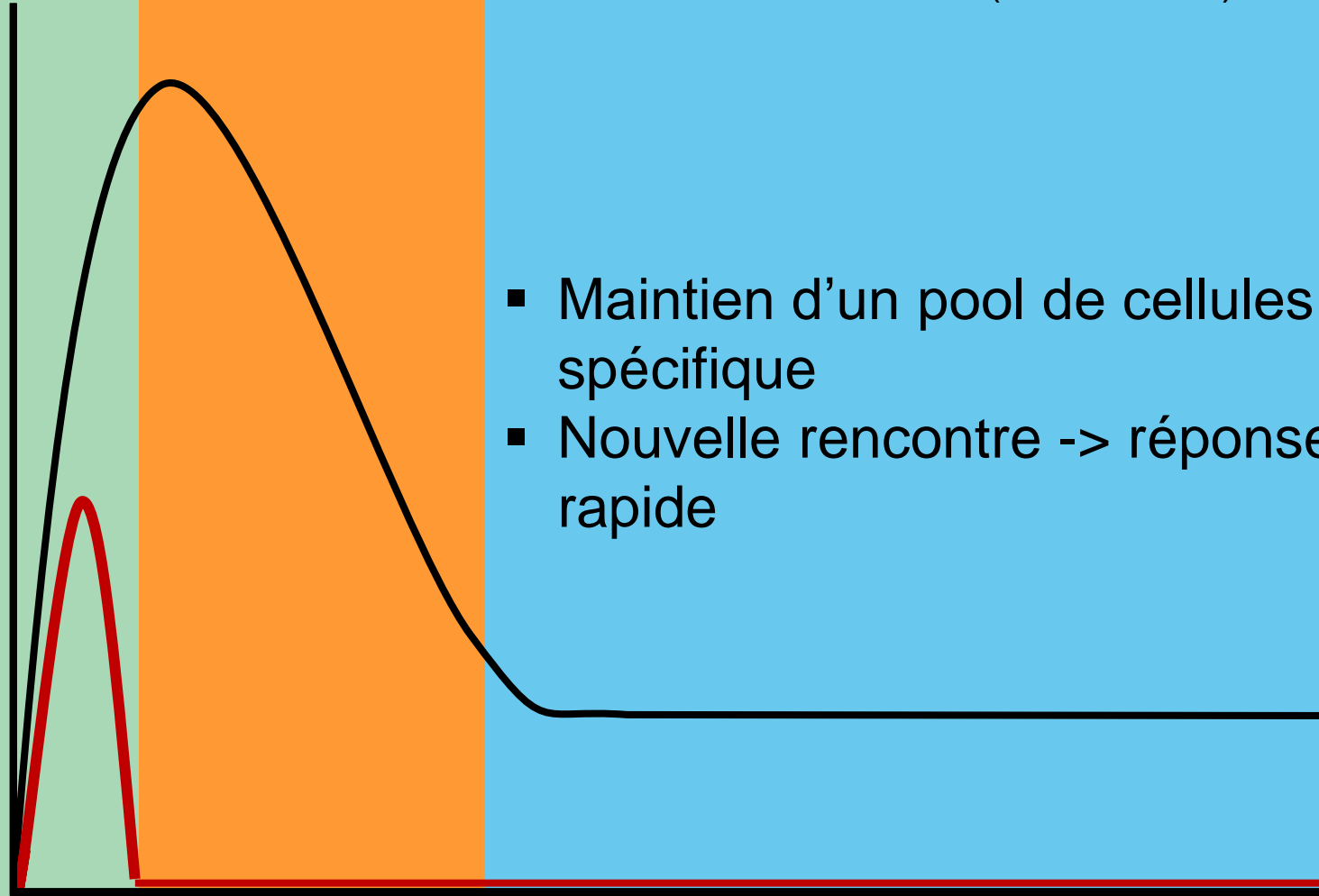
**Mémoire**

(6 semaines)

Lymphocytes T CD8

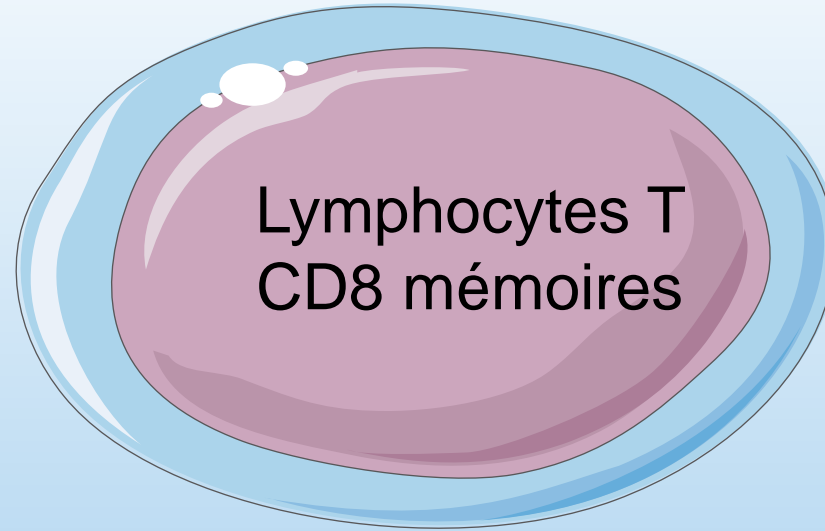


Nombre de cellules



Temps après infection/cancer

# GÉNÉRATION D'UN POOL DE LYMPHOCYTES MÉMOIRES



Intensité du signal TCR

Co stimulation

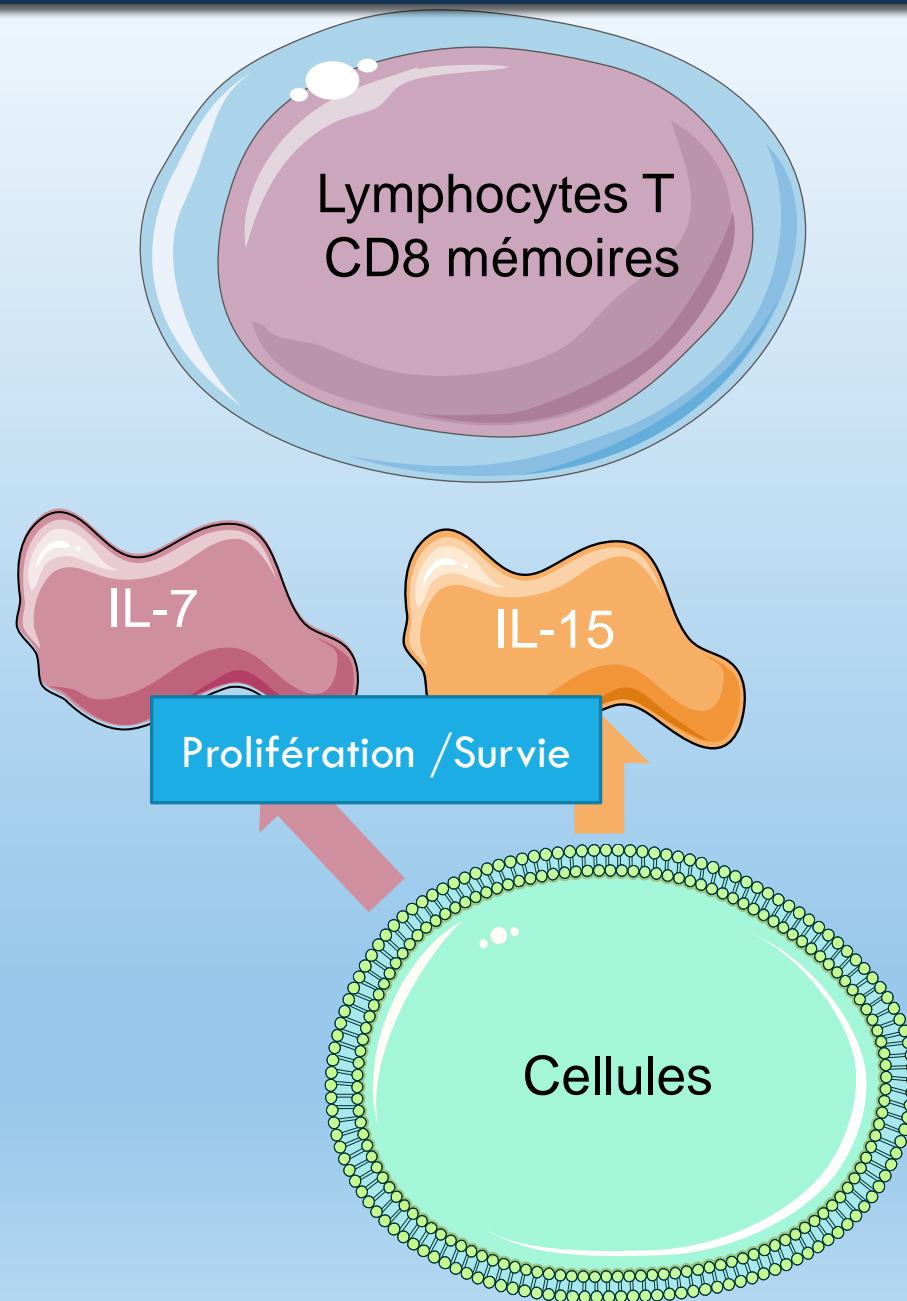
Métabolisme

Cytokines



Tissus préalablement inflammés, organes lymphoïdes secondaires  
(rate, moelle osseuse [MO], ganglions lymphatiques [GG])

# MAINTENANCE D'UN POOL DE LYMPHOCYTES T MÉMOIRES

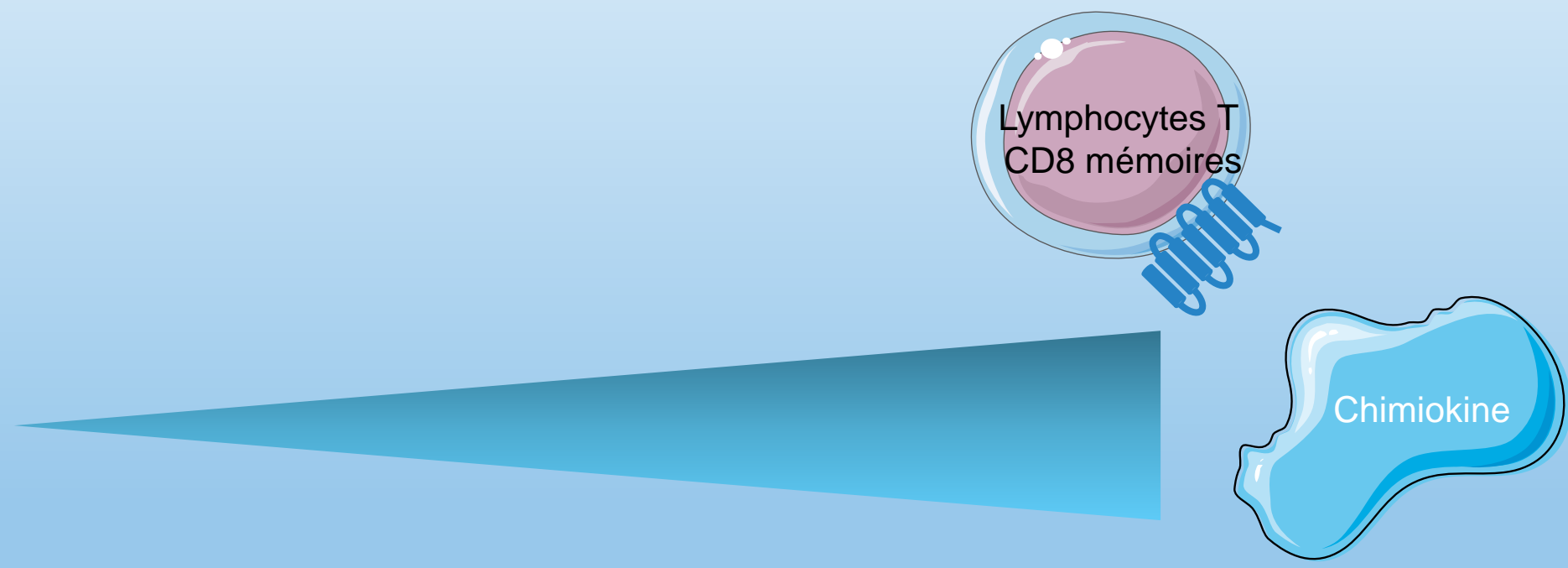


# CHIMIOKINE : PRINCIPE DE FONCTIONNEMENT

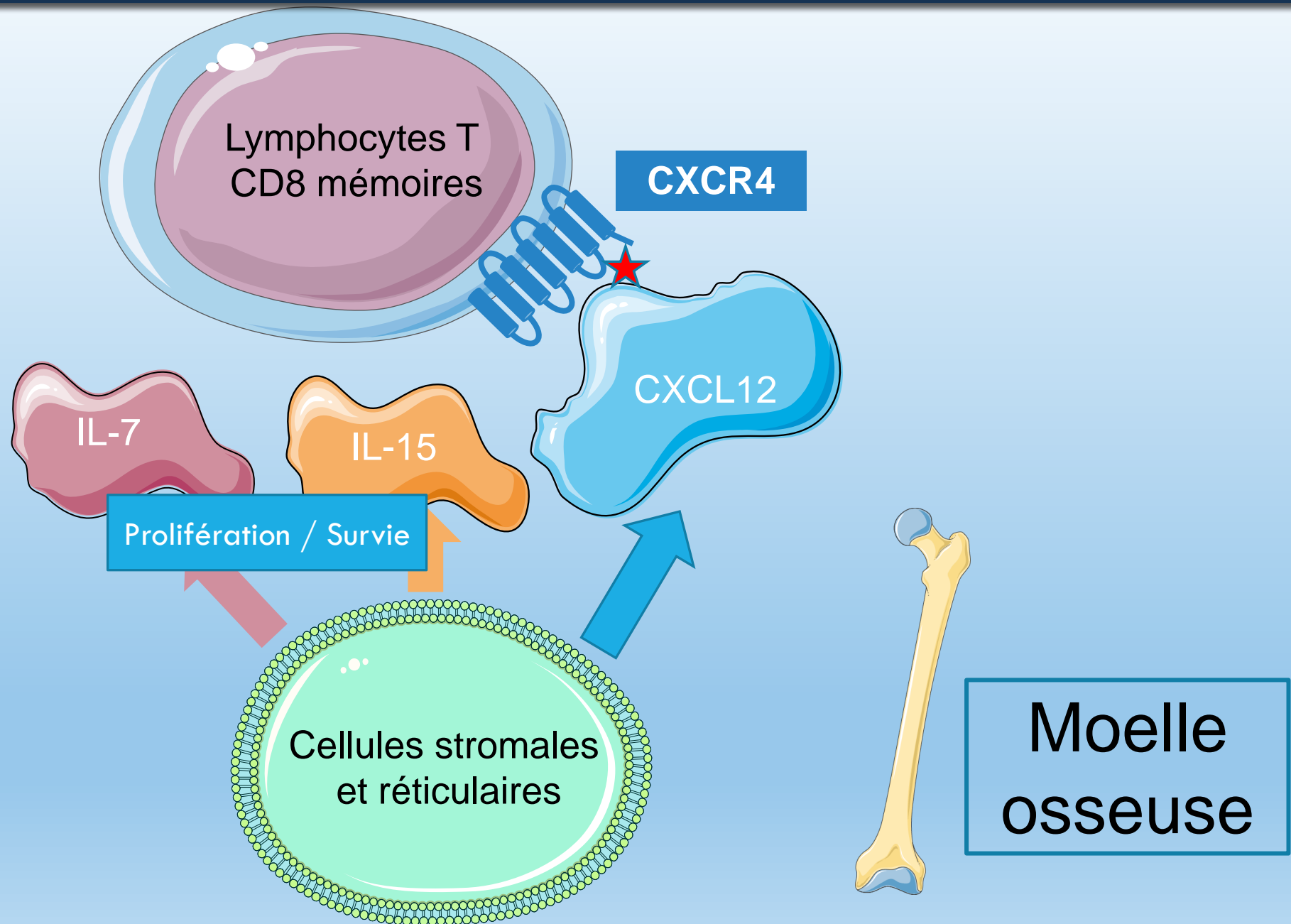




# CHIMIOKINE : PRINCIPE DE FONCTIONNEMENT



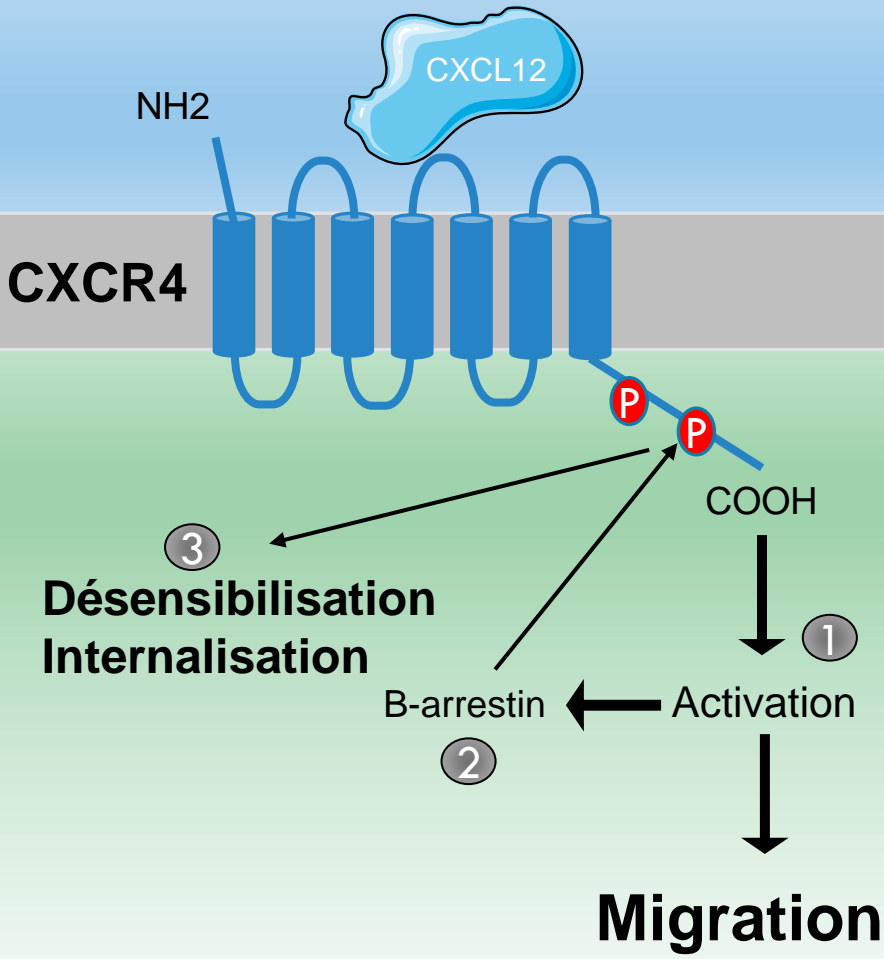
# MAINTENANCE D'UN POOL DE LYMPHOCYTES T MÉMOIRES



Impact de CXCR4 sur la maintenance  
des lymphocytes T CD8 mémoires ?

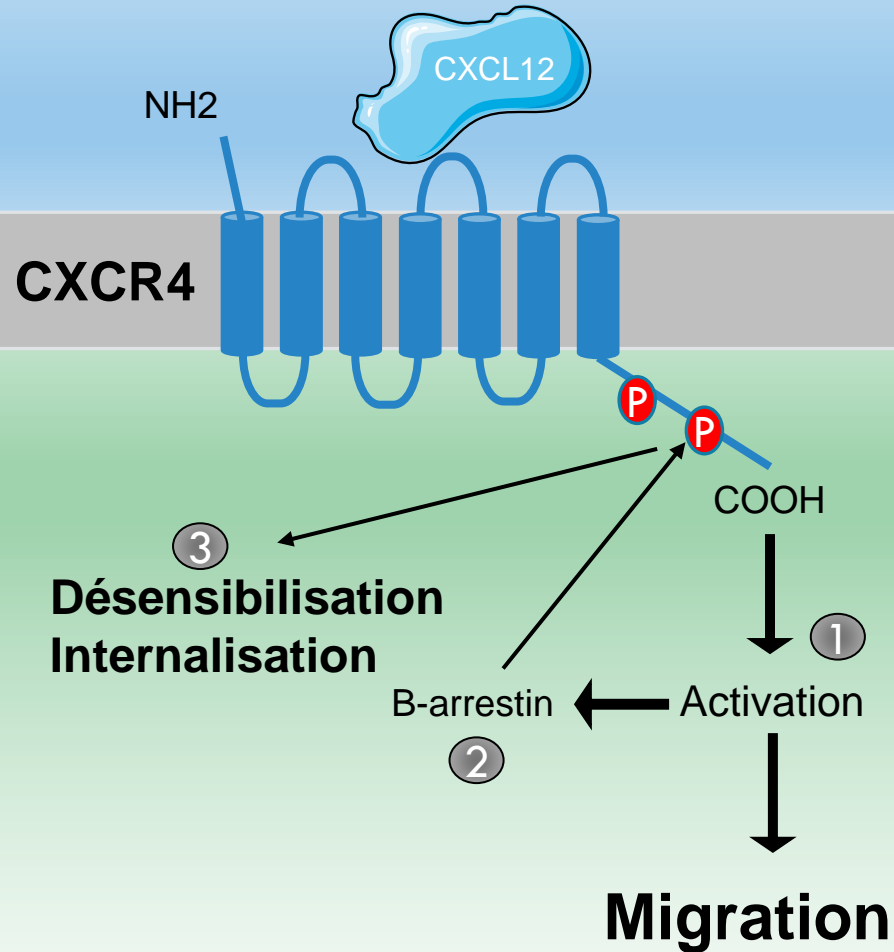
# AXE CXCR4-CXCL12

Normal



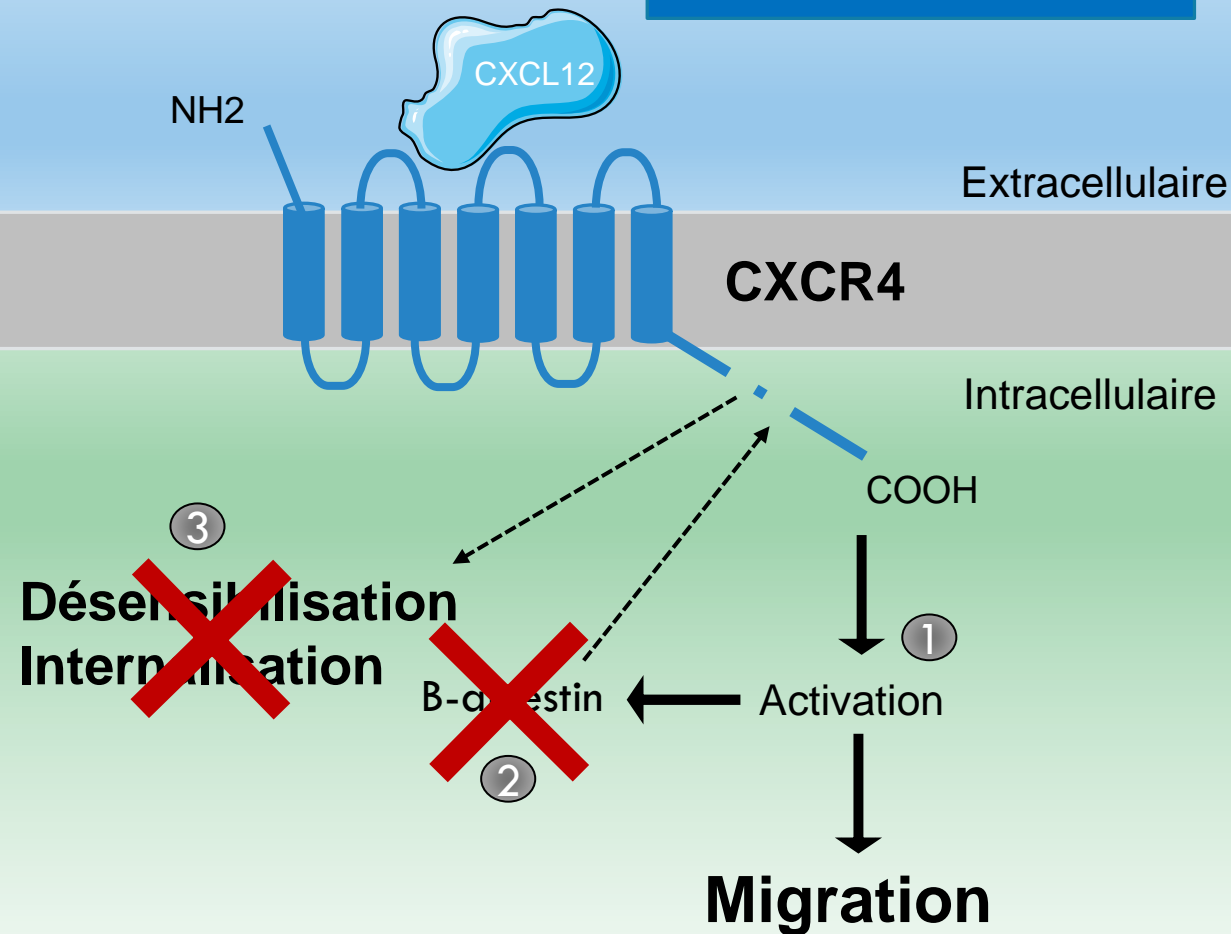
# AXE CXCR4-CXCL12

Normal



Syndrôme WHIM

Warts (Verrue)  
Hypogammaglobulinémie  
Infections bactériennes  
Myelokathesis



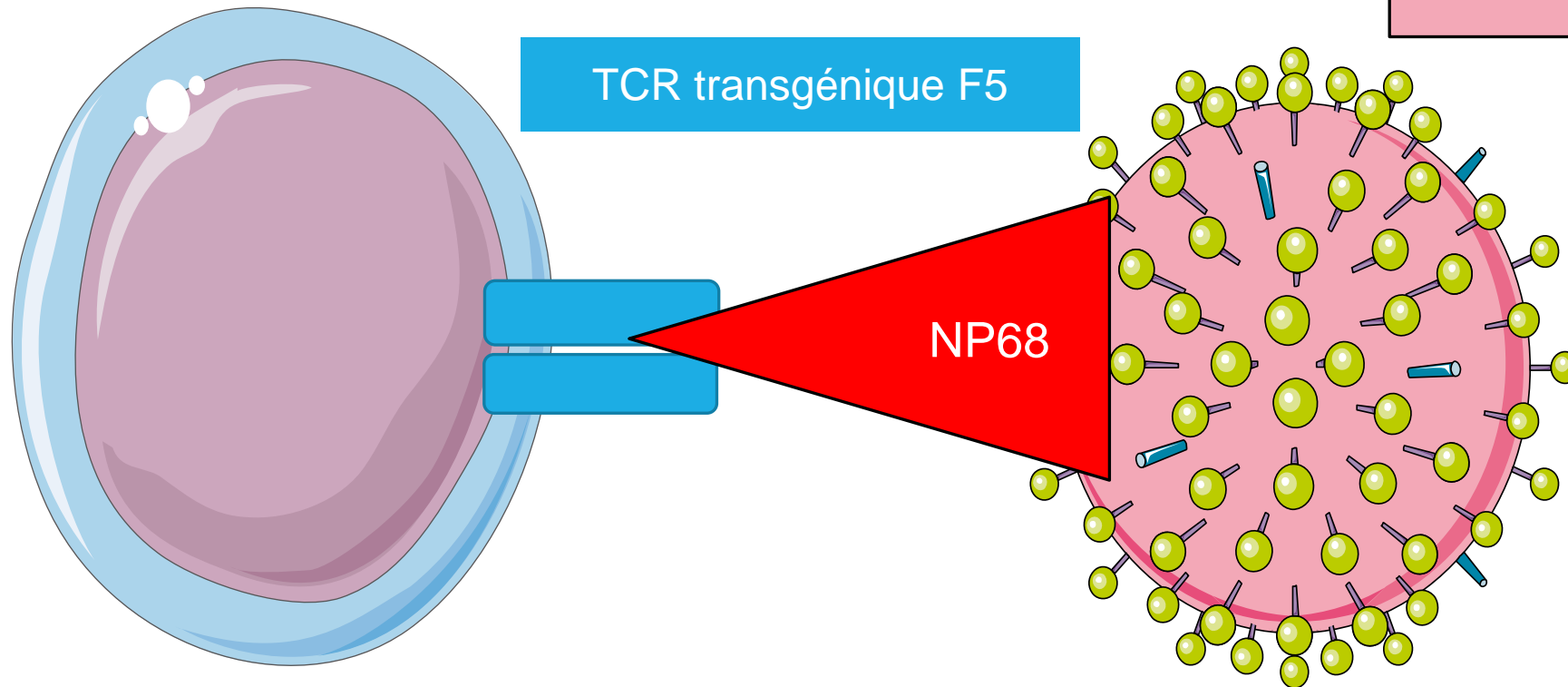
# MODÈLE D'ÉTUDE : INFECTION PAR VIRUS DE LA VACCINE

Lymphocytes T CD8

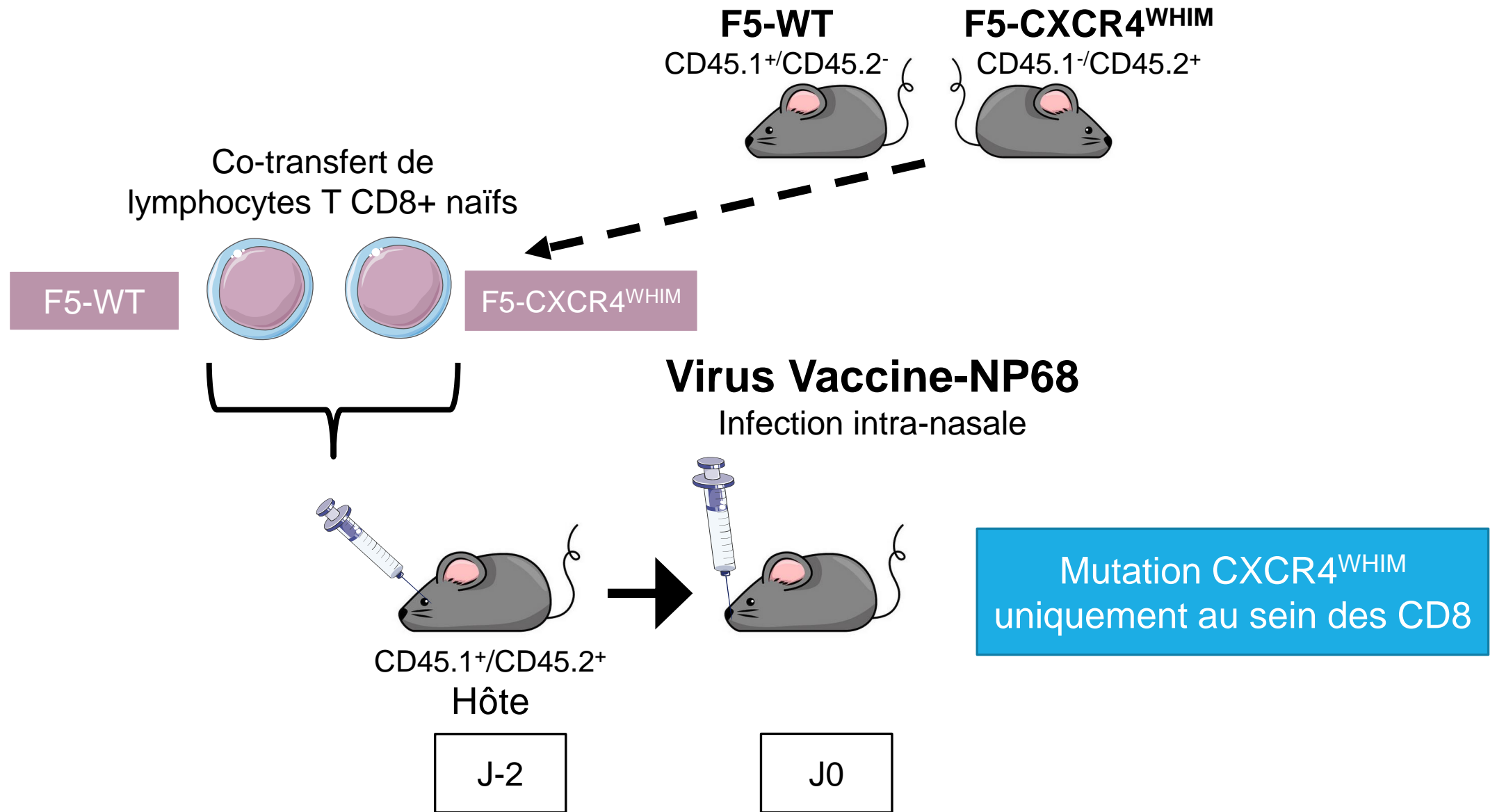
Virus vaccine (VV)

TCR transgénique F5

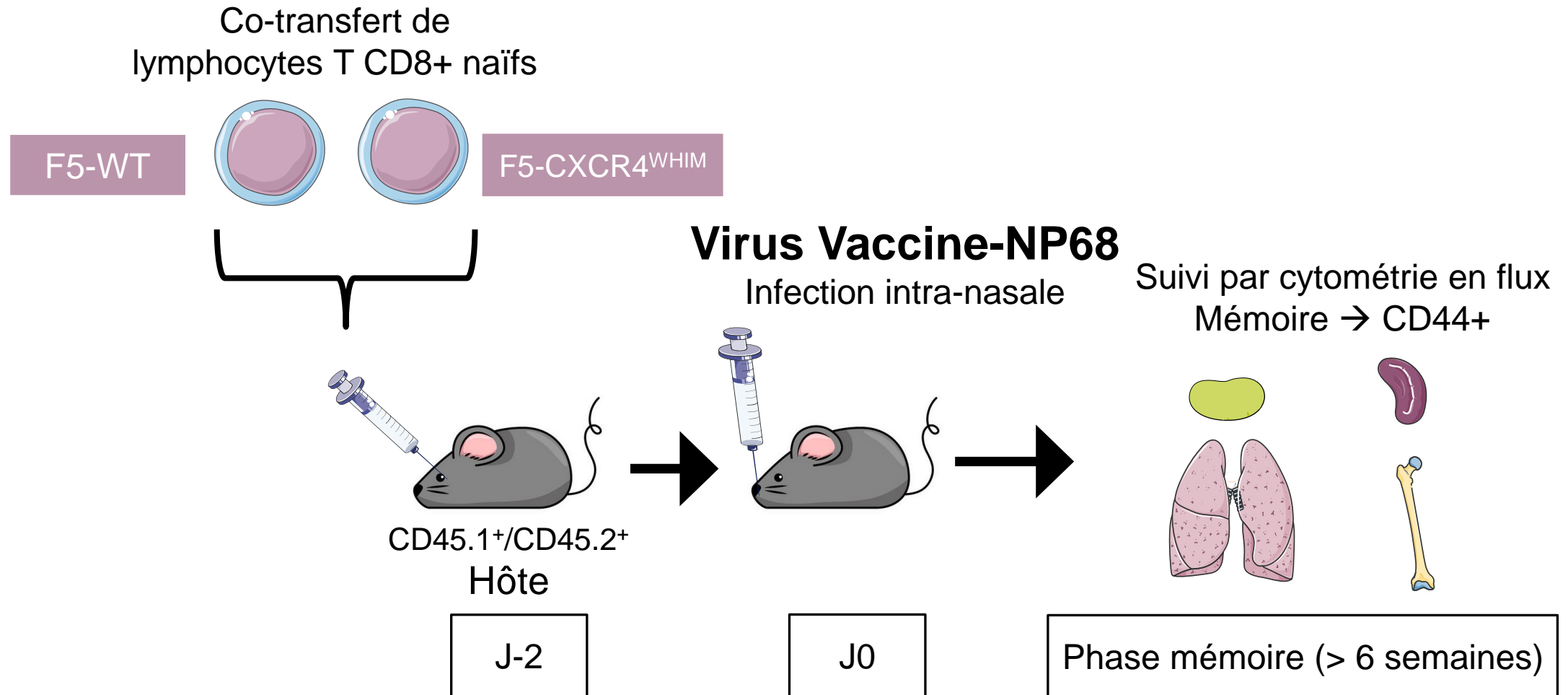
NP68



# MODÈLE D'ÉTUDE : CO-TRANSFERT



# MODÈLE D'ÉTUDE : CO-TRANSFERT

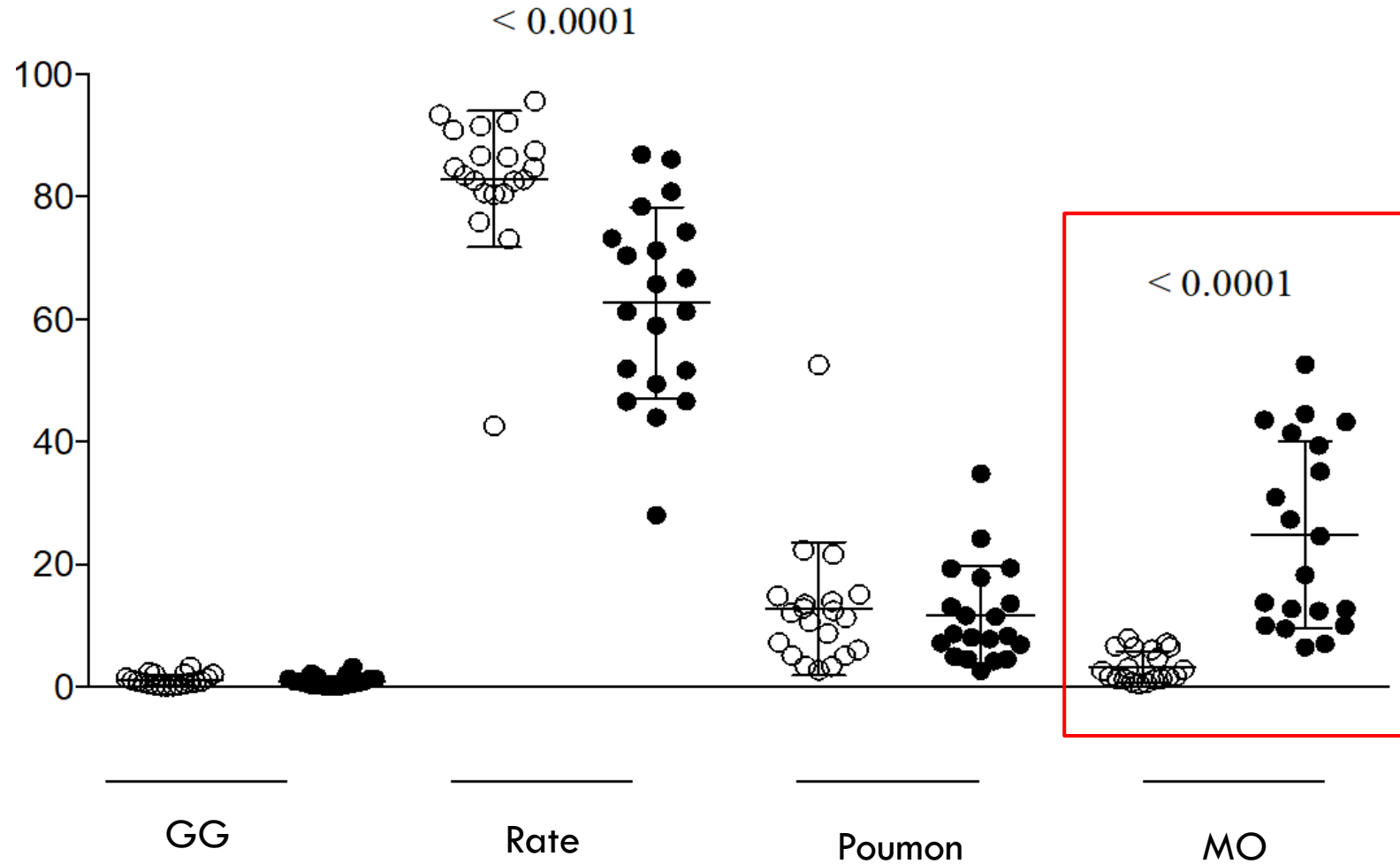




# RÉSULTATS PRÉLIMINAIRES (1)

Répartition des lymphocytes T CD8 F5-WT et F5-CXCR4<sup>WHIM</sup> parmi les F5

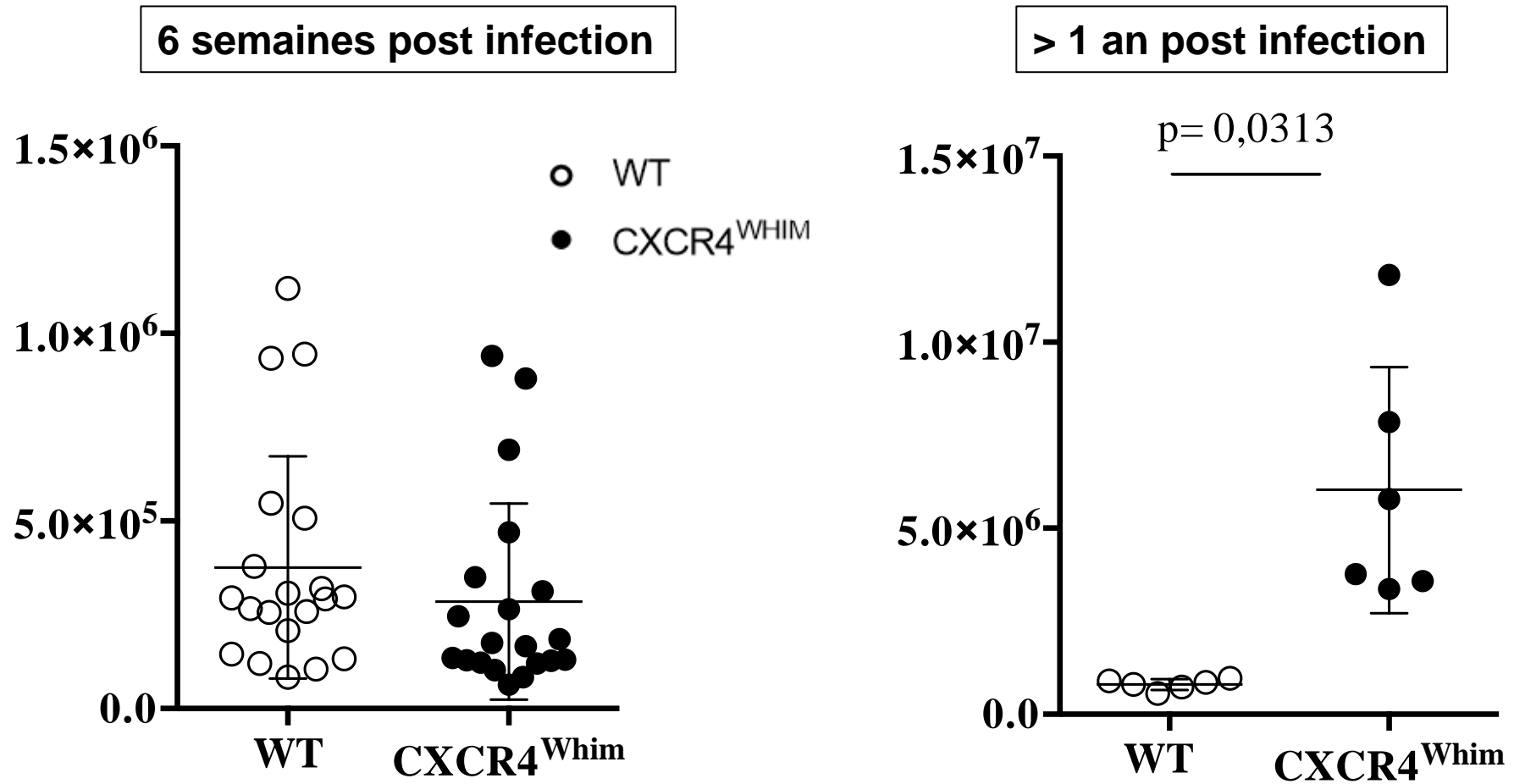
- WT
- CXCR4<sup>WHIM</sup>



Distribution préférentielle dans la moelle osseuse des F5-CXCR4<sup>WHIM</sup>

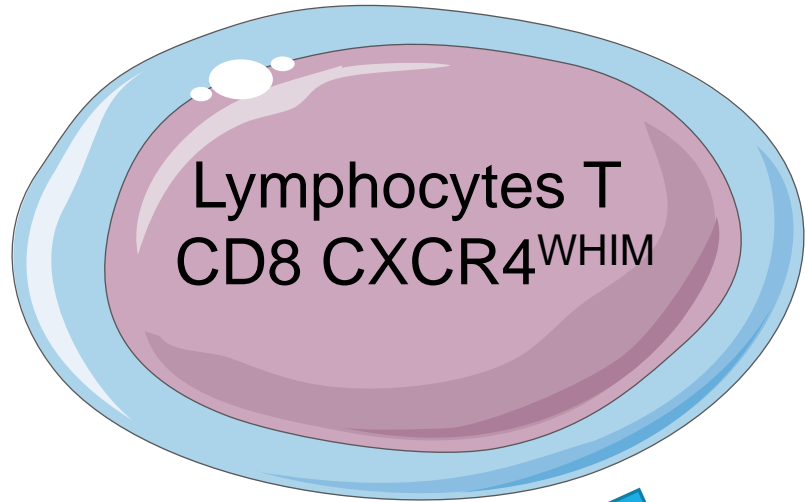
# RÉSULTATS PRÉLIMINAIRES (2)

Nombre absolu de Lymphocytes T F5 CD8+ (*Somme de GG+MO+Rate+Poumon*)



Augmentation F5-CXCR4<sup>WHIM</sup> au cours du temps (MO > sang > rate)

# OBJECTIFS



**Phase mémoire à très long terme  
(> 18 mois)**

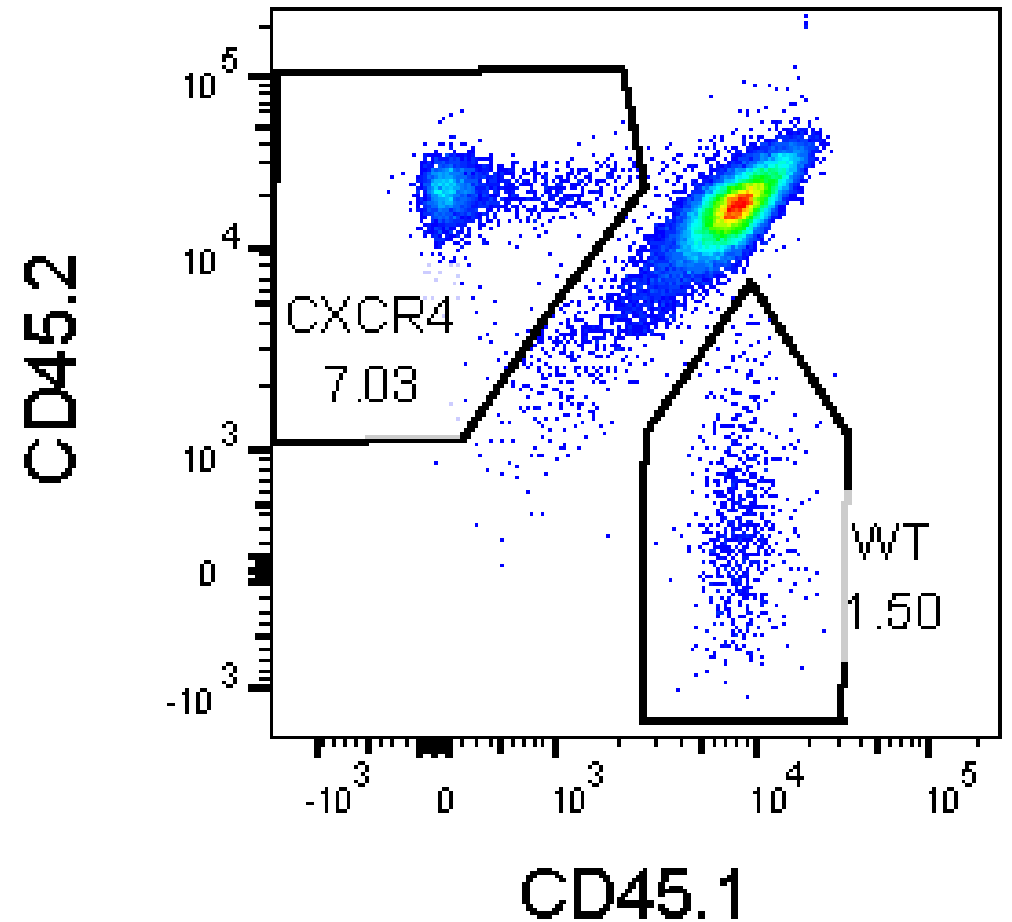
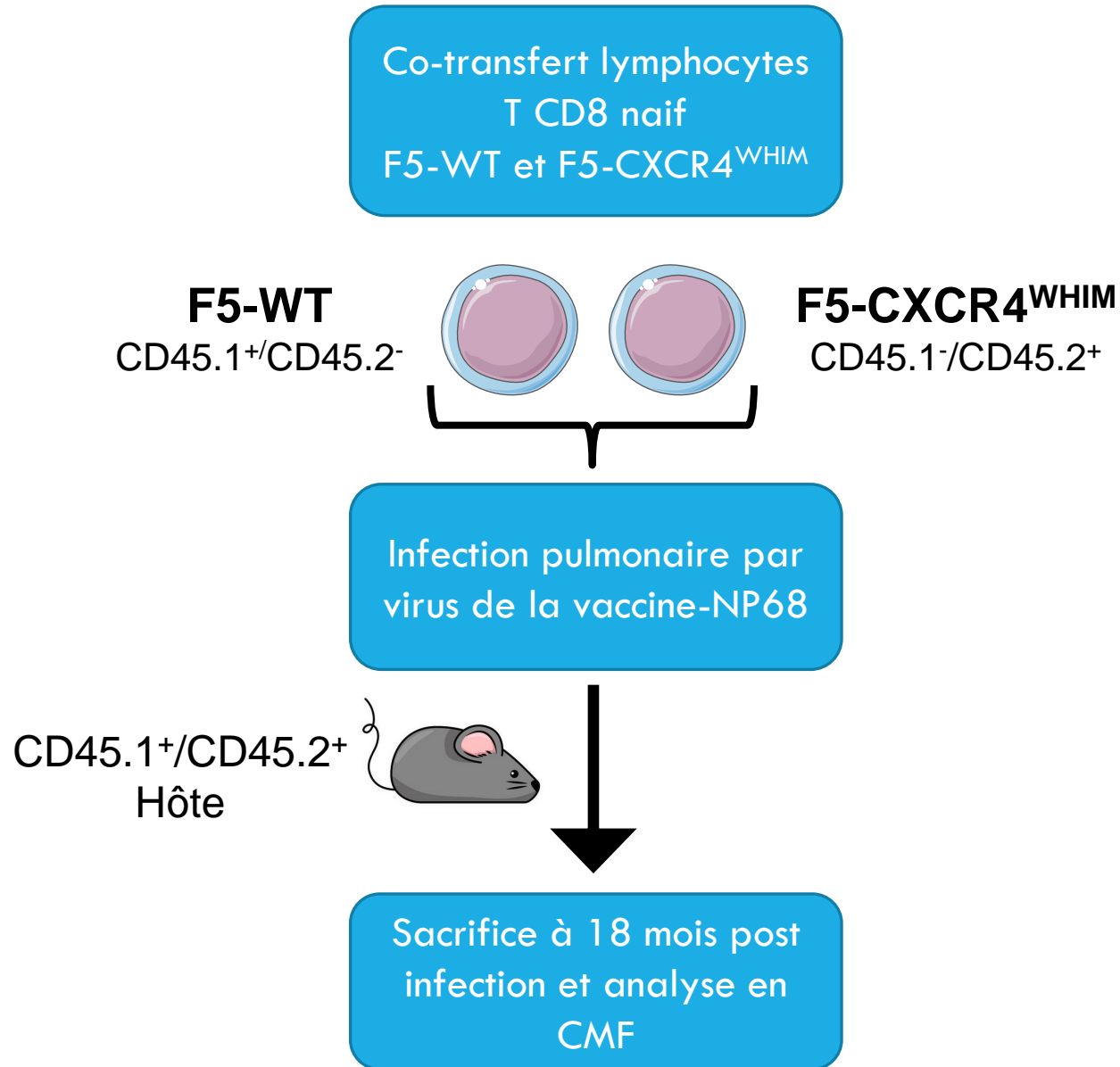


Mécanismes



Application en immunothérapie : CAR T Cells

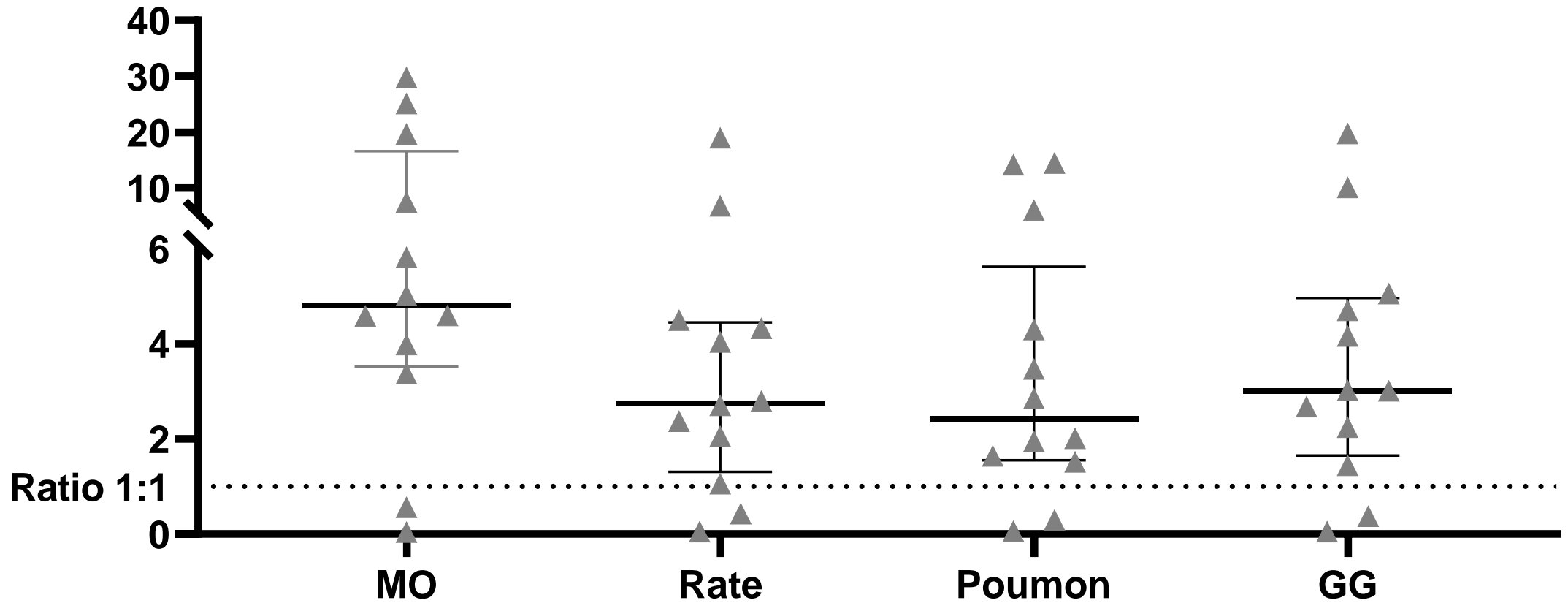
# GATING EN CYTOMÉTRIE EN FLUX (CMF)





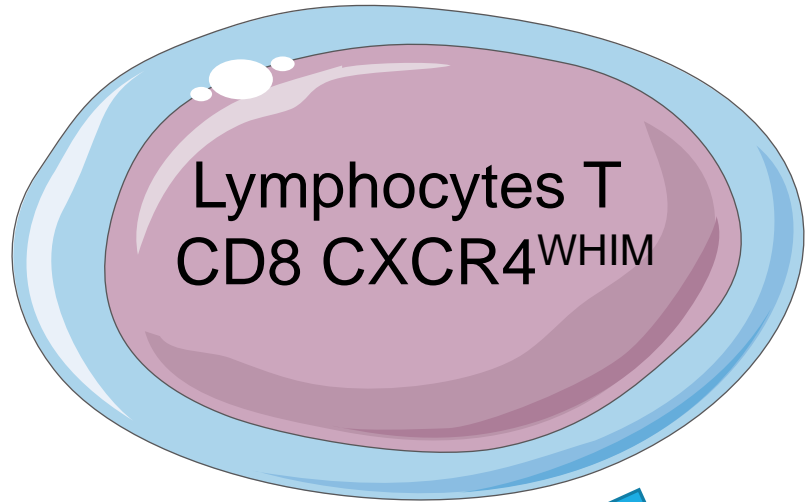
# ANALYSE PAR ORGANE

Ratio : Nombre de lymphocytes F5 T CD8 mémoires CXCR4<sup>WHIM</sup> / WT



Lymphocytes T CD8+ CD44+ CXCR4<sup>WHIM</sup> > WT dans les organes  
MO -> localisation préférentielle

# OBJECTIFS



**Phase mémoire à très long  
terme (> 18 mois)**

**Mécanismes :**  
Prolifération et Survie

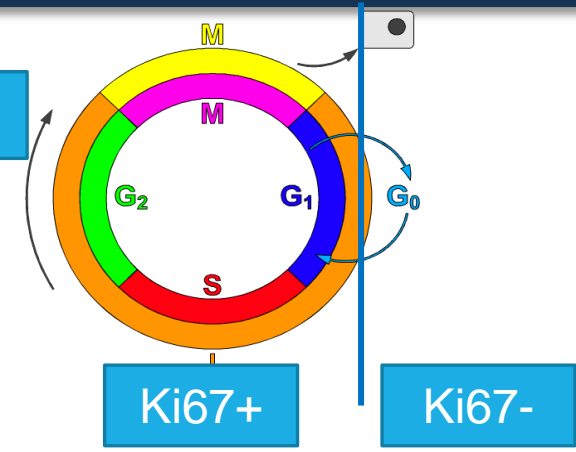
**Application en immunothérapie : CAR T Cells**

# KI67 : ANALYSE DE PROLIFÉRATION

Organes

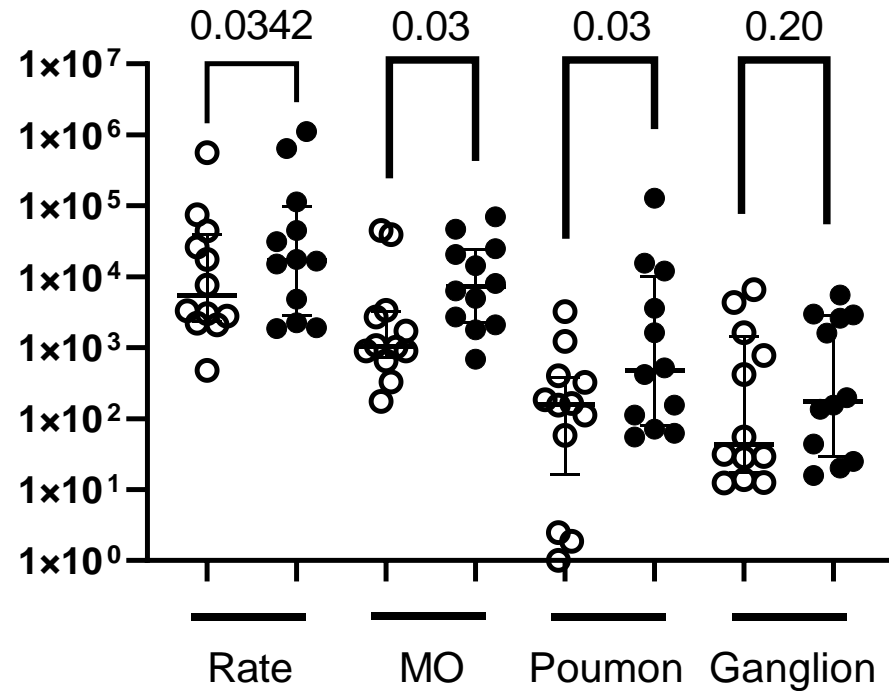
Analyse ex-vivo

Ki67 : marqueur de cellule en cycle (cytométrie en flux)



Pas de différence de % de prolifération

Nombre de lymphocytes T F5 CD8+ CD44+ en cycle



○ WT  
● CXCR4<sup>WHIM</sup>

Nombre de F5-CXCR4<sup>WHIM</sup> en cycle > F5-WT  
→ accumulation au long cours ?

N=12 , Expériences indépendantes = 3



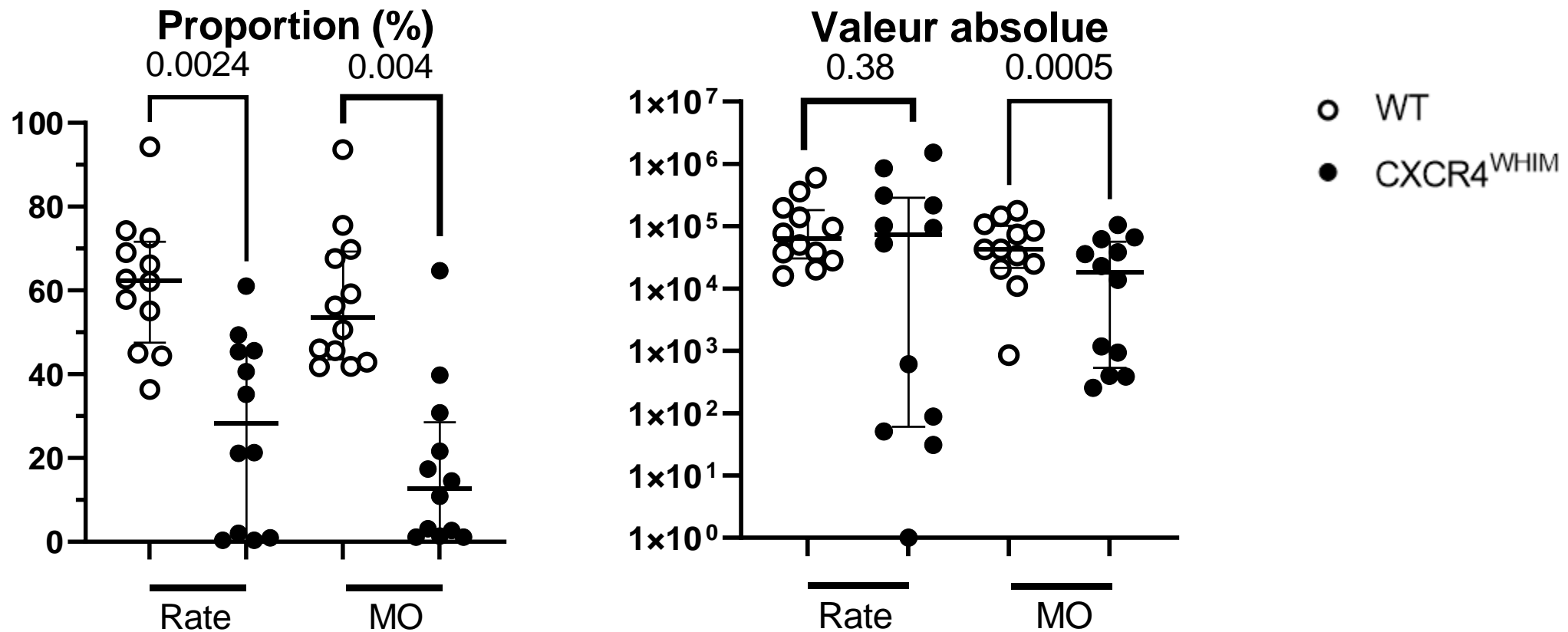
# CAPACITÉ DE SURVIE

Rate MO

Culture 2 jours

Mortalité sur marqueur de viabilité

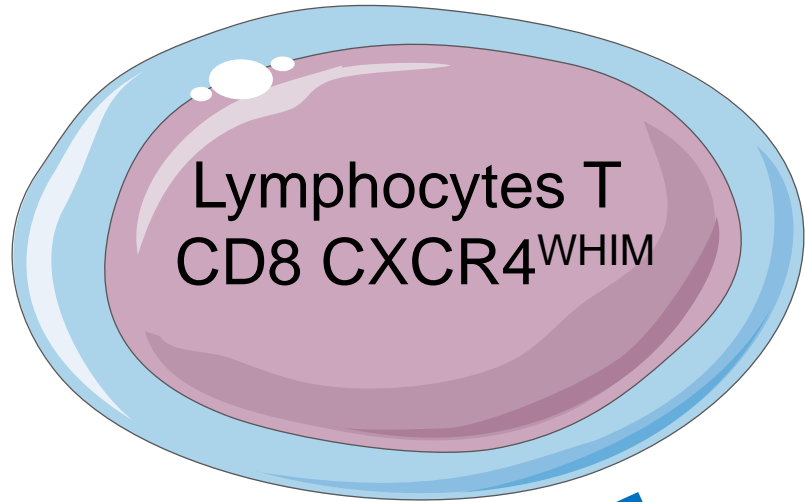
## Mortalité lymphocytes T F5 CD8+ CD44+



Avantage de survie pour F5-CXCR4<sup>WHIM</sup>

N=12 , Expériences indépendantes = 3

# OBJECTIFS



Phase mémoire à très long  
terme (> 18 mois)



Mécanismes

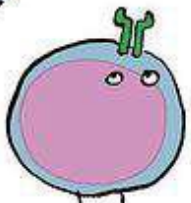


Application en immunothérapie : CAR T Cells

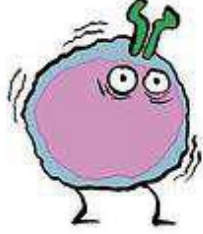
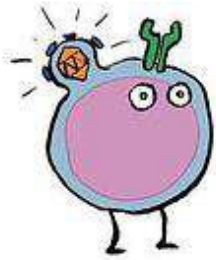
# L'AVÈNEMENT DES CAR T CELLS

Expression d'un récepteur Chimérique = CAR

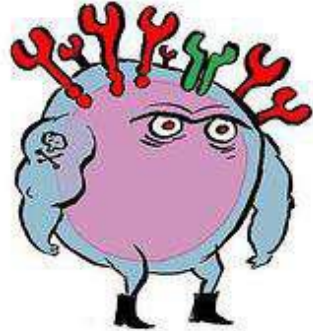
retroviral vector



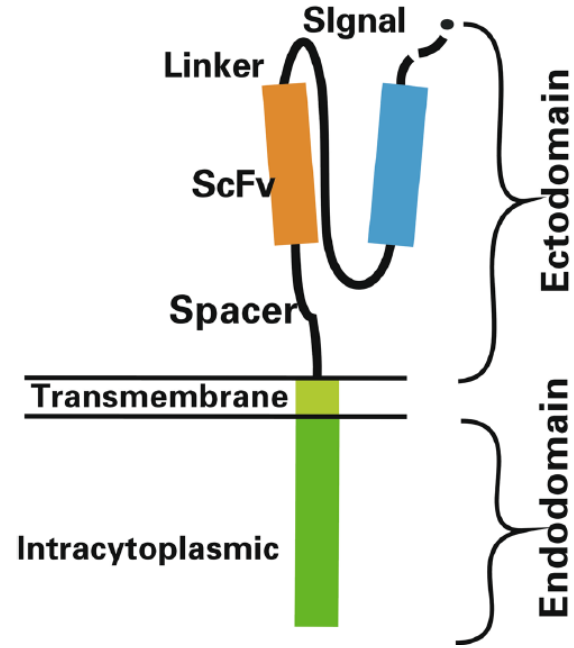
T-cell



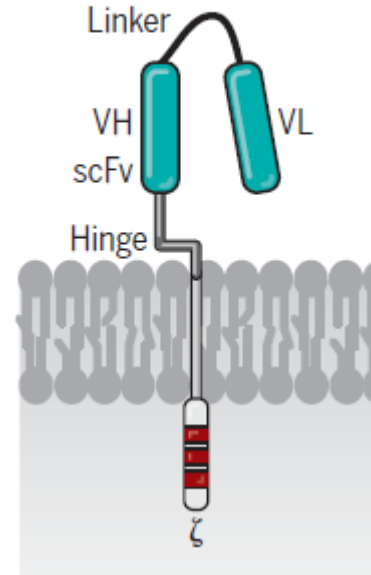
Chimeric Antigen Receptor



CAR-T cell



First generation CAR



Second generation CAR



CD28 or 4-1BB



The NEW ENGLAND  
JOURNAL of MEDICINE

## Tragedy, Perseverance, and Chance — The Story of CAR-T Therapy

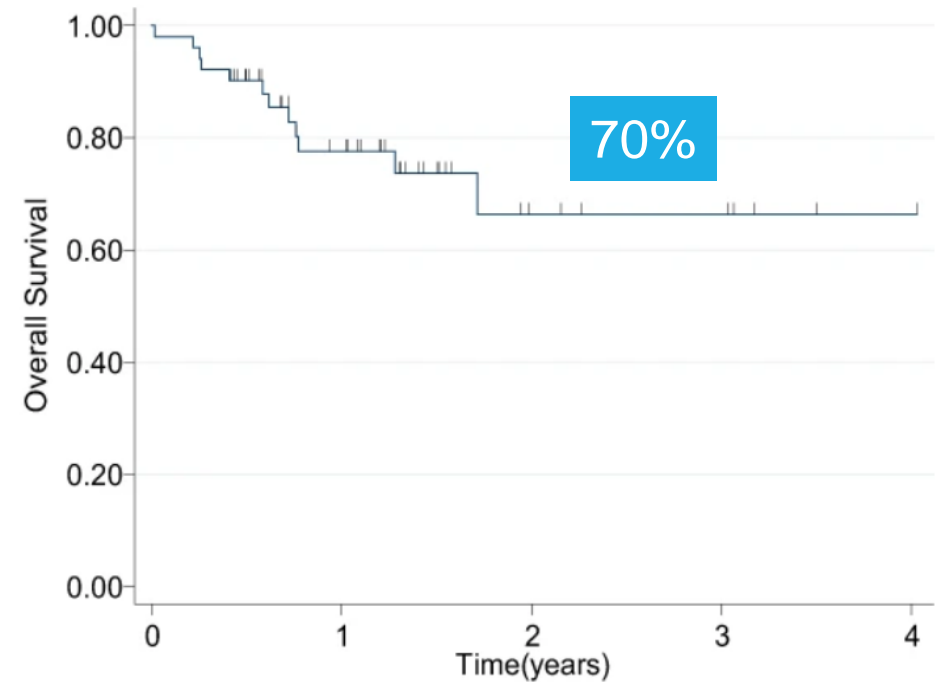
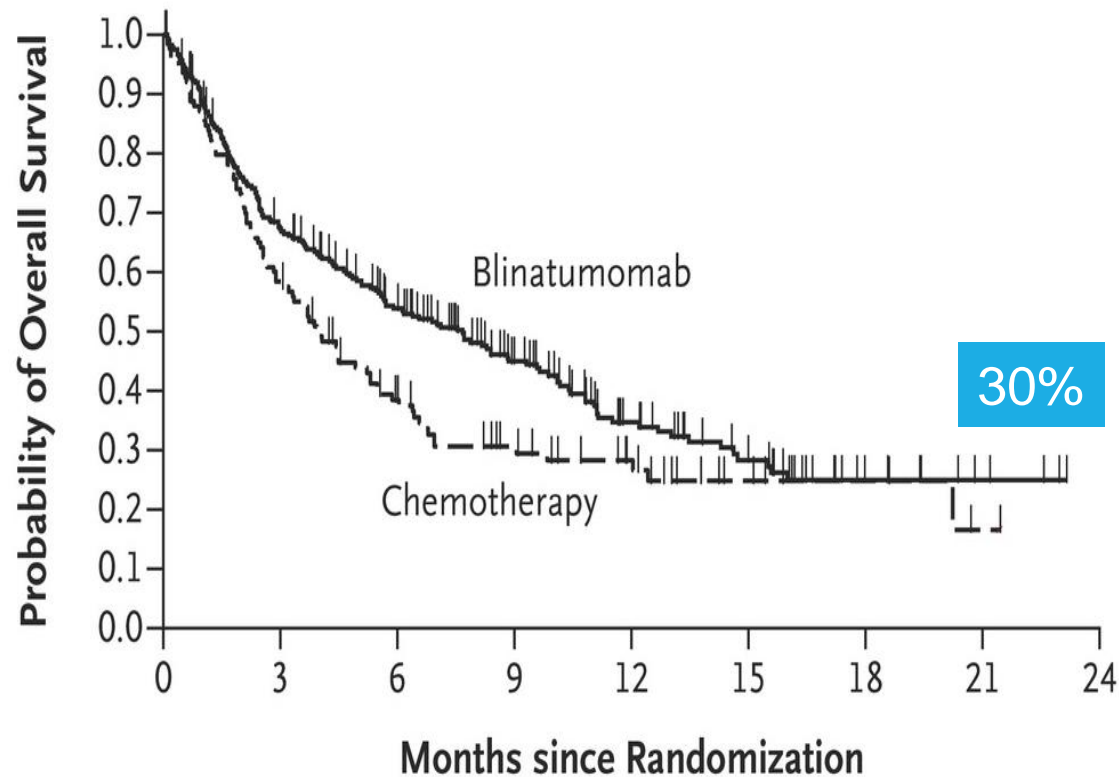
Lisa Rosenbaum, M.D.

# EFFICACITÉ DANS LA LEUCÉMIE AIGUE LYMPHOBLASTIQUE B MAIS...

Avant CAR T CELLS

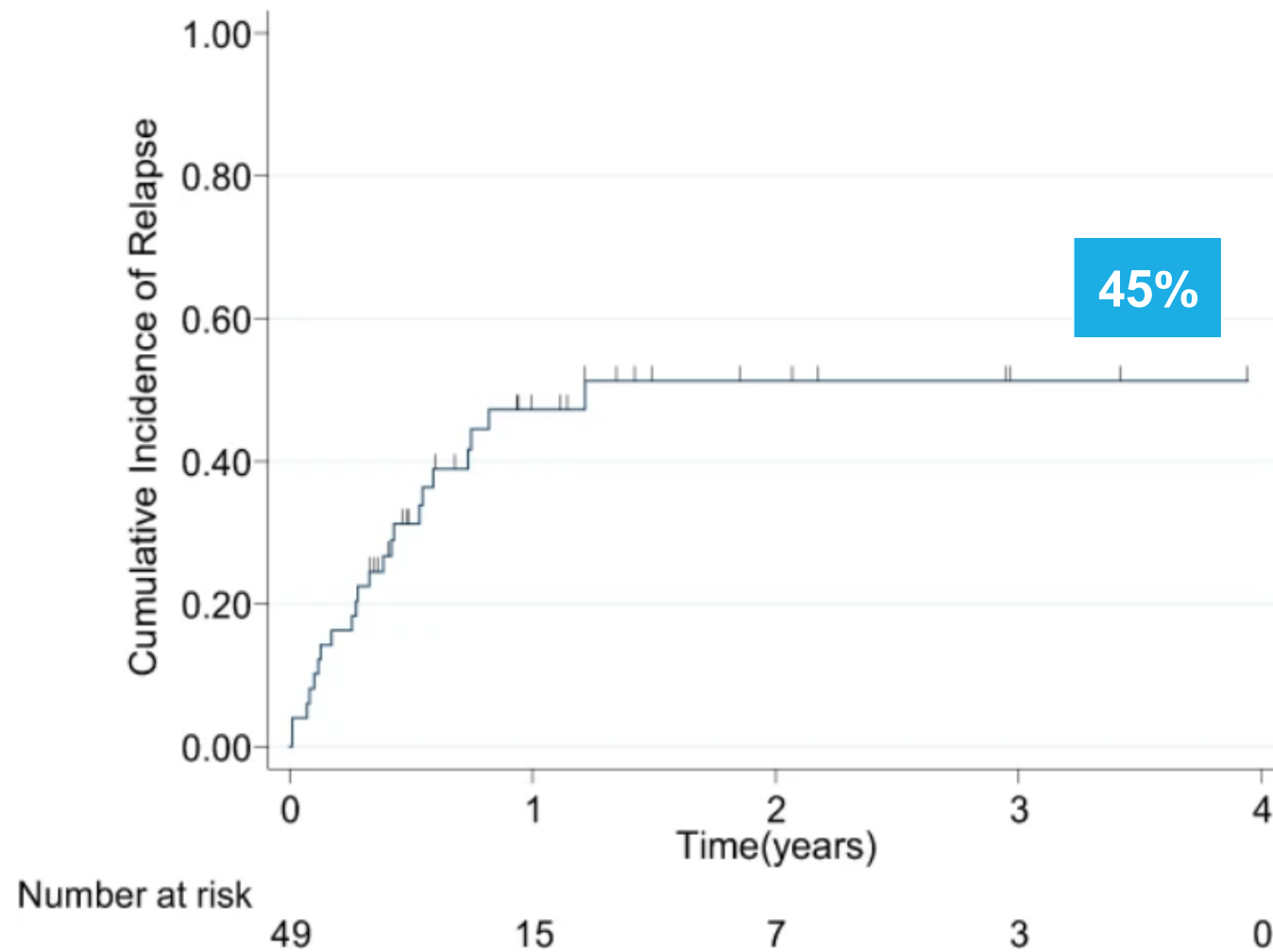
Avec CAR T CELLS de 2<sup>ème</sup> génération anti-CD19

## Survie globale



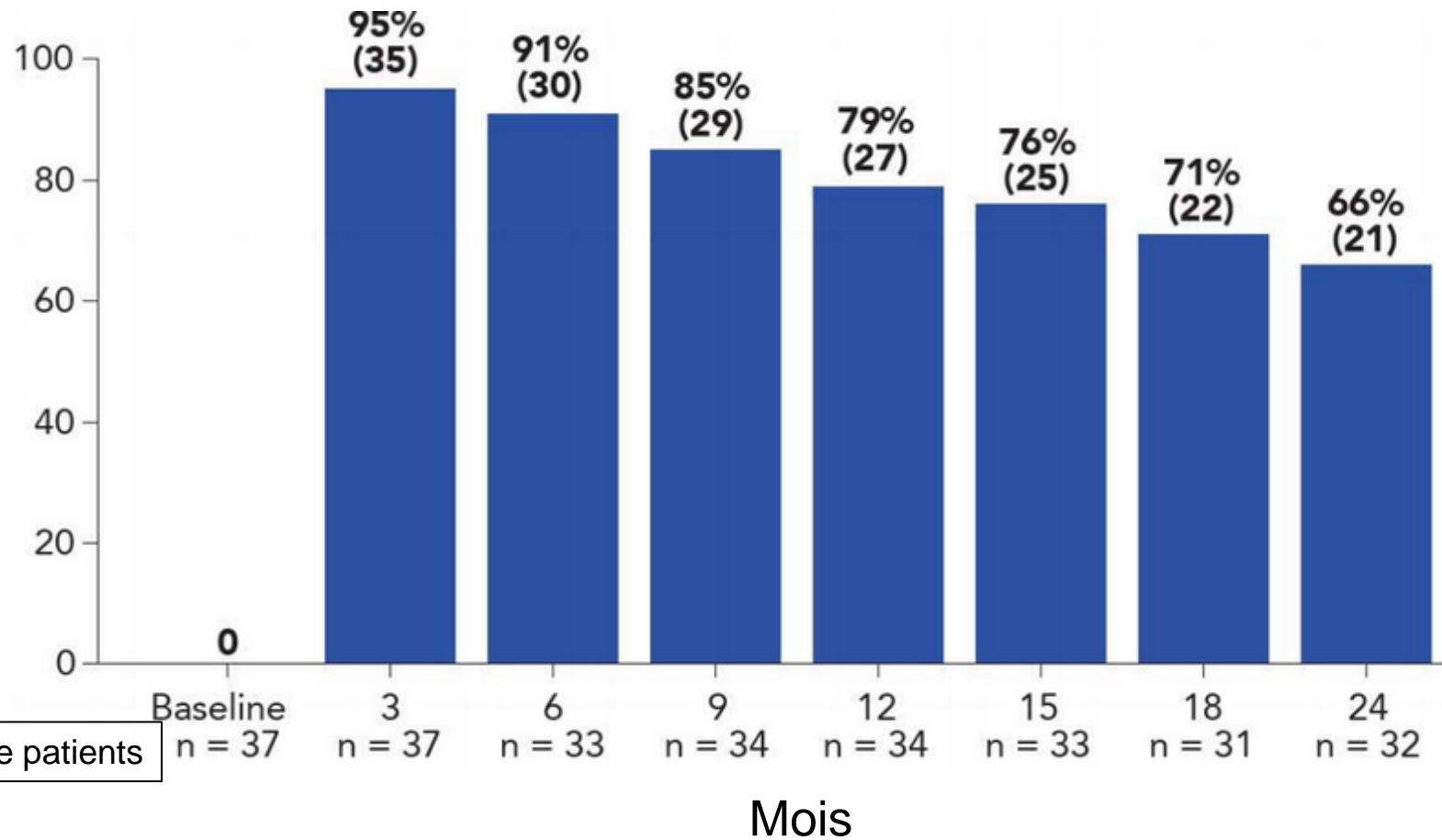
# ...MAIS PRÉSENCE DE RECHUTE

## Incidence cumulée de rechute



# DÉFAUT DE PERSISTANCE DES CAR T CELLS

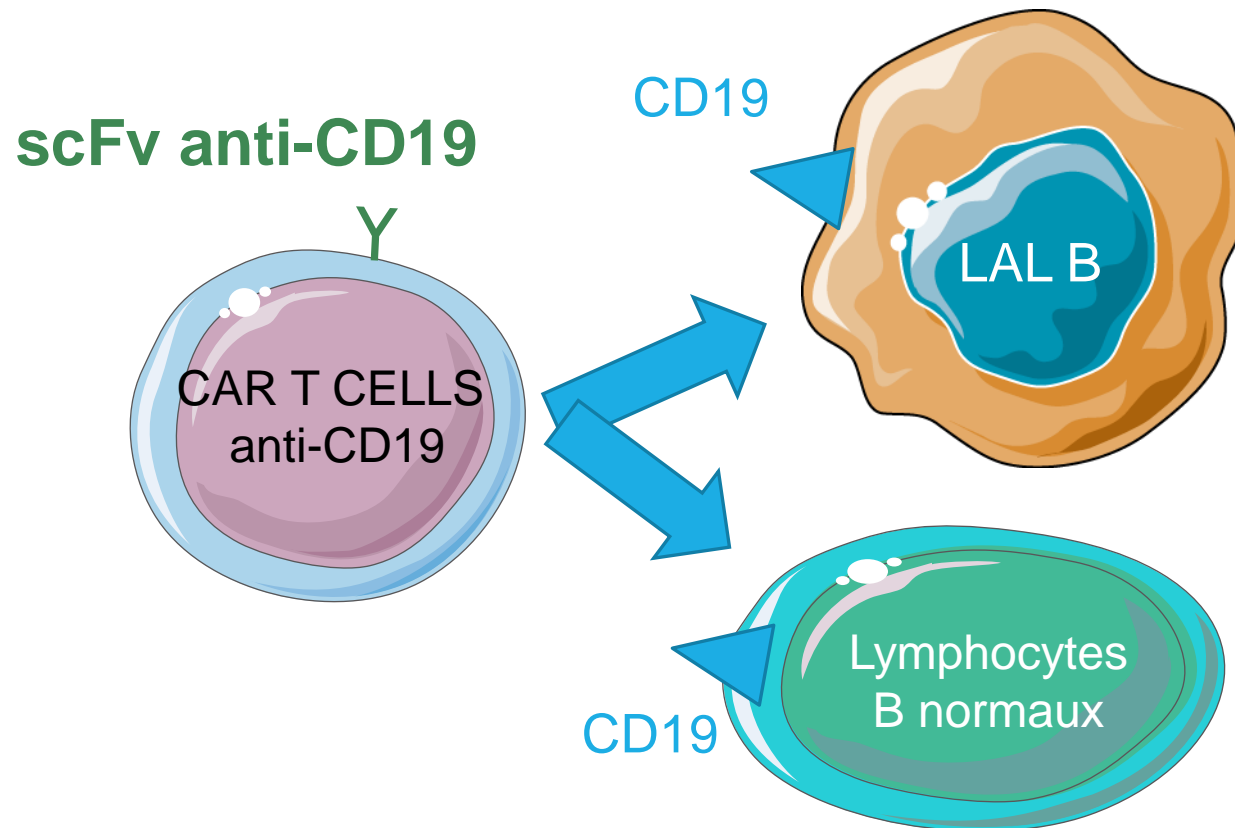
% (nombre) de patients avec CAR T CELLS détectables dans le sang



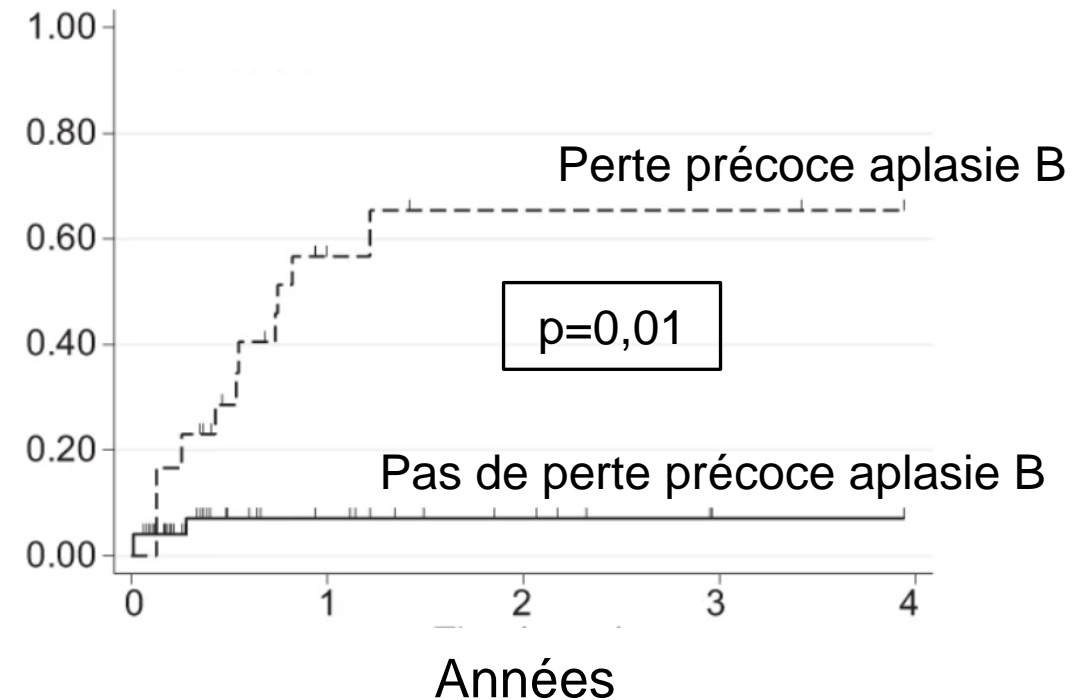
Nombre total de patients

# RECHUTE DES CAR T CELLS

Perte d'aplasie B :  
effet off-tumor on-target des CAR T CELLS anti-CD19 et reflet de la persistance des CAR T Cells



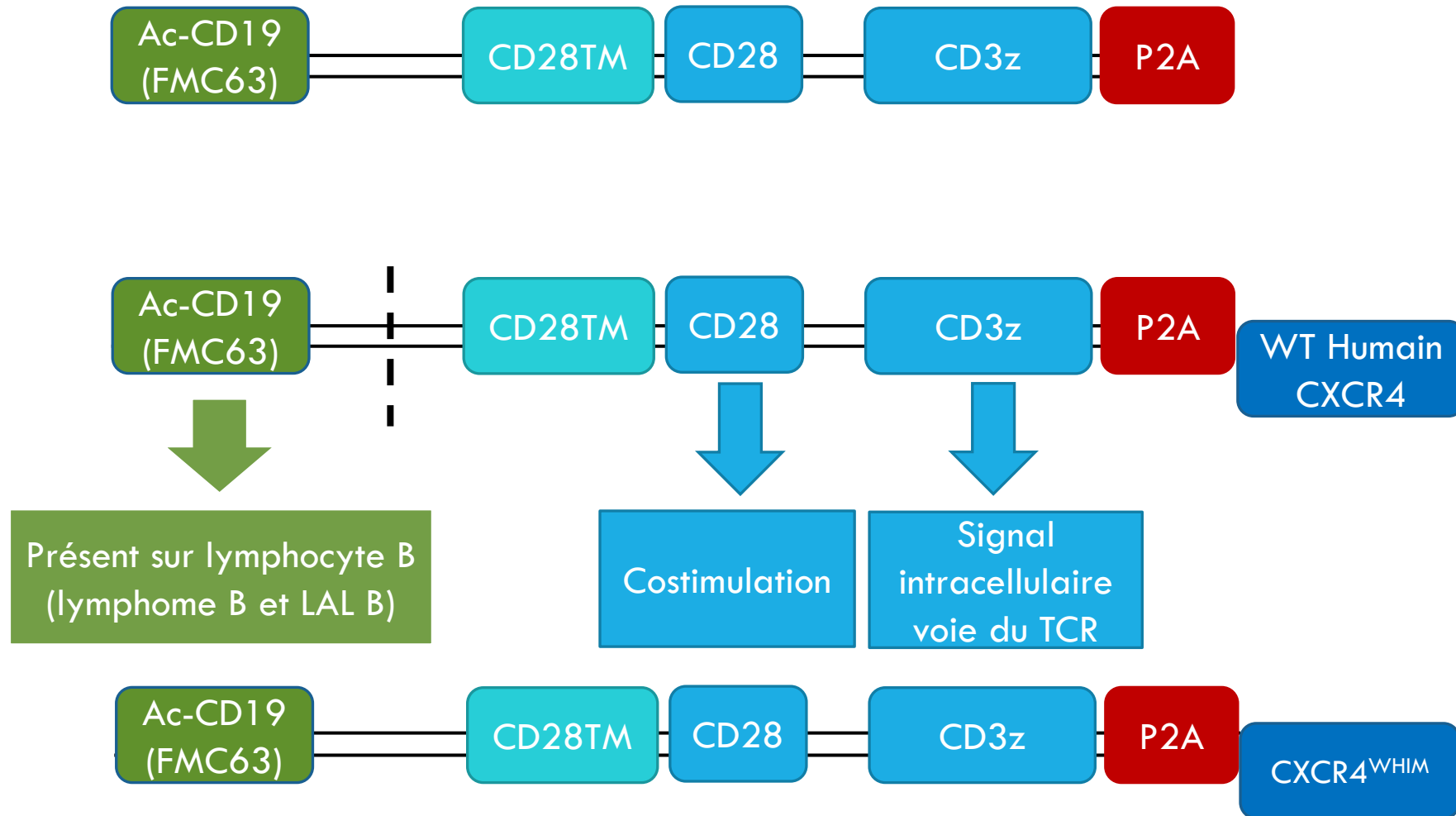
Incidence cumulée de rechute CD19+



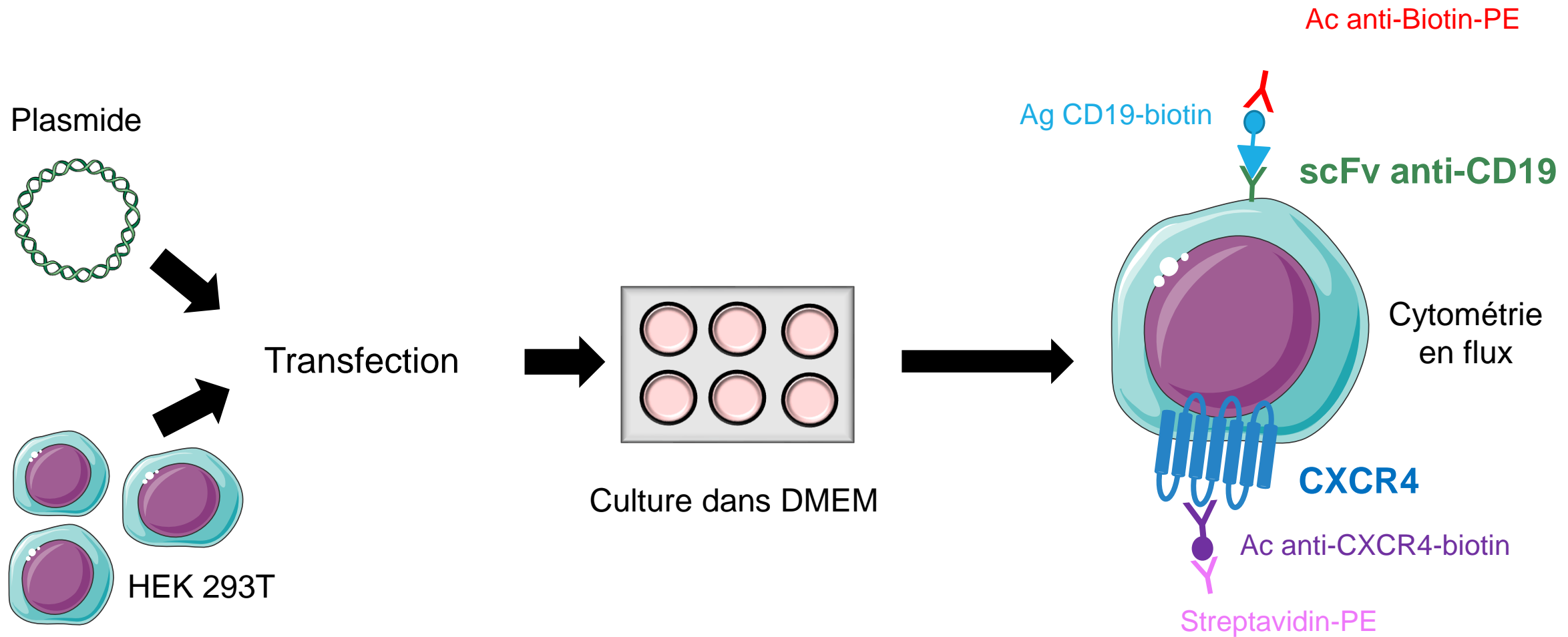
Comment améliorer la persistance des CAR T CELLS ?



# APPLICATION EN IMMUNOTHÉRAPIE



# EXPÉRIENCE DE TRANSFECTION

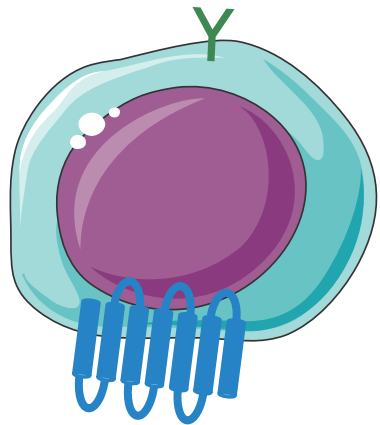


# EXPÉRIENCE DE TRANSFECTION

scFv anti-CD19



Count

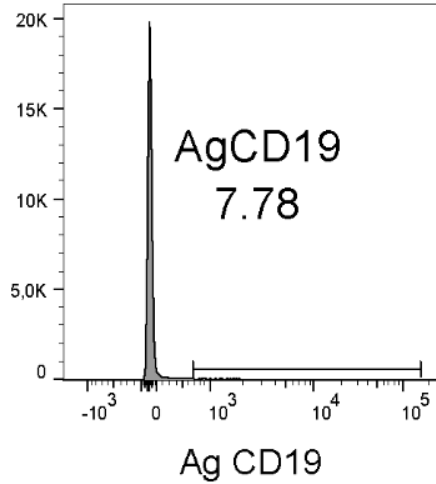


CXCR4

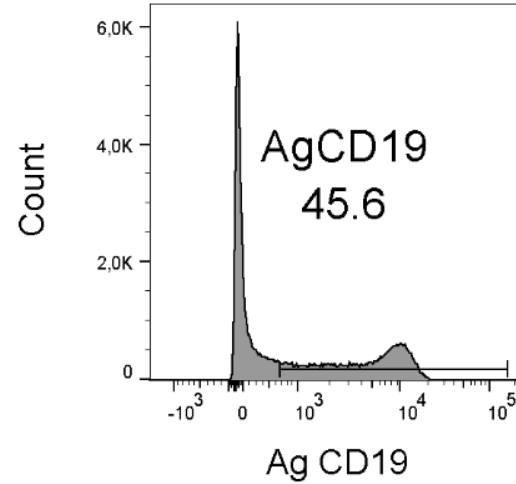


Count

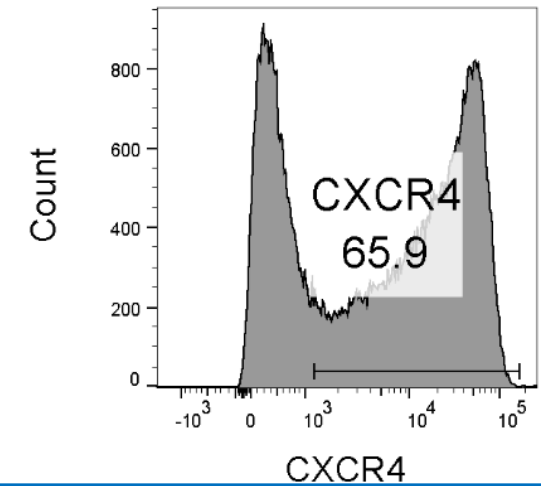
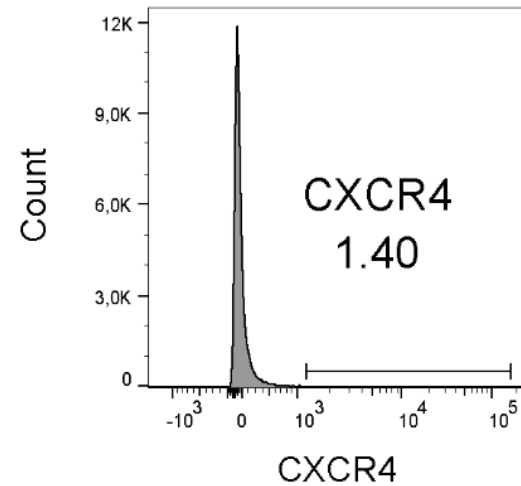
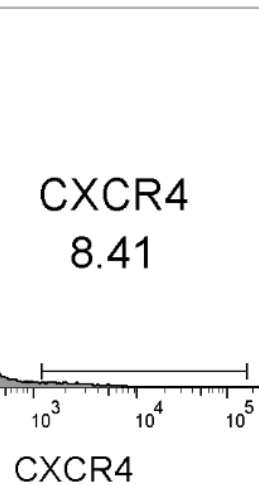
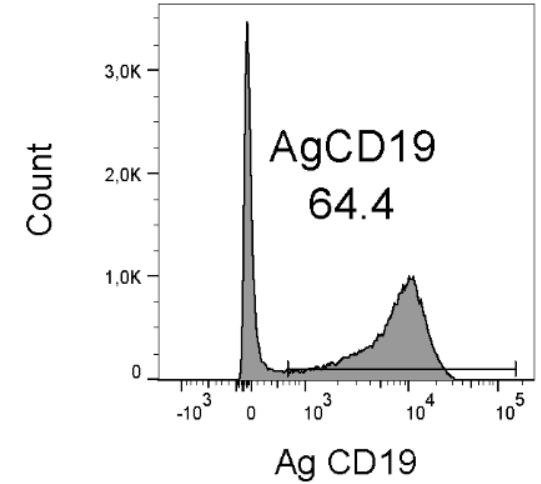
Vide



CAR



CAR + CXCR4



# CONCLUSION

Phase mémoire à très long terme :

- Pool de lymphocytes T CD8 mémoires avec la mutation CXCR4<sup>WHIM</sup> supérieur au pool de WT

Mécanismes potentiels :

- Capacité de survie augmentée
- Pas de différence de proportion de prolifération
- Plus grande nombre de cellules en cycle

Début de production d'un modèle de CAR T CELLS :

- Validation des plasmides
- Capacité de transfection

# PERSPECTIVES

Ki 67 + DNA staining (prolifération), Tunnel assay (survie)

Co-transfert dans modèles tumoraux (murins)

CAR T CELLS → lymphome (collaboration Dr Saitaki et Dr Amigorena)

# MERCI DE VOTRE ATTENTION



**Inserm**

Institut national  
de la santé et de la recherche médicale



Centre  
International  
de Recherche  
en Infectiologie

**Dr Mélanie Wencker**

**Equipe du Dr Jacqueline Marvel :**

Severine Valsesia, Sophia Djebali, Dr Mathilde Calvez, Daphné Laubretton, Candice Sakref, Lyvia Moudombi, Olivia Taty, Dr Yann Leverrier

**Dr Emiliano Ricci, Dr David Cluet, Laura Guiguettaz**

Thibaut Sohier, Dr Emmanuel Labaronne, Dr Anissa Guillemain, Dr Christelle Morris

**Dr Sebastian Amigorena,  
Dr Michael Saitaki**



**Dr Karl Balabanian :  
modèle de souris CXCR4<sup>WHIM</sup>**

Plateau de cytométrie

Animalerie PBES

ARS Ile de France / APHP :  
Année recherche