



UNIVERSITÉ CLAUDE BERNARD LYON 1

ANNÉE 2021 N°383

**Nouveaux biomarqueurs pour la prédiction des rechutes
et des toxicités dans les lymphomes B agressifs
réfractaires traités par cellules CAR-T**

THESE D'EXERCICE EN MEDECINE

Présentée à l'Université Claude Bernard Lyon 1
Et soutenue publiquement le 22 octobre 2021
En vue d'obtenir le titre de Docteur en Médecine

Par

Stéphanie Cordeil
01/12/1986 à Montélimar (26)

Sous la direction du Professeur Emmanuel BACHY



Faculté de Médecine Lyon Est Liste des enseignants 2020/2021

Professeurs des Universités – Praticiens Hospitaliers Classe exceptionnelle Echelon 2

BLAY	Jean-Yves	Cancérologie ; radiothérapie
BORSON-CHAZOT	Françoise	Endocrinologie, diabète et maladies métaboliques ; gynécologie médicale
BRETON	Pierre	Chirurgie maxillo-faciale et stomatologie
CHASSARD	Dominique	Anesthésiologie-réanimation ; médecine d'urgence
CLARIS	Olivier	Pédiatrie
COCHAT	Pierre	Pédiatrie (<i>en retraite à compter du 01/03/2021</i>)
DUCERF	Christian	Chirurgie viscérale et digestive
ETIENNE	Jérôme	Bactériologie-virologie ; hygiène hospitalière
FINET	Gérard	Cardiologie
GUERIN	Claude	Réanimation ; médecine d'urgence
GUERIN	Jean-François	Biologie et médecine du développement et de la reproduction ; gynécologie médicale
LACHAUX	Alain	Pédiatrie
LERMUSIAUX	Patrick	Chirurgie thoracique et cardiovasculaire
LINA	Bruno	Bactériologie-virologie ; hygiène hospitalière
MIOSSEC	Pierre	Rhumatologie
MORNEX	Jean-François	Pneumologie ; addictologie
MOULIN	Philippe	Endocrinologie
NEGRIER	Claude	Hématologie ; transfusion
NEGRIER	Sylvie	Cancérologie ; radiothérapie
NIGHOGHOSSIAN	Norbert	Neurologie
NINET	Jean	Chirurgie thoracique et cardiovasculaire (<i>à la retraite au 01.04.2021</i>)
OBADIA	Jean-François	Chirurgie thoracique et cardiovasculaire
OVIZE	Michel	Cardiologie (<i>en disponibilité jusqu'au 31.08.21</i>)
PONCHON	Thierry	Gastroentérologie ; hépatologie ; addictologie
REVEL	Didier	Radiologie et imagerie médicale
RIVOIRE	Michel	Cancérologie ; radiothérapie
VANDENESCH	François	Bactériologie-virologie ; hygiène hospitalière
ZOULIM	Fabien	Gastroentérologie ; hépatologie ; addictologie

Professeurs des Universités – Praticiens Hospitaliers Classe exceptionnelle Echelon 1

ARGAUD	Laurent	Réanimation ; médecine d'urgence
BERTRAND	Yves	Pédiatrie
BOILLOT	Olivier	Chirurgie viscérale et digestive
CHEVALIER	Philippe	Cardiologie
COLIN	Cyrille	Epidémiologie, économie de la santé et prévention
COTTIN	Vincent	Pneumologie ; addictologie

D'AMATO	Thierry	Psychiatrie d'adultes ; addictologie
DELAHAYE	François	Cardiologie
DENIS	Philippe	Ophtalmologie
DOUEK	Charles-Philippe	Radiologie et imagerie médicale
DUMONTET	Charles	Hématologie ; transfusion
DURIEU	Isabelle	Médecine interne ; gériatrie et biologie du vieillissement ; médecine générale ; addictologie
EDERY	Charles Patrick	Génétique
FROMENT (TILIKETE)	Caroline	Neurologie
GAUCHERAND	Pascal	Gynécologie-obstétrique ; gynécologie médicale
GUEYFFIER	François	Pharmacologie fondamentale ; pharmacologie clinique ; addictologie
HONNORAT	Jérôme	Neurologie
KODJIKIAN	Laurent	Ophtalmologie
MABRUT	Jean-Yves	Chirurgie générale
MERTENS	Patrick	Neurochirurgie
MORELON	Emmanuel	Néphrologie
RODE	Gilles	Médecine physique et de réadaptation
SCHOTT-PETHELAZ	Anne-Marie	Epidémiologie, économie de la santé et prévention
TRUY	Eric	Oto-rhino-laryngologie
TERRA	Jean-Louis	Psychiatrie d'adultes ; addictologie
TURJMAN	Francis	Radiologie et imagerie médicale

Professeurs des Universités – Praticiens Hospitaliers Première classe

ADER	Florence	Maladies infectieuses ; maladies tropicales
AUBRUN	Frédéric	Anesthésiologie-réanimation ; médecine d'urgence
BADET	Lionel	Urologie
BERTHEZENE	Yves	Radiologie et imagerie médicale
BESSEREAU	Jean-Louis	Biologie cellulaire
BRAYE	Fabienne	Chirurgie plastique, reconstructrice et esthétique ; Brûlologie
BUZLUCA DARGAUD	Yesim	Hématologie ; transfusion
CALENDER	Alain	Génétique
CHAPURLAT	Roland	Rhumatologie
CHARBOTEL	Barbara	Médecine et santé au travail
COLOMBEL	Marc	Urologie
COTTON	François	Radiologie et imagerie médicale
DAVID	Jean-Stéphane	Anesthésiologie-réanimation ; médecine d'urgence
DEVOUASSOUX	Mojgan	Anatomie et cytologie pathologiques
DI FILLIPO	Sylvie	Cardiologie
DUBERNARD	Laurence	Physiologie
DUBOURG	Gil	Gynécologie-obstétrique ; gynécologie médicale
DUCLOS	Antoine	Epidémiologie, économie de la santé et prévention
DUMORTIER	Jérôme	Gastroentérologie ; hépatologie ; addictologie
FANTON	Laurent	Médecine légale
FAUVEL	Jean-Pierre	Thérapeutique
FELLAHI	Jean-Luc	Anesthésiologie-réanimation ; médecine d'urgence
FERRY	Tristan	Maladies infectieuses ; maladies tropicales
FOURNERET	Pierre	Pédopsychiatrie ; addictologie
GUENOT	Marc	Neurochirurgie
GUIBAUD	Laurent	Radiologie et imagerie médicale
HOT	Arnaud	Médecine interne
JACQUIN-COURTOIS	Sophie	Médecine physique et de réadaptation
JAVOUHEY	Etienne	Pédiatrie
JUILLARD	Laurent	Néphrologie
JULLIEN	Denis	Dermato-vénéréologie

KROLAK SALMON	Pierre	Médecine interne ; gériatrie et biologie du vieillissement ; médecine générale ; addictologie
LEJEUNE	Hervé	Biologie et médecine du développement et de la reproduction ; gynécologie médicale
LESURTEL	Mickaël	Chirurgie générale
MERLE	Philippe	Gastroentérologie ; hépatologie ; addictologie
MICHEL	Philippe	Epidémiologie, économie de la santé et prévention
MURE	Pierre-Yves	Chirurgie infantile
NICOLINO	Marc	Pédiatrie
PERETTI	Noël	Pédiatrie
PICOT	Stéphane	Parasitologie et mycologie
PONCET	Gilles	Chirurgie viscérale et digestive
POULET	Emmanuel	Psychiatrie d'adultes ; addictologie
RAVEROT	Gérald	Endocrinologie, diabète et maladies métaboliques ; gynécologie médicale
RAY-COQUARD	Isabelle	Cancérologie ; radiothérapie
RICHARD	Jean-Christophe	Réanimation ; médecine d'urgence
ROBERT	Maud	Chirurgie digestive
ROMAN	Sabine	Gastroentérologie
ROSSETTI	Yves	Médecine Physique de la Réadaptation
ROUVIERE	Olivier	Radiologie et imagerie médicale
ROY	Pascal	Biostatistiques, informatique médicale et technologies de communication
SAOUD	Mohamed	Psychiatrie d'adultes et addictologie
SCHAEFFER	Laurent	Biologie cellulaire
THAUNAT	Olivier	Néphrologie
VANHEMS	Philippe	Epidémiologie, économie de la santé et prévention
VUKUSIC	Sandra	Neurologie
WATTEL	Eric	Hématologie ; transfusion

Professeurs des Universités – Praticiens Hospitaliers Seconde Classe

BACCHETTA	Justine	Pédiatrie
BOUSSEL	Loïc	Radiologie et imagerie médicale
CHENE	Gautier	Gynécologie-obstétrique ; gynécologie médicale
COLLARDEAU FRACHON	Sophie	Anatomie et cytologie pathologiques
CONFAVREUX	Cyrille	Rhumatologie
COUR	Martin	Médecine intensive de réanimation
CROUZET	Sébastien	Urologie
CUCHERAT	Michel	Pharmacologie fondamentale ; pharmacologie clinique ; addictologie
DI ROCCO	Federico	Neurochirurgie
DUCRAY	François	Neurologie
EKER	Omer	Radiologie ; imagerie médicale
GILLET	Yves	Pédiatrie
GLEIZAL	Arnaud	Chirurgie maxillo-faciale et stomatologie
GUEBRE-EGZIABHER	Fitsum	Néphrologie
HENAINE	Roland	Chirurgie thoracique et cardiovasculaire
HUISSOUD	Cyril	Gynécologie-obstétrique ; gynécologie médicale
JANIER	Marc	Biophysique et médecine nucléaire
JARRAUD	Sophie	Bactériologie-virologie ; hygiène hospitalière
LESCA	Gaëtan	Génétique
LEVRERO	Massimo	Gastroentérologie ; hépatologie ; addictologie
LUKASZEWICZ	Anne-Claire	Anesthésiologie-réanimation ; médecine d'urgence
MAUCORT BOULCH	Delphine	Biostatistiques, informatique médicale et technologies de communication
MEWTON	Nathan	Cardiologie

MEYRONET	David	Anatomie et cytologie pathologiques
MILLON	Antoine	Chirurgie vasculaire ; médecine vasculaire
MOKHAM	Kayvan	Chirurgie viscérale et digestive
MONNEUSE	Olivier	Chirurgie générale
NATAF	Serge	Cytologie et histologie
PIOCHE	Mathieu	Gastroentérologie
RHEIMS	Sylvain	Neurologie
RIMMELE	Thomas	Anesthésiologie-réanimation ; médecine d'urgence
SOUQUET	Jean-Christophe	Gastroentérologie ; hépatologie ; addictologie
THIBAUT	Hélène	Cardiologie
VENET	Fabienne	Immunologie

**Professeur des Universités
Classe exceptionnelle**

PERRU	Olivier	Epistémologie, histoire des sciences et techniques
-------	---------	--

**Professeur des Universités - Médecine Générale
Première classe**

FLORI	Marie
LETRILLIART	Laurent

**Professeur des Universités - Médecine Générale
Deuxième classe**

ZERBIB	Yves
--------	------

Professeurs associés de Médecine Générale

FARGE	Thierry
LAINÉ	Xavier

Professeurs associés autres disciplines

BERARD	Annick	Pharmacie fondamentale ; pharmacie clinique
CHVETZOFF	Gisèle	Médecine palliative
LAMBLIN	Géry	Gynécologie ; obstétrique

Professeurs émérites

BEZIAT	Jean-Luc	Chirurgie maxillo-faciale et stomatologie
CHAYVIALLE	Jean-Alain	Gastroentérologie ; hépatologie ; addictologie
CORDIER	Jean-François	Pneumologie ; addictologie
DALIGAND	Liliane	Médecine légale et droit de la santé
DROZ	Jean-Pierre	Cancérologie ; radiothérapie
FLORET	Daniel	Pédiatrie
GHARIB	Claude	Physiologie
LEHOT	Jean-Jacques	Anesthésiologie-réanimation ; médecine d'urgence
MAUGUIERE	François	Neurologie
MELLIER	Georges	Gynécologie
MICHALLET	Mauricette	Hématologie ; transfusion
MOREAU	Alain	Médecine générale
NEIDHARDT	Jean-Pierre	Anatomie
PUGEAUT	Michel	Endocrinologie

RUDIGOZ	René-Charles	Gynécologie
SCHEIBER	Christian	Biophysique ; Médecine Nucléaire
SINDOU	Marc	Neurochirurgie
THIVOLET-BEJUI	Françoise	Anatomie et cytologie pathologiques
TOURAINÉ	Jean-Louis	Néphrologie
TREPO	Christian	Gastroentérologie ; hépatologie ; addictologie
TROUILLAS	Jacqueline	Cytologie et histologie

Maîtres de Conférence – Praticiens Hospitaliers Hors classe

BENCHAIB	Mehdi	Biologie et médecine du développement et de la reproduction ; gynécologie médicale
BRINGUIER	Pierre-Paul	Cytologie et histologie
CHALABREYSSE	Lara	Anatomie et cytologie pathologiques
HERVIEU	Valérie	Anatomie et cytologie pathologiques
KOLOPP-SARDA	Marie Nathalie	Immunologie
LE BARS	Didier	Biophysique et médecine nucléaire
MENOTTI	Jean	Parasitologie et mycologie
PERSAT	Florence	Parasitologie et mycologie
PIATON	Eric	Cytologie et histologie
SAPPEY-MARINIER	Dominique	Biophysique et médecine nucléaire
STREICHENBERGER	Nathalie	Anatomie et cytologie pathologiques
TARDY GUIDOLLET	Véronique	Biochimie et biologie moléculaire

Maîtres de Conférence – Praticiens Hospitaliers Première classe

BONTEMPS	Laurence	Biophysique et médecine nucléaire
CASALEGNO	Jean-Sébastien	Bactériologie-virologie ; hygiène hospitalière
CHARRIERE	Sybil	Endocrinologie
COZON	Grégoire	Immunologie
ESCURET	Vanessa	Bactériologie-virologie ; hygiène hospitalière
PINA-JOMIR	Géraldine	Biophysique et médecine nucléaire
PLOTTON	Ingrid	Biochimie et biologie moléculaire
RABILLOUD	Muriel	Biostatistiques, informatique médicale et technologies de communication
SCHLUTH-BOLARD	Caroline	Génétique
TRISTAN	Anne	Bactériologie-virologie ; hygiène hospitalière
VASILJEVIC	Alexandre	Anatomie et cytologie pathologiques
VLAEMINCK-GUILLEM	Virginie	Biochimie et biologie moléculaire

Maîtres de Conférences – Praticiens Hospitaliers Seconde classe

BOUCHIAT SARABI	Coralie	Bactériologie-virologie ; hygiène hospitalière
BOUTY	Aurore	Chirurgie infantile
BUTIN	Marine	Pédiatrie
CORTET	Marion	Gynécologie-obstétrique ; gynécologie médicale
COUTANT	Frédéric	Immunologie
CURIE	Aurore	Pédiatrie

DURUISSEAUX	Michaël	Pneumologie
HAESEBAERT	Julie	Médecin de santé publique
HAESEBAERT	Frédéric	Psychiatrie d'adultes ; addictologie
JACQUESSON	Timothée	Neurochirurgie
JOSSET	Laurence	Bactériologie-virologie ; hygiène hospitalière
LACQIN REYNAUD	Quitterie	Médecine interne ; gériatrie ; addictologie
LEMOINE	Sandrine	Néphrologie
LILLOT	Marc	Anesthésiologie, Réanimation, Médecine d'urgence
NGUYEN CHU	Huu Kim An	Pédiatrie
ROUCHER BOULEZ	Florence	Biochimie et biologie moléculaire
SIMONET	Thomas	Biologie cellulaire
VILLANI	Axel	Dermatologie, vénéréologie

Maître de Conférences Classe normale

DALIBERT	Lucie	Epistémologie, histoire des sciences et techniques
GOFFETTE	Jérôme	Epistémologie, histoire des sciences et techniques
LASSERRE	Evelyne	Ethnologie préhistoire anthropologie
LECHOPIER	Nicolas	Epistémologie, histoire des sciences et techniques
NAZARE	Julie-Anne	Physiologie
PANTHU	Baptiste	Biologie Cellulaire
VIALLOIN	Vivian	Mathématiques appliquées
VIGNERON	Arnaud	Biochimie, biologie
VINDRIEUX	David	Physiologie

Maitre de Conférence de Médecine Générale

CHANELIERE	Marc
------------	------

Maîtres de Conférences associés de Médecine Générale

DE FREMINVILLE	Humbert
PERROTIN	Sofia
PIGACHE	Christophe
ZORZI	Frédéric

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1

Président	Pr Frédéric FLEURY
Présidente du Comité de Coordination des Etudes Médicales	Pr Carole BURILLON
Directeur Général des services	M. Pierre ROLLAND
Secteur Santé :	
Doyen de l'UFR de Médecine Lyon Est	Pr Gilles RODE
Doyenne de l'UFR de Médecine Lyon-Sud Charles Mérieux	Pr Carole BURILLON
Doyenne de l'Institut des Sciences Pharmaceutiques (ISPB)	Pr Christine VINCIGUERRA
Doyenne de l'UFR d'Odontologie	Pr Dominique SEUX
Directeur de l'Institut des Sciences et Techniques de Réadaptation (ISTR)	Dr Xavier PERROT
Directrice du département de Biologie Humaine	Pr Anne-Marie SCHOTT
Secteur Sciences et Technologie :	
Administratrice Provisoire de l'UFR BioSciences	Pr Kathrin GIESELER
Administrateur Provisoire de l'UFR Faculté des Sciences Et Technologies	Pr Bruno ANDRIOLETTI
Directeur de l'UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives (STAPS)	M. Yannick VANPOULLE
Directeur de Polytech	Pr Emmanuel PERRIN
Directeur de l'IUT	Pr Christophe VITON
Directeur de l'Institut des Sciences Financières Et Assurances (ISFA)	M. Nicolas LEBOISNE
Directrice de l'Observatoire de Lyon	Pr Isabelle DANIEL
Directeur de l'Institut National Supérieur du Professorat et de l'Education (INSPé)	M. Pierre CHAREYRON
Directrice du Département Composante Génie Electrique et Procédés (GEP)	Pr Rosaria FERRIGNO

Directeur du Département Composante Informatique

Pr Behzad SHARIAT TORBAGHAN

Directeur du Département Composante Mécanique

Pr Marc BUFFAT

Le Serment d'Hippocrate

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

Je respecterai toutes les personnes, leur autonomie et leur volonté, sans discrimination.

J'interviendrai pour les protéger si elles sont vulnérables ou menacées dans leur intégrité ou leur dignité. Même sous la contrainte, je ne ferai pas usage de mes connaissances contre les lois de l'humanité.

J'informerai les patients des décisions envisagées, de leurs raisons et de leurs conséquences. Je ne tromperai jamais leur confiance.

Je donnerai mes soins à l'indigent et je n'exigerai pas un salaire au dessus de mon travail.

Admis dans l'intimité des personnes, je tairai les secrets qui me seront confiés et ma conduite ne servira pas à corrompre les mœurs.

Je ferai tout pour soulager les souffrances. Je ne prolongerai pas abusivement la vie ni ne provoquerai délibérément la mort.

Je préserverai l'indépendance nécessaire et je n'entreprendrai rien qui dépasse mes compétences. Je perfectionnerai mes connaissances pour assurer au mieux ma mission.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses. Que je sois couvert d'opprobre et méprisé si j'y manque.

SOMMAIRE

SOMMAIRE.....	11
TABLE DES ILLUSTRATIONS.....	13
REMERCIEMENTS.....	15
RESUME.....	17
INTRODUCTION.....	18
A. LES LYMPHOMES A GRANDES CELLULES B EN RECHUTE OU REFRACTAIRES	18
B. L'IMMUNOTHERAPIE PAR CELLULES CAR-T ANTI-CD19.....	20
1. <i>Historique et construction du récepteur antigénique chimérique CAR.....</i>	<i>20</i>
2. <i>Déroulement de la thérapie cellulaire par lymphocytes CAR-T</i>	<i>21</i>
3. <i>Effets secondaires précoces.....</i>	<i>22</i>
4. <i>Résultats cliniques obtenus après traitement par les cellules CAR-T anti- CD19 dans les lymphomes à grandes cellules B.....</i>	<i>24</i>
C. LES PRINCIPAUX FACTEURS IMPACTANT L'EFFICACITE DES CELLULES CAR-T .	26
1. <i>Les facteurs liés au produit cellulaire CAR-T.....</i>	<i>26</i>
2. <i>Les facteurs liés au patient.....</i>	<i>28</i>
3. <i>Les facteurs liés à la tumeur.....</i>	<i>29</i>
D. PREDICTION DE L'EFFICACITE DES CELLULES CAR-T DANS LES LGCB-R/R EN PRATIQUE CLINIQUE.....	31
E. OBJECTIFS DU TRAVAIL DE THESE	32
MATERIELS ET METHODES.....	34
A. PATIENTS ET PROCEDURE THERAPEUTIQUE	34
B. ÉVALUATION DES REPONSES AUX CELLULES CAR-T.....	34
C. VARIABLES BIOLOGIQUES.....	35
D. ANALYSES DE CYTOMETRIE EN FLUX.....	36
E. METHODES STATISTIQUES	36
RESULTATS.....	38

A.	CARACTERISTIQUES DE LA POPULATION	38
B.	EFFICACITE, DEVENIR ET TOXICITE GLOBALE DU TRAITEMENT PAR CELLULES CAR-T DANS LA COHORTE.....	39
C.	DESCRIPTION DES FACTEURS BIOLOGIQUES ASSOCIES A LA RECHUTE	42
D.	CARACTERISATION DE L'IMPACT POSITIF DES LYMPHOCYTES AVANT LYMPHODEPLETION SUR LES REMISSIONS	44
E.	CORRELATION DU NOMBRE DE LYMPHOCYTES AVANT LYMPHODEPLETION AVEC LES LYMPHOCYTES DOSES AU MOMENT DE LA LEUCAPHERESE ET APRES REINJECTION DES CELLULES CAR-T	50
F.	CORRELATION ENTRE LE TAUX DE LYMPHOCYTES AVANT LD ET LE PIC D'EXPANSION DES LYMPHOCYTES T REINJECTES, CAR ET NON CAR	53
G.	ANALYSE PRELIMINAIRE DES FACTEURS ASSOCIES AUX TOXICITES.....	54
	DISCUSSION.....	58
	BIBLIOGRAPHIE	63
	ANNEXES	68
A.	FIGURES SUPPLEMENTAIRES	68
B.	CONCLUSIONS OFFICIELLES DE THESE.....	69

TABLE DES ILLUSTRATIONS

FIGURE 1 - PRISE EN CHARGE THERAPEUTIQUE ET DEVENIR DES PATIENTS ATTEINTS PAR UN LYMPHOME A GRANDES CELLULES B.	19
FIGURE 2 - SCHEMA COMPARATIF DU TCR (RECEPTEUR DES CELLULES T) ET DES CAR (RECEPTEUR ANTIGENIQUE CHIMERIQUE) DE 1^{ER} ET 2^{EME} GENERATION.	21
FIGURE 3 - PROCESSUS DE FABRICATION DES CELLULES CAR-T.	22
FIGURE 4 - MECANISMES PHYSIOPATHOLOGIQUES DU SYNDROME DE RELARGAGE CYTOKINIQUE ET DE LA NEUROTOXICITE INDUITE PAR LES CELLULES CAR-T.	24
FIGURE 5 - SCHEMA DES PRINCIPAUX FACTEURS IMPACTANT LES REPONSES AU TRAITEMENT PAR CELLULES CAR-T ANTI-CD19 DANS LES LGCB-R/R.	31
FIGURE 6 - SCHEMA RESUMANT LE DEROULEMENT DE LA PRISE EN CHARGE DES PATIENTS TRAITES PAR CELLULES CAR-T AU SEIN DE NOTRE ETUDE.	35
FIGURE 7 - VUE D'ENSEMBLE DE LA SURVIE, DES REPONSES ET DES TOXICITES OBSERVEES DANS LA COHORTE DE LDGB TRAITES AU CHU DE LYON SUD.	41
FIGURE 8 - FOREST PLOT DE L'ANALYSE MULTIVARIEE DES BIOMARQUEURS IMPACTANT LA SSP.	43
FIGURE 9 – ILLUSTRATION DE LA DUALITE DU ROLE PREDICTIF DE L'ACIDE URIQUE SUR LA SSP EN LIEN AVEC L'ETAT NUTRITIONNEL.	44
FIGURE 10 - IMPACT DES LYMPHOCYTES AVANT LYMPHODEPLETION SUR LA SSP ET LA SG DES PATIENTS TRAITES PAR CELLULES CAR-T.	45
FIGURE 11- EFFET DES LYMPHOCYTES AVANT LYMPHODEPLETION SUR LA DUREE ET LA QUALITE DE LA REPONSE DES PATIENTS TRAITES PAR CELLULES CAR-T POUR UN LGCB-R/R.	47
FIGURE 12 – IMPACT DES SOUS-POPULATION LYMPHOCYTAIRES T SUR LA DUREE ET LE TYPE DE REPONSE.	50
FIGURE 13 – ASSOCIATION ENTRE LE TAUX DE LYMPHOCYTES AVANT LYMPHODEPLETION ET LE TAUX DE LYMPHOCYTES DOSES AU MOMENT DE LA LEUCAPHERESE ET APRES REINJECTION DES CELLULES CAR-T.	52
FIGURE 14 - CORRELATION ENTRE LES LYMPHOCYTES AVANT LYMPHODEPLETION ET LES LYMPHOCYTES CAR-T.	54

FIGURE 15 - ANALYSE DES BIOMARQUEURS AVANT LYMPHODEPLETION ASSOCIES A LA SURVENUE DES TOXICITES APRES UN TRAITEMENT PAR CELLULES CAR-T.....	57
FIGURE 16 – IMPACT DES LYMPHOCYTES PERIPHERIQUES AVANT LEUCAPHERESE SUR LA SSP ET LA REPONSE.	69
TABLEAU 1 - RECAPITULATIF DES PRINCIPAUX RESULTATS DES 3 ESSAIS CLINIQUES PIVOTS ET DES DONNEES EN « VIE REELLE » DU CHU DE LYON SUD.....	25
TABLEAU 2 - CARACTERISTIQUES CLINIQUES INITIALES DES PATIENTS DE LA COHORTE.....	39
TABLEAU 3 - ANALYSE UNIVARIEE DU CARACTERE PRONOSTIQUE DES VARIABLES BIOLOGIQUES AVANT LD SUR LA SSP.....	42
TABLEAU 4 - TABLEAU DESCRIPTIF DES PARAMETRES BIOLOGIQUES ANALYSES.....	68

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier tous les membres de mon jury d'avoir accepté de juger ce travail de thèse en médecine.

Au Pr Emmanuel BACHY : je te remercie pour ton accompagnement sans faille depuis le début de ce nouveau parcours en médecine. Tes qualités humaines et ton humilité sont des repères pour moi, tout comme ton esprit scientifique.

Au Pr Hervé GHESQUIERES : merci pour ton écoute et ta pédagogie si précieuses. J'espère encore apprendre à tes côtés.

Au Pr Alexandra Pr TRAVERSE-GLEHEN : merci pour ce stage en anatomopathologie. Je retiendrai ta bienveillance à l'égard des patients. J'ai eu la chance de partager ton expérience dans le monde fascinant du diagnostic en hématologie.

Au Dr Laurent JALLADES : je te remercie pour ton aide dans le commencement de cette étude. Merci pour ton soutien. J'apprécie la curiosité constante qui t'anime.

Au Dr Pierre SESQUES : merci d'avoir été disponible tout au long de cette thèse de médecine. Nous partageons de nombreux points communs tels que la passion de l'hématologie, des *CAR-T cells* et de la discographie de la fin des années 90.

Un grand merci à Maryam pour toute son aide dans l'analyse statistique de ce jeu de données d'une taille remarquable. Toujours de bonne humeur et sympathique malgré mes multiples idées ! Tu étais mon modèle pour R !

```
>mod1 <- glm(Maryam~Stéphanie, family=binomial, data=stat_cp)
>summary(mod1)
github, koh lanta
```

Merci à tous les hématologues du CHLS : Dana avec qui nous avons formé une véritable équipe en HDJ. Tu m'as beaucoup appris. Marie B. pour la découverte du monde myéloïde et surtout des LAL ! Un vrai bonheur de travailler avec toi. Merci aussi à « Sandrichou » qui faisait ses débuts d'assistante à ce moment-là. Merci à Hélène, Marie L, Fiorenza et Maël pour nos astreintes parfois mouvementées. Merci à Fafa, Camille et Anne pour la confiance accordée et mes premières consultations ! Merci à Lionel, Alizée et Guillaume, pour les bons moments passés à MB3. Merci à Manue et Violaine, pour leur encadrement et la transmission de leur rigueur au quotidien.

Merci à tous mes co-internes en hématologie et spécialement à Grégoire, alias « Gréguichou » et Anne-Marie, alias Anne-Ma, vous êtes des personnes formidables et je suis très contente d'avoir effectué mon parcours d'interne à vos côtés.

Merci à mon ami Mickael, interniste au plus profond de son âme. Merci pour ton amitié et nos discussions animées concernant les challenges diagnostiques rencontrés en pratique.

Merci à Edmond, tu es un véritable ami et merci pour l'ouverture d'esprit que tu m'as apportée.

Merci à la « team covid » de la réanimation de St Luc St Jo : Aude et nos discussions off pendant les poses de VVC, Mehdi pour ton humour et les LBA, Gaultier pour toi et les ETT (félicitations pour Basile) sans oublier Pierre et J-B qui nous ont prêté main-forte au plus fort de la crise. On a vécu la première vague covid ensemble dans une ambiance que je n'oublierai jamais. Merci aux chefs de cette réanimation, à Christian P., pour sa gentillesse, son accompagnement presque paternel, à Manu V. pour ses conseils tellement justes sur l'enseignement, à Gaël B. et Pierre pour leur rigueur et nos confrontations sur les beaux diagnostics de réanimation ; merci à Audrey, j'ai tellement aimé travailler avec toi grâce à cette confiance que tu m'accordais ; merci à Sylvaine pour son encadrement rassurant.

Merci aux membres de la banque des tissus de HEH : Valérie, Anne, Pierre, Claire-Lise, Jean-Paul, Phil, Loan et l'ensemble des techniciens pour l'immersion dans leur quotidien qui est capital pour nos pratiques en hématologie clinique. Merci à Olivier Hequet et Youssef de m'avoir accueillie au centre de santé pour démystifier la science de l'aphérèse.

Merci à mes co-internes d'Anapath pour leur soutien et leur aide pendant cette période de thèse. Merci à Haingo (vive Madagascar), Sami (vive St Etienne), Danny, Élise, Gaspard, Mathilde, Ziyad et Alexis.

Je remercie mes « loulou » externes d'avoir été mes rayons de soleil en stage avec leur soif d'apprendre et de comprendre encore intacte. Pour ne citer que les plus proches Sarah, Lisa, Alice, Loulou138, Juliette, Etienne et Victor.

Merci à mon papa d'être toujours derrière moi, à ma maman de me soutenir de son mieux et à mes deux sœurs chéries d'amour, cf pouvoir des trois. Merci à mes deux grand-mères adorées. Merci à ma tante Claudette et à mon oncle Jacky pour leurs soutiens. Merci à Agnès et Daniel, à mes côtes depuis le début de cette aventure en médecine !

Merci à Taran, mon œnologue chercheur qui me « *support* » au quotidien.

Merci à mes meilleurs amis presque tous rencontrés à l'ENS pendant cette période exceptionnelle où se mêlaient joie et travail intense. Julien, mon meilleur ami, bien trop loin à mon goût. Anne et Xuan-Nhi avec qui j'ai partagé mes plus gros délires. Merci à Caro mon amie dieulefiteoise au chemin de vie souvent si proche du mien. Merci à maman Véro pour ta présence et tes conseils primordiaux dans ma vie. Merci à « Daminou » pour tes encouragements pour ma future 3^{ème} thèse ! Un grand merci à Mimouchka pour le *deal* de codes R et merci à Julia, je vous adore. Dommage que l'Autriche soit si loin. Merci à la gym suédoise d'équilibrer mon hyperactivité !!

Merci à tous les patients que j'ai croisés et soignés, j'espère avoir fait au mieux pour vous.

« Moine benêt l'an passé et cette année tout pareil »

RESUME

Le traitement par les cellules CAR-T anti-CD19 a considérablement amélioré le pronostic des patients atteints par un lymphome à grandes cellules B réfractaire ou en rechute (LGCB-R/R). Pourtant, plus de la moitié des patients rechute encore après ce traitement. Il est donc essentiel d'identifier les facteurs permettant de distinguer rémission prolongée et rechute précoce ainsi que ceux impliqués dans l'apparition des toxicités potentiellement sévères, à savoir, le syndrome de relargage cytokinique (SRC) et la neurotoxicité (NT). Dans le but de découvrir de nouveaux biomarqueurs prédictifs de l'efficacité des cellules CAR-T et des toxicités induites par ces dernières, notre étude a porté sur une trentaine de paramètres biologiques dosés avant lymphodéplétion (LD) au sein d'une cohorte de 107 patients traités au CHU de Lyon Sud. Sur le plan pronostique, l'analyse multivariée des six paramètres significatifs en univarié (acide urique, triglycérides, CRP, ratio TCA, LDH, lymphocytes) a montré que l'acide urique ($p=0,03$) et les lymphocytes ($p=0,02$) avant LD sont des biomarqueurs indépendants prédictifs de la survie sans progression (SSP). Un taux élevé de lymphocytes avant LD était associé à une meilleure qualité de réponse (rémission complète versus rémission partielle et maladie stable/progressive, $p<0,001$). Les patients dont le ratio CD4/CD8 était inférieur à 1 avant LD ont eu une meilleure SSP ($p=0,03$) suggérant un rôle prédominant des lymphocytes T CD8. D'un point de vue mécanistique, nos résultats ont indiqué que l'effet des lymphocytes avant LD pourrait être expliqué par une meilleure qualité du produit de leucaphérèse (lymphocytes avant LD et au moment de l'aphérèse : $r= 0,54$; $p=0,007$) et/ou une plus forte expansion des cellules T non CAR par rapport aux cellules CAR-T (lymphocytes avant LD et pic d'expansion des cellules non CAR : $r= 0,59$; $p<0,001$). Sur le plan des toxicités, un taux élevé de lactate veineux avant LD a permis de prédire la survenue des toxicités sévères avec un effet dose (SRC : OR=2,12 ; $p=0,005$ / NT : OR=1,48 ; $p=0,03$). En conclusion, la découverte de l'impact des taux de lymphocytes et de lactate avant LD améliore respectivement l'identification des patients à risque de rechute et de toxicités sévères. Ces biomarqueurs ouvrent ainsi de nouvelles pistes pour une meilleure compréhension du mode d'action de cette immunothérapie, ce qui permettrait *in fine* de vaincre les mécanismes de résistance pour améliorer les taux de rémissions à long terme.

INTRODUCTION

A. Les lymphomes à grandes cellules B en rechute ou réfractaires

Les lymphomes à grandes cellules B (LGCB) représentent l'entité histologique la plus fréquemment diagnostiquée dans le monde parmi l'ensemble des cas de lymphomes non Hodgkiniens. La prise en charge thérapeutique initiale de ces patients est bien codifiée et repose sur une immunochimiothérapie de première ligne de type R-CHOP (RITIXUMAB-HYDROXYDOXORUBICINE/VINCRISTINE/PREDNISONE) permettant de guérir environ 60% des patients. Pour les patients en rechute et les patients réfractaires primaires c'est-à-dire chimiorésistants pour lesquels la meilleure réponse obtenue au R-CHOP est une maladie stable ou en progression, les chances de réponse aux lignes suivantes s'amenuisent fortement¹. Le standard de 2^{ème} ligne reste une chimiothérapie généralement à base de sels de platine suivie d'une consolidation par autogreffe de cellules souches hématopoïétiques (ACSH). Cependant, la médiane d'âge au diagnostic étant de 60 ans, il faut aussi tenir compte du fait que près de la moitié des patients ne pourront pas bénéficier de ce traitement intensif. Finalement, la majorité des patients sera sans réponse ou rechutera et très peu de patients vont être potentiellement guéris (**Figure 1A**).

En 2017, avant l'ère des lymphocytes T porteurs d'un CAR (*Chimeric Antigen Receptor*), une étude multicentrique internationale nommée SCHOLAR-1 a colligé le devenir de plus de 600 patients réfractaires (*i.e* sans réponse au dernier traitement entrepris) et en rechute précoce (*i.e* moins de 12 mois) suite à une autogreffe de cellules souches hématopoïétique (ASCH)². SCHOLAR-1 a révélé que les thérapeutiques ultérieures entreprises chez ces patients permettaient l'obtention d'un taux de réponse globale (*i.e* réponse complète et partielle) avoisinant 26% avec seulement 7% de réponse complète (**Figure 1B**). En conséquence, le pronostic de ces patients était particulièrement défavorable avec une médiane de survie de seulement 6,3 mois. Confortant des données plus anciennes, SCHOLAR-1 illustre de façon très claire la nécessité du développement de nouveaux traitements pour les patients avec un LGCB réfractaire ou en rechute (R/R).

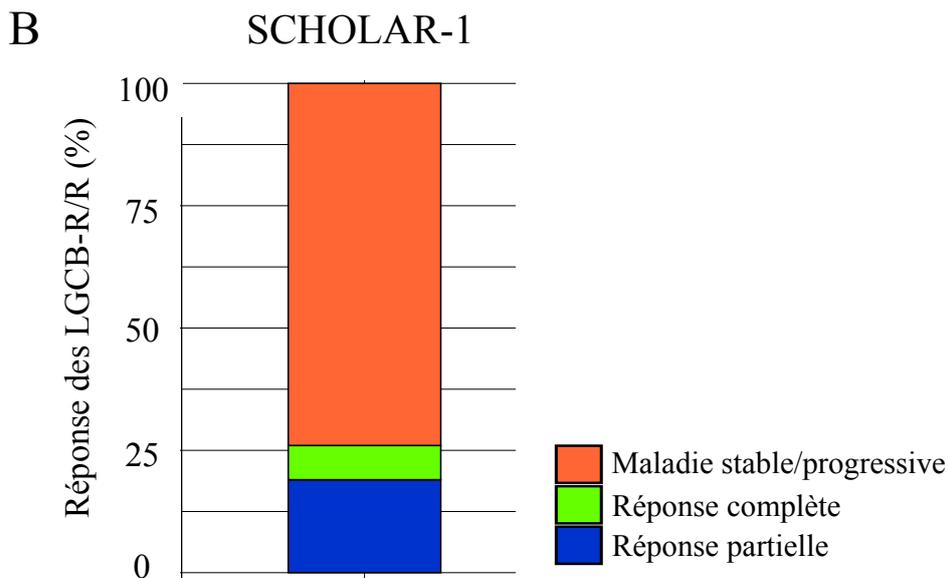
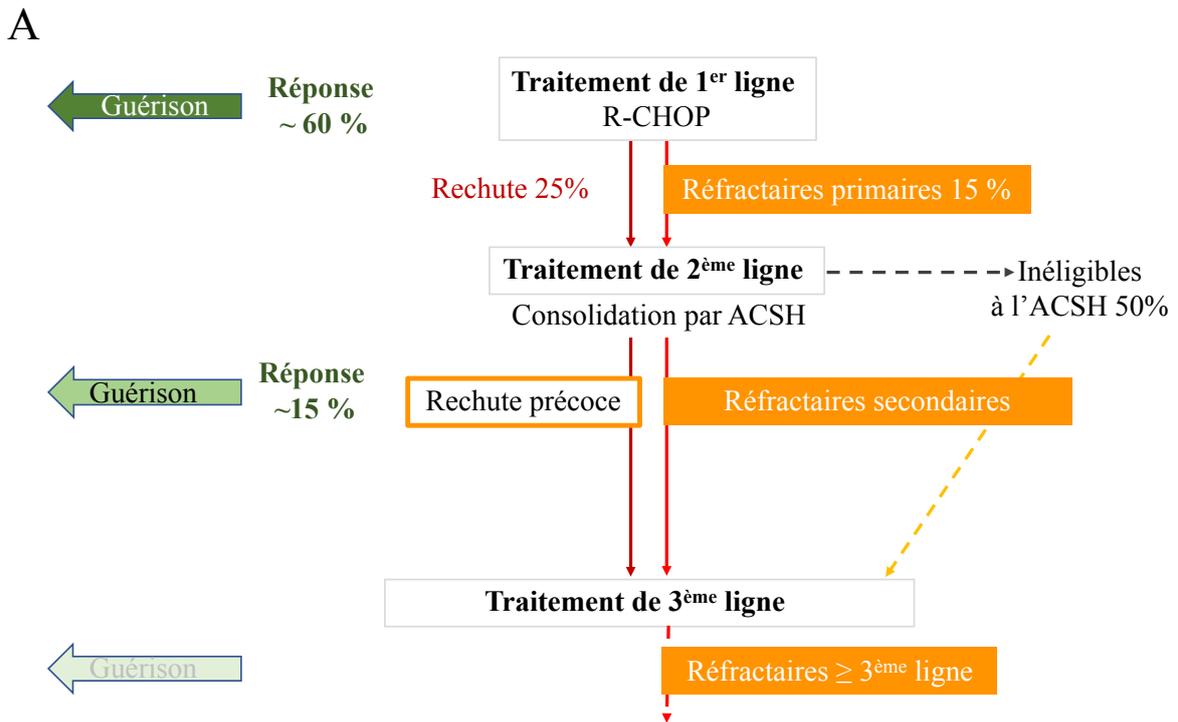


Figure 1 - Prise en charge thérapeutique et devenir des patients atteints par un lymphome à grandes cellules B.

A. La 1^{ère} ligne de type R-CHOP permet de guérir 60% des patients tandis que la 2^{ème} ligne, au mieux consolidée par ASCH, permet de guérir environ 15% des patients. Les chances de rémission suite à une 3^{ème} ligne devenaient donc très incertaines avant l'ère des cellules CAR-T. L'ensemble des patients compris dans les cadres orangés (réfractaires primaires/secondaires ou plus, et en rechute précoce après ASCH) représente la population analysée rétrospectivement dans SCHOLAR-1. **B.** Histogramme représentant les réponses aux traitements des LGCB en rechute ou réfractaires (R/R) observées dans l'étude SCHOLAR-1 en 2017 avant l'ère des cellules CAR-T. Abréviations : autogreffe de cellules souches hématopoïétiques (ACSH) ; Lymphome à grandes cellules B (LGCB).

B. L'immunothérapie par cellules CAR-T anti-CD19

1. Historique et construction du récepteur antigénique chimérique CAR

La naissance des cellules CAR-T résulte de la spectaculaire évolution des thérapies cellulaires au cours des 30 dernières années. En effet, depuis 1986, date de la mise en évidence du puissant pouvoir anti-cancéreux du transfert adoptif de lymphocytes intra-tumoraux (*TILs* pour *Tumor-infiltrating lymphocytes*), ce domaine de la médecine translationnelle n'a cessé d'évoluer (pour revue, cf Singh A. *et al. The lancet*, 2020³). La thérapie cellulaire autologue par les *TILs* a ainsi été suivie par celle des lymphocytes T modifiés génétiquement pour exprimer un récepteur TCR (*T cell receptor*) hautement affiné pour les antigènes tumoraux. Puis, il y a près de 30 ans, les lymphocytes CAR-T sont nés de la volonté de s'affranchir du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) pour la reconnaissance antigénique. En effet, la sous-régulation du CMH est un des principaux mécanismes d'évasion tumorale vis-à-vis du système immunitaire. Le récepteur synthétique CAR possède un domaine extracellulaire composé des segments variables des chaînes lourde et légère d'une immunoglobuline, empruntant ainsi le mode de reconnaissance direct des anticorps (**Figure 2**). Dans sa partie intracellulaire, le CAR est doté d'un domaine de signalisation intracellulaire de CD3 ζ permettant l'activation du lymphocyte T suite à la reconnaissance de l'antigène. Ces cellules autologues modifiées génétiquement par ce CAR de 1^{ère} génération ont cependant montré une activité anti-tumorale décevante et transitoire. En effet, pour être complètement activés, les lymphocytes T requièrent un second signal, dit de costimulation, délivré par les cellules présentatrices d'antigène. Les molécules B7.1 et B7.2 qui engagent le récepteur CD28 à la surface des cellules T ne sont pas exprimées par les cellules de la tumeur. La structure du CAR a donc été optimisée par l'ajout d'un domaine de costimulation CD28 ou 4-1BB permettant une amélioration significative des fonctions effectrices, de l'expansion et de la survie *in vivo* des lymphocytes CAR-T. Ce sont ces cellules CAR-T de seconde génération qui sont à l'origine du succès thérapeutique actuel dans les hémopathies lymphoïdes B. La cible antigénique choisie fut le CD19 en raison de son expression restreinte et conservée dans la lignée lymphoïde B. Les premiers essais cliniques menés chez l'homme ont été réalisés chez des malades atteints de leucémies aiguës lymphoblastiques B réfractaires. Les essais intéressant la population des lymphomes B agressifs ont rapidement suivi.

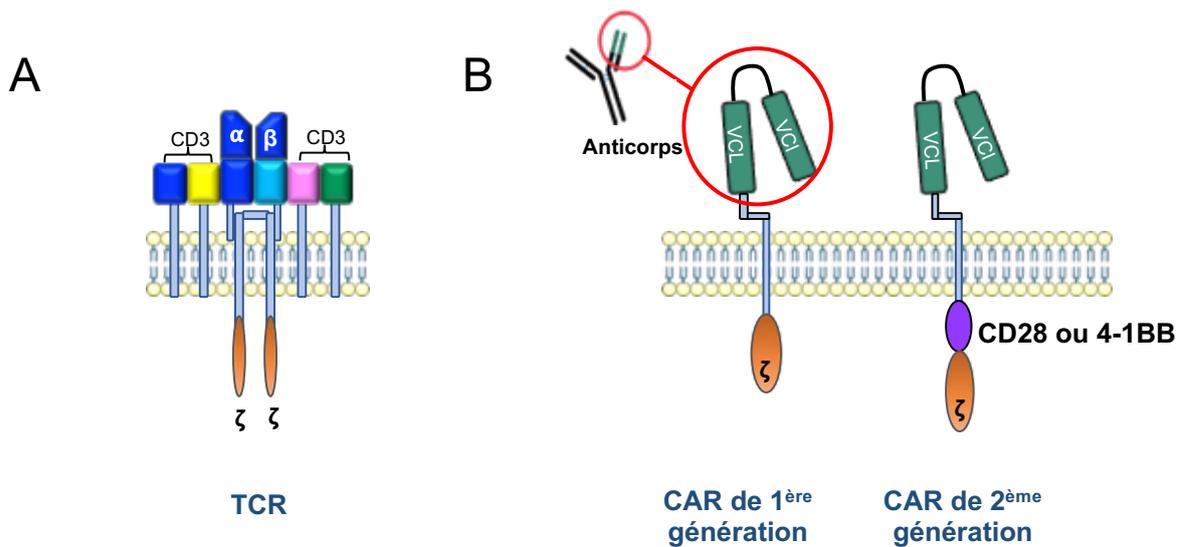


Figure 2 - Schéma comparatif du TCR (récepteur des cellules T) et des CAR (récepteur antigénique chimérique) de 1^{er} et 2^{ème} générations.

A. Au sein du complexe TCR, la reconnaissance du couple antigène/complexe majeur d'histocompatibilité est assurée par les chaînes α et β tandis que la transduction du signal activateur est réalisée, entre autres, par la chaîne ζ du TCR. **B.** La construction du CAR comprend les domaines variables des chaînes lourde (VCL) et légère (VCI) d'un anticorps permettant une reconnaissance de l'antigène indépendamment du CMH. Cette partie est reliée, via un domaine transmembranaire, à une partie intracellulaire de signalisation composée de la chaîne ζ (CAR de 1^{ère} génération) associée au domaine activateur des molécules de costimulation CD28 ou 4-1BB (CAR de 2^{ème} génération).

2. Déroulement de la thérapie cellulaire par lymphocytes CAR-T

Le processus de fabrication des cellules CAR-T débute par le prélèvement des cellules mononuclées du sang périphérique par aphérèse (**Figure 3**). Ce matériel de leucaphérèse subit ensuite une étape de sélection et d'activation des lymphocytes T au moyen de billes magnétiques couplées à des anticorps anti-CD3 et anti-CD28. Les cellules T sont ensuite transduites par un vecteur viral (vecteur lentiviral ou rétroviral) permettant l'intégration d'un transgène codant pour le CAR au sein du génome cellulaire. Les lymphocytes exprimant le CAR à leur surface membranaire sont ensuite amplifiés en culture jusqu'à l'obtention du nombre de cellules désiré, avant d'être finalement congelés.

En attendant la fabrication de cellules CAR-T anti-CD19 autologues, les médecins ont généralement recours à un traitement d'attente afin de contrôler ces maladies souvent très agressives. Une fois le produit cellulaire prêt, les patients sont hospitalisés pour bénéficier d'une chimiothérapie de conditionnement, appelée aussi lymphodéplétion (LD), qui repose habituellement sur des perfusions de FLUDARABINE (25 à 30 mg/m²) et CYCLOPHOSPHAMIDE (300 à 500 mg/m²) pendant 3 jours successifs. Deux jours de pause

sont ensuite observés avant la décongélation et l'administration des cellules CAR-T au patient via une voie veineuse périphérique. S'ensuit une période de 10 à 14 jours de surveillance en raison de la potentielle survenue d'effets secondaires bien spécifiques (abordés ci-dessous).

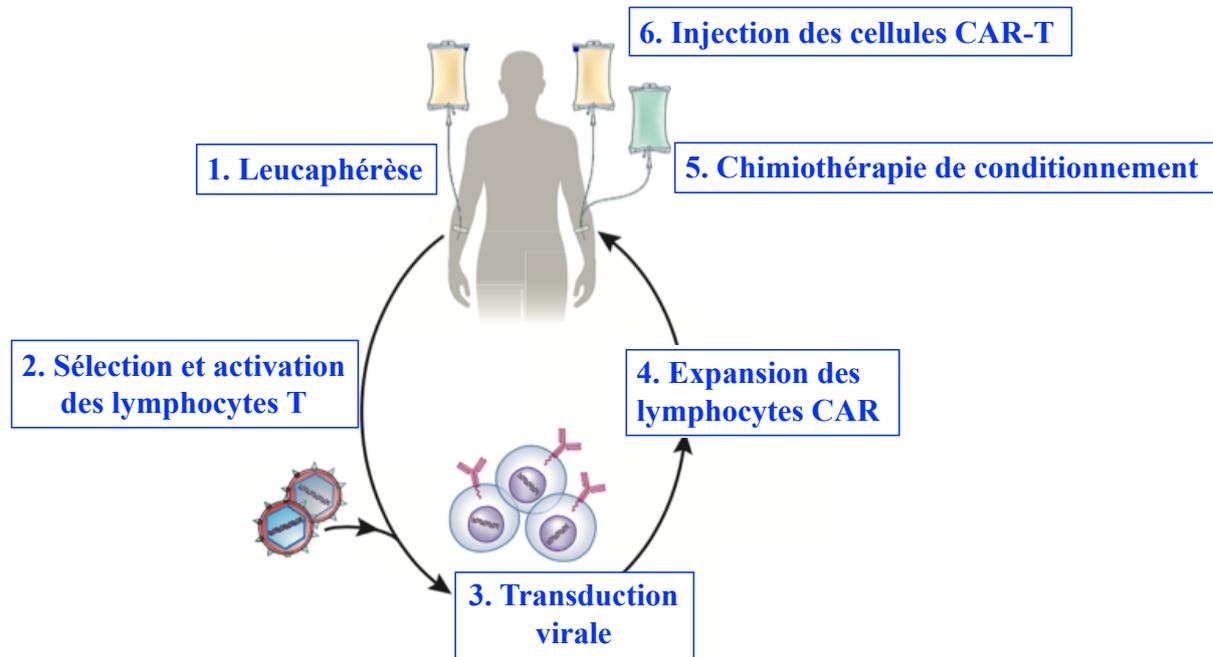


Figure 3 - Processus de fabrication des cellules CAR-T.

Les lymphocytes du patient sont récoltés par leucaphérèse puis la population de cellules T est activée par des billes anti-CD28 et CD3 avant d'être incubée en présence de vecteurs rétroviraux contenant le transgène CAR au sein de leur génome viral. Les lymphocytes T ainsi transduits et génétiquement modifiés sont cultivés puis congelés. Après une chimiothérapie de conditionnement, les cellules CAR-T sont réinjectées au patient pour exercer leur effet anti-tumoral.

3. Effets secondaires précoces

Cette classe thérapeutique est responsable de toxicités aiguës (< 1^{er} mois après injection) qui lui sont propres. Il s'agit du syndrome de relargage cytokinique (SRC) et de la neurotoxicité (NT), deux complications directement reliées aux réponses immunitaires déclenchées par les cellules CAR-T. Le SRC apparaît généralement pendant la première semaine suivant l'injection des cellules CAR alors que la NT survient plutôt durant la deuxième semaine. Une fièvre généralement très élevée (=grade 1), une hypotension et/ou une hypoxie (=grade 2) voire des défaillances d'organes (=grade 3-4) constituent les manifestations cliniques du SRC. La NT crée une confusion, une dysgraphie, des tremblements (=grade 1), voire une aphasie et une somnolence (= grade 2) en rapport avec une encéphalopathie qui peut provoquer un coma et/ou des crises tonico-cloniques généralisées (= grade 3-4) dans les cas les plus sévères. Malgré leur générale réversibilité, une proportion non négligeable de patients subit des toxicités sévères

mettant ainsi leur vie en danger. Selon les données rapportées dans les essais cliniques et en vie réelle, environ 80 % des patients ont présenté un SRC de tout grade dont 10% de grade 3 ou plus et environ 30% une NT dont 10% de grade 3 ou plus.

D'un point de vue physiopathologique, l'interleukine (IL)-6 a un rôle crucial dans le SRC, d'où l'utilisation du TOCILIZUMAB (un anticorps bloquant le récepteur de l'IL-6) à visée thérapeutique. Brièvement, les cellules CAR-T activées par la tumeur sécrètent des cytokines telles que l'interféron γ qui vont alors activer les macrophages devenant des puissants producteurs de cytokines pro-inflammatoires (dont l'IL-6) responsables des symptômes suscités, un peu à la manière de ce qui se passe dans un syndrome d'activation macrophagique⁴ (**Figure 4**). Cette tempête cytokinique va ensuite modifier la perméabilité de la barrière hémato-encéphalique et ainsi faire le lit de la NT. Le passage dans le système nerveux central des cytokines et des lymphocytes CAR-T (pouvant être aussi activés par un CD19 endogène⁵) activerait la microglie et entrainerait des dommages neuronaux (pour revue détaillée cf Morris *et al*, *Nature*, 2021⁴). Le mécanisme de la NT est nettement moins bien compris que celui du SRC et de ce fait, son traitement repose sur une immunosuppression globale par corticostéroïdes.

Un certain nombre de facteurs semble associé à la survenue de toxicités plus sévères. Les patients présentant un état très inflammatoire avant traitement, évalué par un taux de CRP ou de ferritine élevés ont plus de risques de développer des SRC ou NT sévères⁶. Il en va de même pour les fortes masses tumorales, reflétées par la LDH, probablement en raison d'une intense activation des cellules CAR-T⁷. Enfin, les éléments de la structure du CAR, notamment la nature du domaine de costimulation, semblent influencer sur le degré de sévérité des toxicités mais ces données sont à interpréter avec prudence car nous ne disposons pas encore de données comparatives directes (**Tableau 1**).

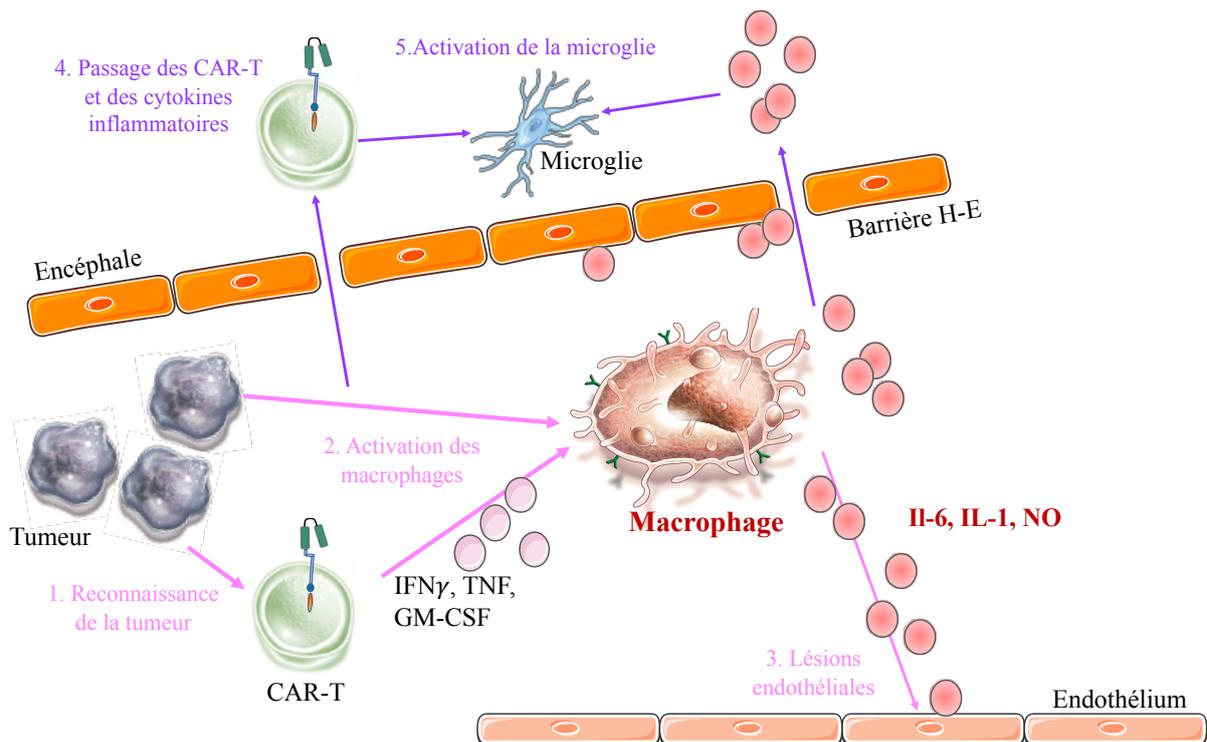


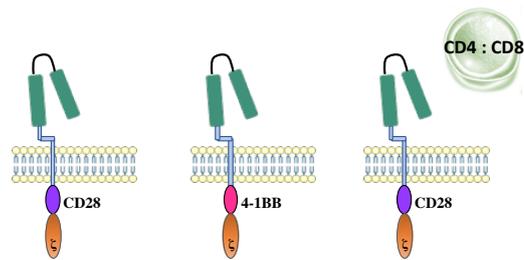
Figure 4 - Mécanismes physiopathologiques du syndrome de relargage cytokinique et de la neurotoxicité induits par les cellules CAR-T.

De façon simplifiée, les cellules CAR-T reconnaissent l'antigène tumoral CD19, ce qui entraîne leur activation, point de départ des toxicités. Les cytokines, tel que l'interféron γ , suractivent alors les macrophages, déjà activés par la tumeur. Les macrophages vont sécréter les cytokines clés associées à la survenue des toxicités, à savoir l'IL-6, l'IL-1 et le NO (monoxyde d'azote). Elles vont notamment engendrer l'état fébrile, et éventuellement des dommages endothéliaux à l'origine des défaillances d'organes. Sous leur effet, la barrière hémato-encéphalique (H-E) devient également perméable permettant le passage des cellules CAR-T et des cytokines dans l'encéphale, activant à leur tour la microglie, à l'origine de l'encéphalopathie.

4. Résultats cliniques obtenus après traitement par les cellules CAR-T anti-CD19 dans les lymphomes à grandes cellules B

De 2017 à 2020, 3 essais cliniques princeps de phase I/II, nommés ZUMA-1, JULIET et TRANSCEND ont démontré l'efficacité spectaculaire des 3 produits de thérapie cellulaire CAR-T respectivement évalués, Axicabtagene ciloleucel (Axi-cel), Tisagenlecleucel (Tisa-cel) et Lisocabtagene maraleucel (Liso-cel) ^{8,9,10} (**Tableau 1**). Axi-cel, Tisa-cel et Liso-cel ont ainsi très rapidement obtenu une approbation par la FDA (*Food and Drug Administration*) pour le traitement de 3^{ème} ligne ou plus des LGCB-R/R, Axi-cel étant le chef de file en 2017. La population de patients étudiée était comparable à celle de l'étude SCHOLAR-1, à savoir des patients souvent lourdement traités pour un LGCB réfractaire à deux lignes de chimiothérapie ou plus ou en rechute dans les 12 mois suivants une ACSH. Malgré des divergences dans le

concept de ces 3 études concernant les traitements autorisés, les produits de CAR-T et les patients traités, les taux de réponse globale dans les 3 mois étaient tous impressionnants allant de 52% à 80% dont 40 à 54% de réponse complète (RC) après une seule injection de cellules CAR-T anti-CD19 (**Tableau 1**). De nombreuses équipes ont par la suite obtenu des résultats similaires en dehors des essais cliniques avec les produits CAR-T commercialisés^{11,12,13}. Outre les excellents résultats globaux, ces données ont également établi la faisabilité de ce traitement chez les patients séniors et avec comorbidités qui, rappelons-le, constituent une part majeure de la population cible. Actuellement, l'émergence des données issues du suivi à long terme met en valeur l'existence de rémission complète persistante chez environ 40% des patients traités dans les essais ZUMA-1 (suivi médian de 51 mois) et JULIET (suivi médian de 40 mois)^{14,15}. Il semble que la majorité des patients en réponse à 1 an, le soit encore à 5 ans, laissant entrevoir un espoir de guérison¹⁶. Fortes de leur succès, les cellules CAR-T s'attaquent désormais au standard de la 2^{ème} ligne thérapeutique des LGCB, à savoir l'ACSH.



	ZUMA-1 Axi-cel	JULIET Tisa-cel	TRANSCEND Liso-cel	Hors essai clinique (CHLS) Axi-cel et Tisa-cel
Nombre de patients	101	111	269	61
Chimiothérapie d'attente	Non	Oui	Oui	Oui
Sous-types de lymphome	LPM, LDGB, LFtr, LZMtr, SNC-	LDGB, LFtr, LZMtr, CNS- 27% D/T-hit	LPM, LDGB, LFtr, LZMtr SNC+/-	LPM, LDGB, LFtr, LZMtr SNC-
Suivi médian (mois)	15,4	14	18,8	5,7
Meilleur taux de réponse globale (%)	82	52	73	63
Meilleur taux de réponse complète (%)	54	40	53	48
Médiane de survie sans progression (mois)	5,8	2,8	6,8	3
Médiane de survie globale (mois)	NA	12	21,1	11,8
Médiane de durée de réponse (mois)	11,1	NA	NA	-
SRC (%) dont grade ≥ 3	93 - 13	58 - 22	42 - 2	28 - 10
NT (%) dont grade ≥ 3	64 - 28	21 - 11	30 - 10	85 - 8

Tableau 1 - Récapitulatif des principaux résultats des 3 essais cliniques pivots et des données en « vie réelle » du CHU de Lyon Sud.

Abréviations : lymphome diffus à grandes cellules B (LDCB), lymphome folliculaire transformé (LFtr), lymphome de la zone marginale transformé (LZMtr) et lymphome B primitif du médiastin (LBPM), système nerveux central (SNC) + (envahi) ou – (non envahi), lymphome double ou triple-hit (D/T-hit). Les résultats hors essais sont ceux publiés par *Sesques et al*, AJH, 2020.

C. Les principaux facteurs impactant l'efficacité des cellules CAR-T

En dépit des résultats spectaculaires jamais obtenus dans cette population de patients multi-traités, un peu plus de 50% des patients vont rechuter et ce, principalement dans la première année suivant l'administration des cellules CAR-T. Actuellement, il est encore difficile d'expliquer pourquoi certains patients vont présenter des réponses impressionnantes aux cellules CAR-T tandis que d'autres patients vont y être résistants.

Voici un bref aperçu de l'état des connaissances concernant les mécanismes déjà décrits comme impactant l'efficacité des cellules CAR-T dans les lymphomes agressifs (**Figure 5**). Dans un effort de clarté, ces mécanismes seront abordés selon leur lien avec l'hôte, la tumeur ou le produit CAR-T bien que l'ensemble de ceux-ci soit présumé interdépendant.

1. Les facteurs liés au produit cellulaire CAR-T

Les étapes de fabrication du produit de thérapie cellulaire semblent soumises à une apparente variabilité inter-individuelle. L'analyse de l'expression du CAR au sein des cellules des poches avant réinjection a montré une importante hétérogénéité dans les taux de transduction, allant de 20 à 70% selon les patients. Malgré les doses standardisées au poids, il est évident que la quantité absolue de cellules CAR⁺ varie d'un patient à l'autre, ce qui pourrait sous-tendre une baisse d'efficacité clinique pour les produits les moins riches en CAR-T. Des données publiées dans l'essai JULIET vont à l'encontre de cette hypothèse. En effet, plusieurs patients ont bénéficié d'un produit cellulaire « non conforme » c'est-à-dire ne répondant pas aux exigences définies en termes de viabilité cellulaire et de proportion de cellules CAR⁺. Pourtant, leurs analyses ont révélé des taux de réponse comparables à ceux des patients traités selon les normes de Tisa-cel¹⁷. De plus, dans l'essai de phase I TRANSCEND, aucune différence d'efficacité n'a été observée entre les 3 doses de cellules CAR testées ($0,5 \cdot 10^8$; $1 \cdot 10^8$ et $1,5 \cdot 10^8$ cellules) ce qui a conduit à leur analyse globale pour l'essai de phase II¹⁰.

Par ailleurs, bien que très peu étudié, il a également été suggéré que le site d'insertion du transgène CAR dans le génome cellulaire pourrait modifier l'intensité d'expression du CAR. Les niveaux d'activation, de prolifération et de persistance subséquents des cellules CAR-T pourraient ainsi varier à l'instar de ce qui a été décrit pour un patient traité pour une leucémie lymphoïde chronique et dont l'insertion du CAR avait aboli l'expression du gène TET2 à

l'origine d'une différenciation des CAR-T en cellules « mémoires centrales » et d'une réponse thérapeutique complète¹⁸.

Enfin, la réponse au traitement semble essentiellement influencée par la composition en sous-types lymphocytaires T du produit final de CAR-T. Celle-ci pouvant être le reflet des populations présentes au moment de la leucaphérèse et/ou être dépendante des étapes de fabrication notamment lors de la stimulation des lymphocytes T. Quelle qu'en soit la raison, une forte proportion de lymphocytes T dit « mémoires centrales » est plus souvent retrouvée dans les produits CAR-T des patients ayant obtenu une réponse complète¹⁹. Cette sous-population de lymphocyte exprime le récepteur CCR7 permettant son adressage au sein des ganglions. Elle est capable d'autorenouveau favorisant le maintien à long terme des cellules CAR-T, pour enfin se différencier en cellules mémoires effectrices soutenant ainsi l'action anti-tumorale. Locke *et al.* ont confirmé l'importance des cellules « mémoires centrales » en y associant celle des cellules dites « naïves » CD45RA+, CCR7+, à l'origine d'une meilleure expansion des cellules CAR-T *in vivo*. La présence de cellules effectrices très différenciées semble moins souhaitable au sein des poches²⁰. De façon globale, on peut se questionner concernant la signification de ces données phénotypiques sur la fonctionnalité réelle de ces cellules *in vivo*. En effet, se comportent-elles vraiment comme des cellules centrales mémoires ou naïves alors qu'elles ont été fortement stimulées par des anticorps anti-CD3 et CD28 lors du processus de fabrication ?

Une fois réinjecté au patient, la « pharmacocinétique » du produit cellulaire semble primordiale pour son efficacité. Les cellules CAR-T décrivent un pic initial d'expansion dans le sang périphérique environ 7 à 10 jours après leur administration au patient. Dans les LAL B, il est clairement établi que l'intensité de la multiplication des CAR-T est associée à la réponse anti-tumorale. Dans les LGCB, il existe aussi de nombreuses publications relatant de l'association entre expansion et réponse. Les déterminants de cette expansion seront discutés à plusieurs reprises au sein des paragraphes ultérieurs. Cependant, certaines données de la littérature montrent que des patients peuvent être en réponse sans pic détectable de cellules CAR-T^{21,22,23}. On pourrait expliquer les discordances entre les 2 maladies de cette manière : dans les LGCB, les cellules CAR-T se situeraient préférentiellement au sein des ganglions et des tissus afin de combattre la tumeur alors que dans les LAL B, les cellules CAR-T exerceraient leur action dans le sang et la moelle osseuse où se trouvent les blastes.

Enfin, la persistance des cellules CAR-T joue certainement un rôle dans la surveillance immunitaire continue associée aux rémissions durables. Encore une fois, l'association entre rémission prolongée et détection prolongée du transgène CAR dans le sang est évidente dans

les LAL B mais moins évidente dans les LGCB, vraisemblablement pour les mêmes raisons de localisation tissulaire prédominante. Par exemple, l'équipe de S. Shuster a décrit l'absence de détection du CAR dans le sang plusieurs mois après l'injection chez plus de la moitié des patients pourtant en rémission prolongée¹⁶.

2. Les facteurs liés au patient

L'état du système immunitaire de l'hôte avant l'initiation du traitement impacte l'efficacité des cellules CAR-T. Les cellules myéloïdes immunosuppressives (MDSC) sont actuellement très étudiées pour leur rôle clé dans l'échappement tumoral vis-à-vis du système immunitaire. Les MDSC exercent leur fonction immunosuppressive de multiples façons *i.e* en induisant la différenciation des lymphocytes en cellules T régulatrices, en favorisant la polarisation M2 des macrophages ou encore en rendant anergiques les cellules Natural Killer (NK). Cependant, leur mécanisme d'action principal reste l'inhibition des lymphocytes T CD8 intra-tumoraux. Afin de soutenir la progression tumorale, les tumeurs solides tout comme les lymphomes perturbent la myélopoïèse de façon à promouvoir la différenciation en MDSC²⁴. Au même titre que les lymphocytes endogènes, les cellules CAR-T sont susceptibles de voir leurs fonctions supprimées par les MDSC. L'équipe de Frederick L. Locke a pu montrer que les patients non-répondeurs au traitement par CAR-T présentaient des taux plus élevés de MDSC circulantes avant LD. La chimiothérapie de LD n'était efficace que transitoirement puisque des taux de MDSC similaires à ceux avant LD étaient observés 10 jours après la chimiothérapie²⁵. Les forts taux de MDSC étaient aussi négativement corrélés à l'expansion des cellules CAR-T²⁶. Enfin, il reste à déterminer si les MDSC présentes à la leucaphérèse sont également capables d'impacter négativement la production des cellules CAR-T. La présence de monocytes dans le sac de leucaphérèse est responsable d'une transduction moins efficace entraînant une faible expression du CAR et d'une cytotoxicité atténuée des cellules CAR. Il n'est pas exclu que cet effet soit en partie médié par les MDSC²⁷.

La chimiothérapie de conditionnement appelée également lymphodéplétion (LD) semble capitale dans l'obtention du succès thérapeutique par cellules CAR-T, à l'instar des thérapies basées sur les transferts de lymphocytes T autologues. En effet, certains patients lymphopéniques n'ayant, à ce titre, pas bénéficié de LD dans l'essai JULIET ont eu un taux de réponse globale divisé par deux (soit 25%) par rapport au reste de la cohorte²⁸. Les mécanismes à l'origine de cet effet bénéfique de la LD semblent multiples et ne sont certainement pas cantonnés à la « simple » action anti-tumorale directe de la chimiothérapie. En effet, il a été

montré que le conditionnement éradique les cellules immunosuppressives telles que les lymphocytes T régulateurs et les cellules myéloïdes suppressives (MDSC pour *myeloid-derived suppressor cells*). Il modifie le microenvironnement tumoral via la surexpression de molécules co-stimulatrices et la sous-régulation de molécules suppressives tel que l'enzyme indoleamine 2,3-dioxygénase (IDO). De plus, il élimine les lymphocytes endogènes périphériques et entraîne une hausse de cytokines clés pour l'action des lymphocytes T tels que l'IL-15 et l'IL-7. Enfin, le conditionnement permet une meilleure expansion, fonctionnalité et survie des cellules CAR-T²⁹. Des données récentes ont montré que l'intensité de la LD engendre l'apparition de ce profil cytokinique d'IL-15/IL-7, qui dans le contexte de baisse des lymphocytes endogènes du patient, va pouvoir pleinement bénéficier aux lymphocytes T CAR injectés^{30,31,32}. De façon plus marginale, il a également été suggéré que la lymphopénie induite par la LD évitait le « rejet » des cellules CAR-T en empêchant la mise en place d'une réponse immune dirigée contre la partie murine du CAR³⁰.

3. Les facteurs liés à la tumeur

Une des limitations du CAR est la reconnaissance des antigènes uniquement présents à la surface des cellules. Ainsi, la perte du CD19 membranaire est un mécanisme très bien caractérisé de rechute dans les LAL B. Très peu de données sont disponibles concernant les LGCB du fait du frein à la réalisation d'une nouvelle biopsie pour évaluer l'expression du CD19 à la rechute. La sélection de cellules n'exprimant pas CD19 à la membrane apparaît être un mécanisme d'échappement tumoral plutôt minoritaire dans les LGCB, survenant chez 10 % à 30 % des patients en rechute selon les études^{33,8}. Pour aller plus loin, initialement, faut-il sélectionner les tumeurs sur leur statut CD19⁺ ? La majorité des données de la littérature plaide en faveur d'une telle sélection mais il persiste des contradictions comme l'essai ZUMA-1 qui a rapporté l'indépendance des réponses vis-à-vis de l'expression du CD19 et de son intensité avant traitement⁸. De plus amples études sont nécessaires pour établir l'importance de l'antigène reconnu par les CAR dans les résultats cliniques obtenus, et également pour répondre à la question controversée du rôle tenu par les autres lymphocytes T poly-spécifiques associés aux CAR-T.

Les patients dont le volume tumoral initial est élevé présentent des réponses de moins bonne qualité et ont plus de risque de rechuter précocement^{34,35}. Cependant, un nouveau concept basé sur le ratio entre la quantité des cellules effectrices CAR et la quantité des cellules cibles

tumorales émerge depuis peu. Il semble que le pronostic péjoratif attribué aux tumeurs à fort volume puisse être surmonté par la forte expansion initiale des cellules CAR-T. En effet, la probabilité de réponse durable semble associée positivement au volume tumoral via la stimulation de la multiplication des CAR-T³⁶.

Pour finir, à une échelle plus fine, le microenvironnement tumoral affecte l'action des cellules CAR-T. Les dérégulations immunes observées en son sein résultent principalement de l'inflammation chronique secondaire aux tumeurs. Tout d'abord, il semble que certaines tumeurs soient plus ou moins permissives à la pénétration des lymphocytes CAR-T, les empêchant ainsi d'agir. Les patients dont les biopsies post-traitement montrent un important infiltrat de lymphocytes CAR-T mais aussi non CAR, ont plus de chance d'être en rémission durable^{37 38}. Ensuite, la nature de l'infiltrat immun intra-tumoral avant traitement est différent entre les patients qui vont obtenir une rémission et ceux qui n'en obtiennent pas. La présence initiale de cellules T fonctionnelles et l'absence de macrophages sont associées aux rémissions prolongées par cellules CAR-T. Les macrophages intra-tumoraux immunosuppresseurs semblent capables de modifier le microenvironnement tumoral en soutenant l'activation continue de la voie de signalisation de l'interféron. Il en résulte alors la surexpression des molécules de points de contrôle immunitaire à l'origine de la perte de fonctionnalité des lymphocytes T. Ce mécanisme de résistance semble œuvrer dans les non-réponses aux CAR-T comme suggéré par la mise en évidence d'une surexpression de PD-L1 (pour *Programmed death-ligand 1*) dans le microenvironnement lymphomateux. Cette surexpression est elle-même corrélée à la faible multiplication des cellules CAR-T *in vivo*.

En conclusion, des progrès indéniables ont été réalisés dans l'identification des mécanismes de résistances aux cellules CAR-T. Dans la littérature, une grande partie des données repose sur l'étude des LAL B³⁹. La transposition des mécanismes décrits dans les LAL B, vers le monde des lymphomes n'est pas si évidente. Le comportement des CAR-T, la nature des cellules tumorales et le type de patient ne sont à l'évidence pas comparables. De plus, la mise en œuvre de stratégies pour sursoir aux mécanismes de résistances, tels que l'utilisation de molécules inhibant l'axe PD-1/PD-L1 ou encore l'emploi de CAR bispécifiques (dirigés contre 2 cibles antigéniques), n'a pas encore nettement amélioré l'efficacité des CAR-T, suggérant que notre compréhension de leur fonctionnement nécessite encore des efforts. Au final, il semble difficile de se fier aux données actuelles pour sélectionner de façon robuste les patients qui vont répondre aux cellules CAR-T.

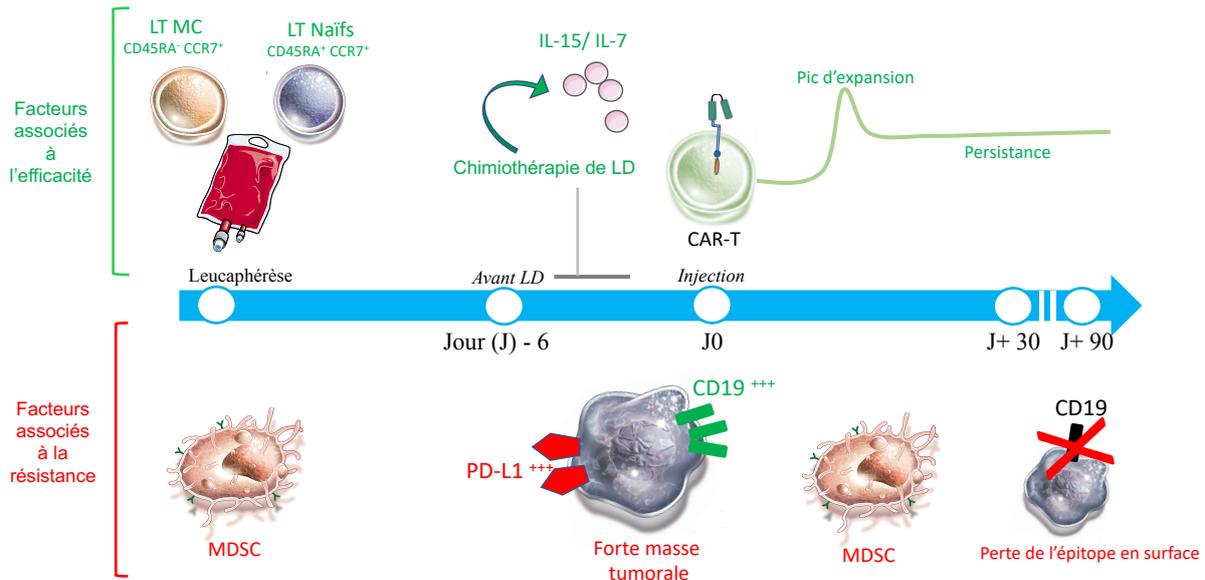


Figure 5 - Schéma des principaux facteurs impactant les réponses au traitement par cellules CAR-T anti-CD19 dans les LGCB-R/R.

Du point de vue des facteurs bénéfiques, on retiendra : 1) la présence de cellules mémoires centrales (MC) et de cellules peu différenciés dans les échantillons de leucaphérèse et au sein du produit final avant réinjection ; 2) la production d'IL-15 et d'IL7 suite à la chimiothérapie de lymphodéplétion (LD) ; 3) une forte expansion et persistance des cellules CAR-T *in vivo* ; 4) une forte expression de la cible antigénique CD19. Sur le plan des facteurs impactant négativement l'efficacité des cellules CAR-T, on notera : 1) la présence de cellules myéloïdes suppressives circulantes et au sein du microenvironnement tumoral ; 2) une forte masse tumorale avant réinjection ; 3) la surexpression des molécules de points de contrôle immunitaire tel que PD-L1 par le microenvironnement tumoral ; 4) la perte de l'expression en surface de l'antigène reconnu par le CAR.

D. Prédiction de l'efficacité des cellules CAR-T dans les LGCB-R/R en pratique clinique

Bousculant le pronostic des patients réfractaires, la thérapie par cellules CAR-T semble également balayer la plupart des facteurs pronostiques traditionnels utilisés dans les LGCB. En effet, un état général altéré avec un score élevé du *Performans Status* (PS), la nature de la cellule d'origine du lymphome B non centrogerminative (non-GC) plutôt que centrogerminative (GC), le sous-type histologique tel que les lymphomes folliculaires transformés, le caractère double ou triple *hit* (*i.e* avec translocations du gène C-MYC et du gène BCL2 et/ou BCL6), l'âge avancé du patient, le caractère réfractaire primaire à la chimiothérapie ou encore le stade Ann Arbor disséminé de la maladie, ne permettent pas de prédire la réponse et la survie des patients traités par cellules CAR-T^{8,10,15}. Au sein du score pronostique usuel IPI (*International Prognostic Index*) comprenant le taux de LDH, le stade Ann Arbor et le PS, seul le dosage de LDH supérieur à la normal avant traitement conserve son pouvoir pronostique de façon indiscutable.

Ce marqueur biologique est considéré comme un indicateur de la masse tumorale initiale. Une valeur de CRP supérieure à 30 mg/L, reflet de l'inflammation chronique tumorale, est également prédictive de l'efficacité par cellules CAR-T¹¹. Corroborant ces données biologiques, un haut volume tumoral métabolique (MTV) déterminé sur la tomographie par émission de positons (TEP) initiale discrimine un sous-groupe de patient au pronostic défavorable⁴¹.

Disposer de nouveaux marqueurs prédictifs de l'efficacité du traitement par cellules CAR-T s'avère nécessaire afin d'être notamment en mesure de proposer une prise en charge personnalisée aux patients. La catégorie de patients à risque d'inefficacité pourrait ainsi bénéficier d'un suivi plus rapproché et/ou d'une thérapie de consolidation. A l'extrême, une alternative thérapeutique aux cellules CAR-T pourrait être envisagée en amont.

E. Objectifs du travail de thèse

Depuis maintenant plusieurs années, les biomarqueurs se sont imposés en tant que données fondamentales pour la médecine personnalisée notamment en oncologie. Selon le *National Institute of Health*, un biomarqueur se définit comme « une caractéristique biologique mesurée de façon objective et évaluée comme un indicateur soit de processus biologiques normaux ou pathologiques, soit de réponses pharmacologiques résultant d'une intervention thérapeutique ».

Dans le domaine de la thérapie cellulaire par CAR-T, nous avons vu que nous disposons de très peu de biomarqueurs facilement dosables en pratique quotidienne. De plus, ils semblent essentiellement rattachés à la tumeur. Cette difficulté à établir des biomarqueurs fiables pour la prédiction de l'efficacité mais aussi des toxicités du traitement par cellules CAR-T est inhérente aux mécanismes de fonctionnement bien spécifiques de ce « médicament vivant ».

Dans cette étude, nous avons adopté une démarche largement exploratoire afin d'identifier de nouveaux biomarqueurs potentiels capables de prédire l'efficacité, la rechute et les toxicités sévères des patients traités par cellules CAR-T pour un LGCB R/R. Nous avons ainsi réalisé une analyse rétrospective portant sur un large panel de paramètres biologiques hématologiques et biochimiques, disponibles en pratique courante.

Au-delà du bénéfice escompté pour l'identification précise des patients répondeurs aux cellules CAR-T et des patients à risque de toxicité sévère, les objectifs secondaires de ce travail étaient *i.* d'ouvrir de nouvelles pistes de réflexion sur les mécanismes d'action de la thérapie

par CAR-T encore peu compris ; *ii.* de faire progresser notre pratique médicale quotidienne en définissant les paramètres biologiques dont le dosage systématique n'apporte pas de valeur spécifique à la prise en charge des patients traités par cellules CAR-T.

MATERIELS et METHODES

A. Patients et procédure thérapeutique

Tous les cas de lymphomes à grandes cellules B traités par cellules CAR-T au Centre Hospitalier Universitaire de Lyon Sud (CHLS) de janvier 2017 à octobre 2020 ont été inclus dans cette étude. Cette cohorte (n=108) se superpose partiellement à la précédente étude de cohorte de patients (n=61) publiée par l'équipe d'hématologues du CHLS¹¹. Nous avons exclu secondairement un patient en raison de la présence de lymphocytes tumoraux circulants de façon majoritaire dans le sang périphérique. Tous les patients (n =107) étaient donc atteints par un LGCB comprenant les lymphomes diffus à grandes cellules B (LDGCB), les lymphomes folliculaires transformés (LFtr), les lymphomes de la zone marginale transformés (LZMtr) et les lymphomes B primitifs du médiastin (LBPM). Ces LGCB répondaient à la définition du caractère réfractaire, à savoir l'absence de réponse à la dernière ligne thérapeutique ou étaient en rechute précoce dans les 12 mois suivant une autogreffe de cellules souches hématopoïétiques. Les cellules CAR-T anti-CD19 représentaient au minimum la 3^{ème} ligne thérapeutique pour ces patients. Le traitement a été conduit au sein d'essais cliniques (n=16) ou en vie réelle (AMM n=69 ; ATU n=22) selon la même procédure globale (**Figure 6**). Les patients avaient bénéficié d'une aphérèse puis d'une chimiothérapie d'attente dans la majorité des cas. Une fois le produit de thérapie cellulaire final reçu au CHLS, les patients étaient hospitalisés pour l'initiation de la chimiothérapie de lymphodéplétion par FLUDARABINE et CYCLOPHOSPHAMIDE puis les cellules CAR-T étaient réinjectées. Les effets secondaires à type de SRC et NT étaient renseignés et classés par gravité selon l'échelle de l'ASTCT⁴². Dans ce travail de thèse, nous avons analysé une seconde cohorte de patients (n=25) ayant bénéficié de dosages réguliers des cellules CAR-T après réinjection, cette donnée n'étant pas disponible pour la cohorte initiale.

B. Évaluation des réponses aux cellules CAR-T

Les niveaux de réponses au traitement étaient classés selon les critères de Lugano 2014 après analyse des images des TEP réalisées 1 mois et 3 mois après la réinjection des cellules CAR-T⁴³. Les patients « répondeurs » étaient ceux ayant acquis comme meilleure réponse à 1

et/ou 3 mois, une réponse complète (RC) ou partielle (RP) tandis que les patients « non-répondeurs » avaient une maladie progressive ou stable lors des évaluations précoces par TEP.

C. Variables biologiques

L'ensemble des paramètres biologiques et cliniques ont été recueillis rétrospectivement dans les dossiers des patients. Une trentaine de paramètres biologiques facilement disponibles en pratique courante a été explorée dans cette cohorte (**Tableau 4** en Annexes). Les valeurs des dosages ont été principalement analysées au moment de débiter la lymphodéplétion soit 6 jours avant la réinjection des cellules CAR-T. Le recueil de ces paramètres biologiques a également été effectué à différents temps après injection des cellules CAR-T [Jour (J)+1, J+8, J+15, J+30 et J+90] bien que la majorité de ces données n'a pas pu être encore exploitée. Le jour de la réinjection des cellules CAR-T correspond au jour 0.

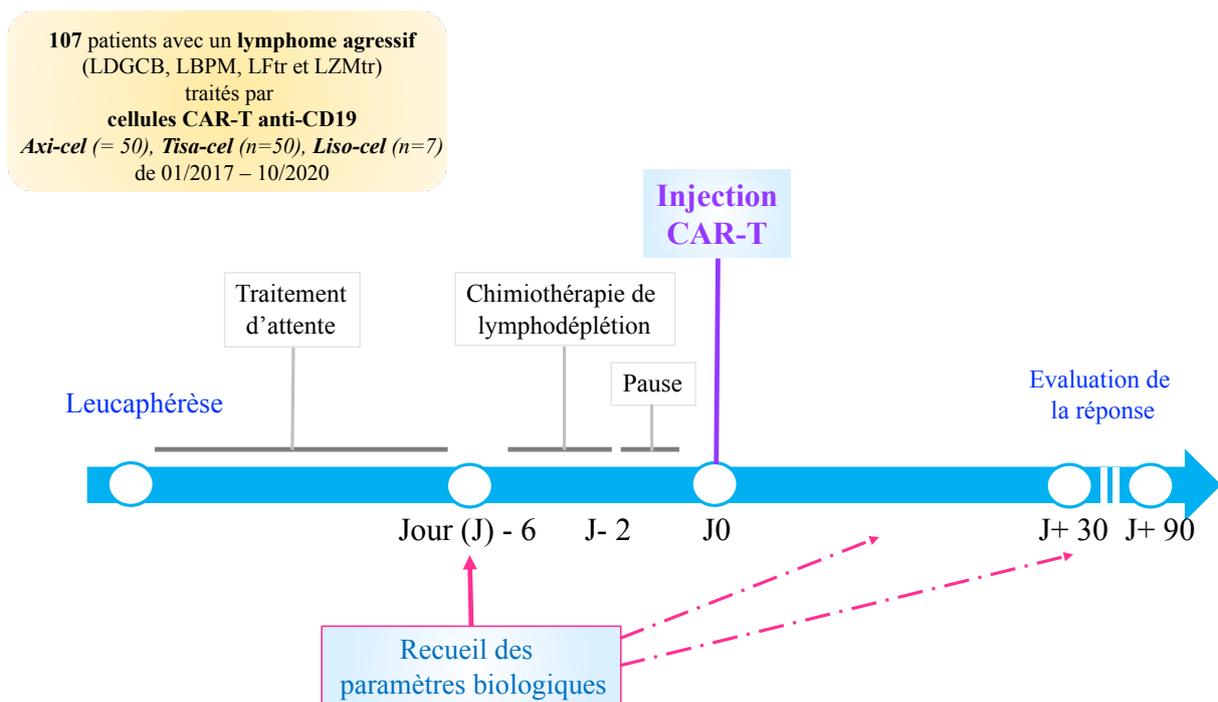


Figure 6 - Schéma résumant le déroulement de la prise en charge des patients traités par cellules CAR-T au sein de notre étude.

L'étude rétrospective a porté sur 107 patients atteints par un lymphome agressif réfractaire ou en rechute traités par cellules CAR-T au CHU de Lyon Sud de janvier 2017 à octobre 2020. Les paramètres biologiques ont essentiellement été recueillis rétrospectivement avant la lymphodéplétion soit 6 jours avant la réinjection des cellules CAR-T (= Jour 0). Les réponses ont été évaluées par TEP 1 mois et 3 mois après la réinjection.

D. Analyses de cytométrie en flux

Le nombre de lymphocytes T CD3 CD4⁺ CD8⁺, de cellules NK et de lymphocytes B a été évalué sur des échantillons de sang total prélevés chez les patients à différents temps avant (jour -6) et après l'injection des cellules CAR-T (jours +8, +15, +30 et +90). Le dosage des lymphocytes CAR-T a également été réalisé régulièrement (jours +8, +15, +30 et +90) à partir de sang total prélevé chez 24 patients traités à partir d'octobre 2020. Ce nombre a été analysé au sein de la population de lymphocytes totaux T CD3. Après avoir été marquées par les différents anticorps couplés à des fluorochromes, les cellules ont été acquises sur un cytomètre en flux de type Navios puis les résultats ont été analysés par l'équipe d'immunologistes du CHU de Lyon Est à l'aide du logiciel associé.

E. Méthodes statistiques

Les variables explicatives ont été analysées selon leurs tertiles (*i.e* divisées en 3 sous-groupes de taille équivalente), avec le groupe du tertile 1 comprenant les valeurs du minimum jusqu'au 1^{er} tertile ; le groupe du tertile 2 comprenant les valeurs entre le 1^{er} et le 2^{ème} tertiles et le groupe du tertile 3 comprenant les valeurs supérieures au 2^{ème} tertile jusqu'à la valeur maximale (**Tableau 4** en Annexes). Parfois lorsque le nombre de données était trop faible, les variables ont été divisées en 2 catégories selon leur médiane de distribution.

La survie sans progression (SSP) a été mesurée depuis la date de l'injection des cellules CAR-T jusqu'à la date de décès de toutes causes, de rechute, de progression, ou la date du dernier contact. La survie globale (SG) a été calculée depuis la date de l'injection des cellules CAR-T jusqu'à la date de décès de toutes causes ou la date du dernier contact. La durée de réponse globale (DR) a été établie depuis la date de la première réponse documentée (réponse complète [RC] ou réponse partielle [RP]) jusqu'à la date de décès de toutes causes, de rechute, de progression ou la date du dernier contact. La SG, la SSP et la DR ont été représentées selon la méthode de Kaplan-Meier. Le test du log-rank a été utilisé pour comparer les courbes de survie de différents groupes. Les associations entre la SG, la SSP, la DR et les différentes variables ont été estimées à l'aide d'un modèle de Cox univarié. Les variables biologiques dont la valeur *p* était inférieure à 0,05 en univarié ont été intégrées dans le modèle de Cox multivarié.

Pour évaluer la dépendance entre 2 variables, un test de corrélation de Pearson a été utilisé en s'assurant au préalable de la distribution normale des variables.

Les tests non paramétriques de Mann-Witney-Wilcoxon et de Kruskal-Wallis ont été respectivement utilisés pour comparer la distribution de variable entre deux ou au moins trois groupes. Une régression logistique a été réalisée pour tester la relation entre les variables et les réponses cliniques ou les toxicités aux cellules CAR-T. Une régression logistique multinomiale a été utilisée lorsque la variable à expliquer était catégorisée selon différentes modalités. Une valeur $p < 0,05$ était considérée comme statistiquement significative. Les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel R (version 4.0.2).

RESULTATS

A. Caractéristiques de la population

Au sein de notre cohorte, les caractéristiques générales des patients (n=107) avant traitement par cellules CAR-T sont résumées dans le **Tableau 2**. La médiane d'âge était de 59 ans, avec des patients âgés de 20 à 78 ans. Près d'un tiers des patients appartenait à la catégorie des séniors (>65 ans). L'état général des patients était globalement conservé avec peu de symptômes B malgré un lymphome disséminé chez 74% d'entre eux, envahissant souvent des sites extra-nodaux (68%). Sur le plan histologique, la plupart des patients présentait un LDGCB, de phénotype GC. On retrouvait 12 % de lymphomes dits « double-*hit* » c'est-à-dire porteurs de translocations impliquant les gènes C-MYC et BCL2 ou BCL6 (à noter, 69 données manquantes). Les patients avaient majoritairement bénéficié de 3 lignes thérapeutiques au préalable et un quart d'entre eux avait été traité par ACSH. Entre l'aphérèse et le début de la chimiothérapie de lymphodéplétion, 94% des patients avaient reçu un traitement dit « d'attente » en raison de maladies souvent très progressives et du délai de fabrication des cellules CAR-T, estimé à environ 40 jours.

Caractéristiques	Cohorte totale n=107
Age, en année	
Médiane (étendue)	59 (20,3-78,5)
> 65 ans, n (%)	32 (30)
Sexe (homme), n (%)	66 (62)
Cellule d'origine, n (%)	
GC	53 (50)
Non-GC	37 (34)
Symptômes B, n (%)	9 (8)
Sous-type histologique, n (%)	
LDGCB	68 (64)
LFtr	24 (22)
LZMtr	6 (6)
LBPM	9 (8)
Stade d'Ann Arbor, n (%)	
I-II	26 (24)
III-IV	79 (74)
Performans Status (PS) , n (%)	
0-1	88 (82)
2-3	19 (18)
Nombre de lignes avant leucaphérèse, n (%)	
Médiane (IIQ)	3 (2-3)
≥ 4	24 (22)
Précédente ACSH, n (%)	26 (25)
Caractère réfractaire primaire, n (%)	64 (61)
Chimiothérapie d'attente, n (%)	100 (94)
Cytogénétique (translocation) , n (%)	
Double <i>hit</i>	5 (12)
Triple <i>hit</i>	1 (3)
Site(s) extranodal(aux), n (%)	68 (68%)

Tableau 2 - Caractéristiques cliniques initiales des patients de la cohorte.

Abréviations utilisées : GC pour *germinal center* (centre germinatif) ; LDGCB pour lymphome diffus à grandes cellules B ; LFtr pour lymphome folliculaire transformé, LZMtr pour lymphome de la zone marginale transformé ; LBPM pour lymphome B primitif du médiastin ; ACSH pour autogreffé de cellules souches hématopoïétiques ; SRC pour syndrome de relargage cytokinique ; NT pour neurotoxicité. A noter, 16 données manquantes sur le sous-type histologique et environ 69 données manquantes concernant le statut double et triple *hit*.

B. Efficacité, devenir et toxicité globale du traitement par cellules CAR-T dans la cohorte

L'ensemble des résultats de survie, de réponse et de toxicité de la cohorte globale est représenté sur la **Figure 7**. Le suivi médian était de 4,6 mois soit 141 jours [Intervalle interquartile (IIQ) 84 – 271 jours]. La médiane de survie sans progression (SSP) était de 124 jours (IIQ 92 – 295) soit 4 mois et 37% des patients étaient en rémission à 1 an (**Figure 7A**). La médiane de SSP n'était pas atteinte chez les patients en réponse complète (RC) (**Figure 7B**). Chez les patients en réponse globale (RC et réponse partielle (RP)), la médiane de durée de

réponse n'était pas atteinte (**Figure 7C**). La médiane de survie globale (SG) était estimée à 12,6 mois [IIQ 11,1 – NA (non atteinte)] (**Figure 7D**). Le taux de meilleure réponse globale obtenu à 1 et/ou 3 mois était de 67% dont 51% de réponse complète et 16% de réponse partielle (**Figure 7E**). Après l'administration des cellules CAR-T, 83% des patients ont subi un SRC de tout grade dont 63% de grade 1, 17 % de grade 2 et moins de 5 % de grade ≥ 3 . Concernant la neurotoxicité, elle est survenue chez 26% des patients dont 6 % de grade ≥ 3 (n=5 pour le grade 3 et n=1 pour le grade 4) (**Figure 7F**). Au total, dans notre cohorte de 107 patients, notre analyse a montré un taux de réponse élevé et une SSP prolongée avec des toxicités acceptables pour la majorité des patients.

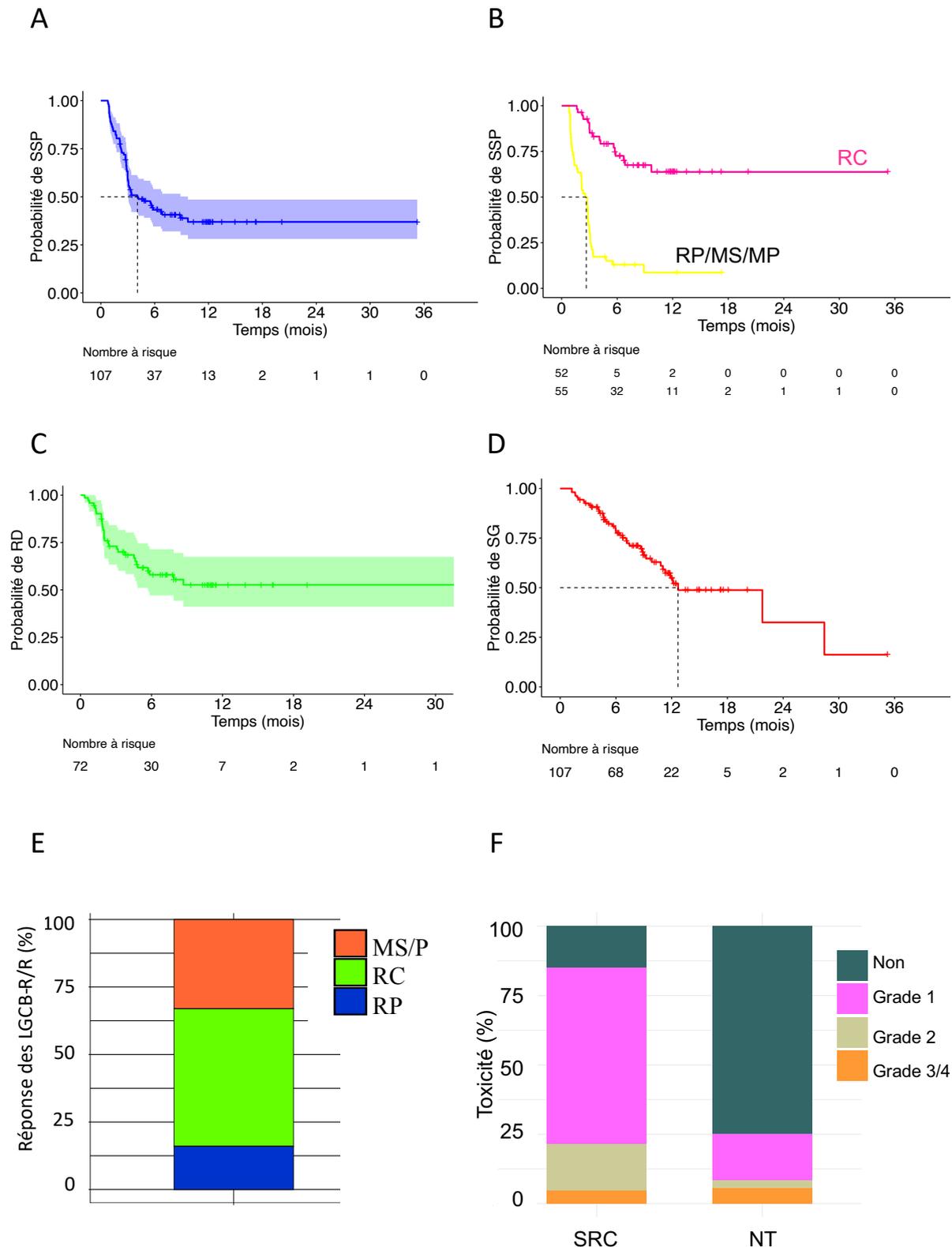


Figure 7 - Vue d'ensemble de la survie, des réponses et des toxicités observées dans la cohorte de LDGB traités au CHU de Lyon Sud.

A. Survie sans progression (SSP) de la cohorte globale. **B.** Survie sans progression (SSP) en fonction de la présence (courbe rose) d'une réponse complète (RC) ou de l'absence de RC [patients en réponse partielle (RP), maladie progressive (MP) ou maladie stable (MS) à 1 et/ou 3 mois]. **C.** Durée de réponse (DR) des patients répondeurs de la cohorte. **D.** Survie globale (SG) de la cohorte. Illustrations selon la

méthode de Kaplan Meir et comparaison réalisée par le test du log-rank. **E.** Histogramme représentant les meilleures réponses obtenues par les patients de la cohorte. Les proportions des patients en réponse complète (RC), en réponse partielle (RP) ou en maladie stable/progressive (MS/MP) à 1 et/ou 3 mois sont représentées. **F.** Histogramme des toxicités [syndrome de relargage cytokinique (SRC) et neurotoxicité (NT)] survenues dans la cohorte. Les proportions des grades de sévérité sont représentées.

C. Description des facteurs biologiques associés à la rechute

Les résultats de l'analyse univariée des paramètres biologiques sur la survie sans progression (SSP) sont résumés dans le **Tableau 3**. Les seuils de séparation choisis pour les paramètres biologiques correspondent aux valeurs des tertiles (**Tableau 4**). Cette analyse par tertile a été privilégiée par rapport à l'analyse classique selon un seuil unique de division (souvent la médiane de distribution de la variable) dans le but de démasquer d'éventuels effets-doses. Au moment d'initier la LD, les patients avec une valeur de CRP > 4 mg/L ou un taux de LDH supérieur à 315 UI/L (pour une norme à 220 UI/L) avaient significativement plus de risque de rechuter. A l'inverse, un taux faible d'acide urique (< 236 µmol/L), un dosage des triglycérides > 1,48 g/L, un ratio TCA >0,99 ou encore un taux de lymphocytes plus important (> 0,75 G/L) étaient significativement associés à un plus faible risque de rechute.

Variables	HR (IC 95%)	p valeur	Variables	HR (IC 95%)	p valeur
ALAT-1	0.90 (0.48 – 1.70)	0.75	Magnésium-1	0.72 (0.35 – 1.47)	0.37
ALAT-2	0.87 (0.44 – 1.70)	0.68	Magnésium-2	1.18 (0.61 – 2.27)	0.63
ASAT-1	0.73 (0.39 – 1.35)	0.31	Calcium-1	1.08 (0.59 – 1.96)	0.81
ASAT-2	0.70 (0.38 – 1.29)	0.26	Calcium-2	0.79 (0.41 – 1.50)	0.47
GGT-1	1.04 (0.56 – 1.91)	0.91	Phosphore-1	1.18 (0.62 – 2.22)	0.62
GGT-2	1.21 (0.65 – 2.24)	0.54	Phosphore-2	0.65 (0.32 – 1.32)	0.24
PAL-1	1.38 (0.74 – 2.55)	0.31	Uree-1	1.14 (0.62 – 2.10)	0.68
PAL-2	1.27 (0.67 – 2.43)	0.46	Uree-2	1.98 (0.53 – 1.82)	0.96
Lipase-1	0.75 (0.38 – 1.51)	0.42	Creatinine-1	0.90 (0.49 – 1.66)	0.74
Lipase-2	0.67 (0.34 – 1.35)	0.26	Creatinine-2	0.97 (0.53 – 1.78)	0.92
Lactate-1	0.90 (0.43 – 1.90)	0.79	Hémoglobine-1	1.12 (0.60 – 2.10)	0.73
Lactate-2	0.71 (0.31 – 1.61)	0.41	Hémoglobine-2	1.20 (0.66 – 2.20)	0.55
Albumine-1	0.65 (0.17 – 2.43)	0.52	Lymphocytes-1	0.68 (0.37 – 1.24)	0.20
Albumine-2	0.77 (0.22 – 2.68)	0.69	Lymphocytes-2	0.46 (0.24 – 0.88)	0.02*
Préalbumine-1	0.37 (0.13 – 1.06)	0.07	PNN-1	0.77 (0.42 – 1.40)	0.39
Préalbumine-2	0.65 (0.23 – 1.81)	0.41	PNN-2	0.92 (0.51 – 1.69)	0.80
Ferritine-1	0.50 (0.24 – 1.01)	0.05	Plaquettes-1	0.74 (0.41 – 1.35)	0.33
Ferritine-2	0.57 (0.28 – 1.19)	0.13	Plaquettes-2	0.69 (0.37 – 1.27)	0.23
Triglyceride-1	0.59 (0.30 – 1.17)	0.13	RatioTCA-1	0.52 (0.28 – 0.99)	0.05
Triglyceride-2	0.49 (0.24 – 0.98)	0.04*	RatioTCA-2	0.47 (0.25 – 0.87)	0.02*
Fibrinogene-1	1.02 (0.51 – 2.04)	0.96	TP-1	0.86 (0.46 – 1.58)	0.62
Fibrinogene-2	1.58 (0.85 – 2.93)	0.15	TP-2	0.75 (0.39 – 1.43)	0.38
CRP-1	1.99 (1.02 – 3.89)	0.04*	BNP-1	1.38 (0.63 – 3.02)	0.42
CRP-2	1.99 (0.99 – 3.99)	0.05	BNP-2	1.20 (0.54 – 2.65)	0.65
LDH-1	1.26 (0.64 – 2.47)	0.51	Troponine-1	0.47 (0.18 – 1.20)	0.12
LDH-2	1.97 (1.03 – 3.78)	0.04*	Troponine-1	0.46 (0.18 – 1.19)	0.11
Acide urique-1	0.44 (0.23 – 0.85)	0.02*	CPK-1	0.49 (0.24 – 1.02)	0.06
Acide urique-2	0.68 (0.37 – 1.25)	0.21	CPK-2	0.57 (0.28 – 1.19)	0.13
Ag aspergillaire-1	0.89 (0.39 – 2.01)	0.77	Glucane-1	0.59 (0.29 – 1.21)	0.15
Ag aspergillaire-1	0.75 (0.31 – 1.81)	0.52	Glucane-2	0.96 (0.44 – 2.08)	0.91

Tableau 3 - Analyse univariée du caractère pronostique des variables biologiques avant LD sur la SSP.

Modèle de Cox univarié. Les variables quantitatives ont été divisées en variables catégorielles selon les tertiles de leur distribution. SSP : Survie sans progression. HR : Hazard ratio.

Une analyse multivariée a ensuite été réalisée à l'aide d'un modèle de Cox intégrant les variables significativement associées à la SSP lors de l'analyse univariée ($p < 0.05$), *i.e* la CRP, le taux de LDH, les triglycérides, l'acide urique, le ratio TCA et les lymphocytes (**Figure 8**). Avant lymphodéplétion, les facteurs prédictifs indépendants de la rechute étaient le nombre de lymphocytes périphériques et l'acide urique.

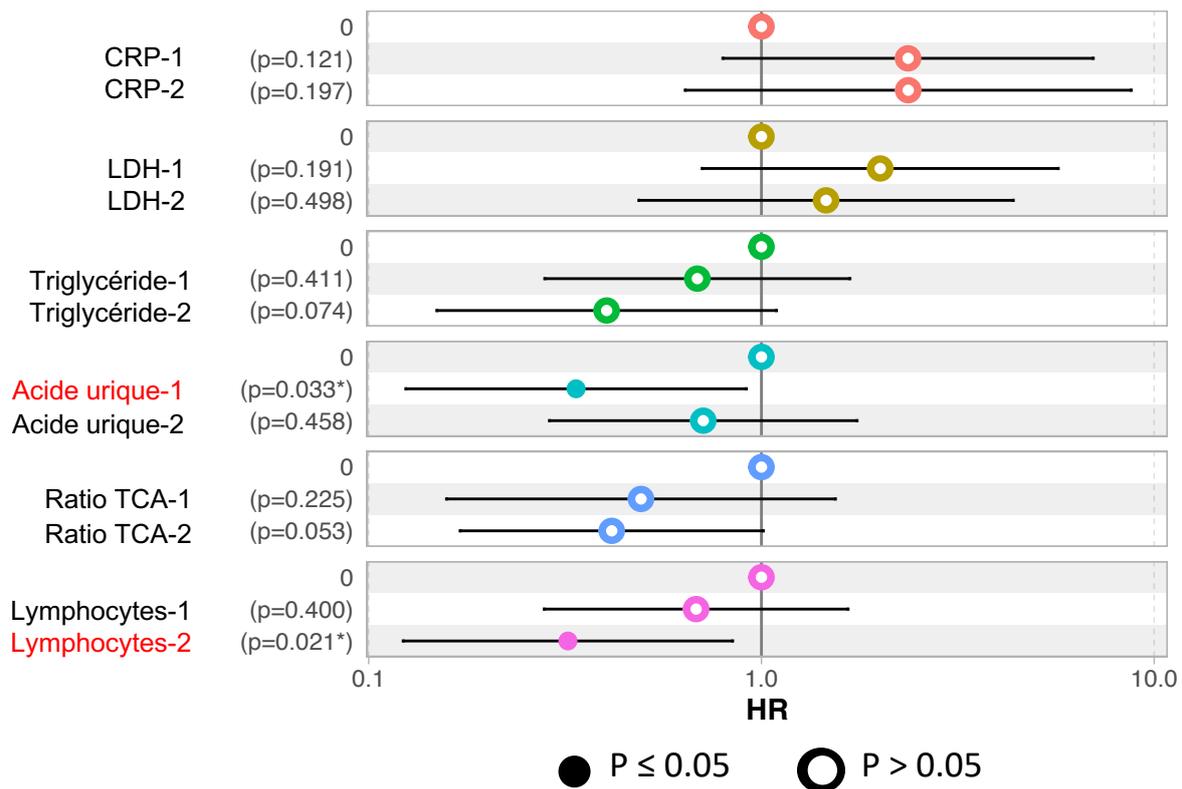


Figure 8 - Forest plot de l'analyse multivariée des biomarqueurs impactant la SSP.

Modèle de Cox multivarié. Les variables avec un $p < 0.05$ en analyse univariée ont été incorporées dans le modèle. Les variables quantitatives ont été divisées en variables catégorielles selon les tertiles; SSP : Survie sans progression ; HR : Hazard ratio.

Concernant l'acide urique, les données apparaissent ambivalentes. Il est habituellement le reflet d'une forte masse tumorale. Nous nous attendions donc à observer une relation graduelle entre l'augmentation de l'acide urique et la diminution de la SSP. Or, après analyse des courbes de Kaplan Meier, les patients du tertile 1 et 3 semblaient avoir un pronostic globalement similaire qui était moins bon que les patients du tertile 2 (**Figure 9A**). Afin d'expliquer cette dualité dans l'effet de l'acide urique sur la SSP, nous avons étudié la corrélation qui existait entre ce métabolite des bases puriques et le statut nutritionnel⁴⁴. Plus le taux d'acide urique était élevé, plus les valeurs de la préalbumine augmentaient ($p=0,01$), reflétant donc un meilleur état nutritionnel (**Figure 9B**). Ainsi, les patients du tertile 1 ont vu

leur pronostic chuter en raison d'un mauvais état nutritionnel de départ tandis que les patients du tertile 3 ont rechuté plus précocement du fait d'une forte masse tumorale, reflétée par un taux d'acide urique élevé. A noter que notre analyse a seulement montré une tendance à une meilleure SSP pour les patients avec un meilleur état nutritionnel, reflété par des valeurs de préalbumine plus élevées (p=0,2). Le faible nombre de données (n=44) a pu limiter la puissance de notre analyse en tertile.

L'analyse multivariée a également révélé le taux de lymphocytes avant LD comme facteur prédictif de l'efficacité des cellules CAR-T. Pour la suite de ce travail, nous nous sommes attachés à mieux caractériser le rôle des lymphocytes.

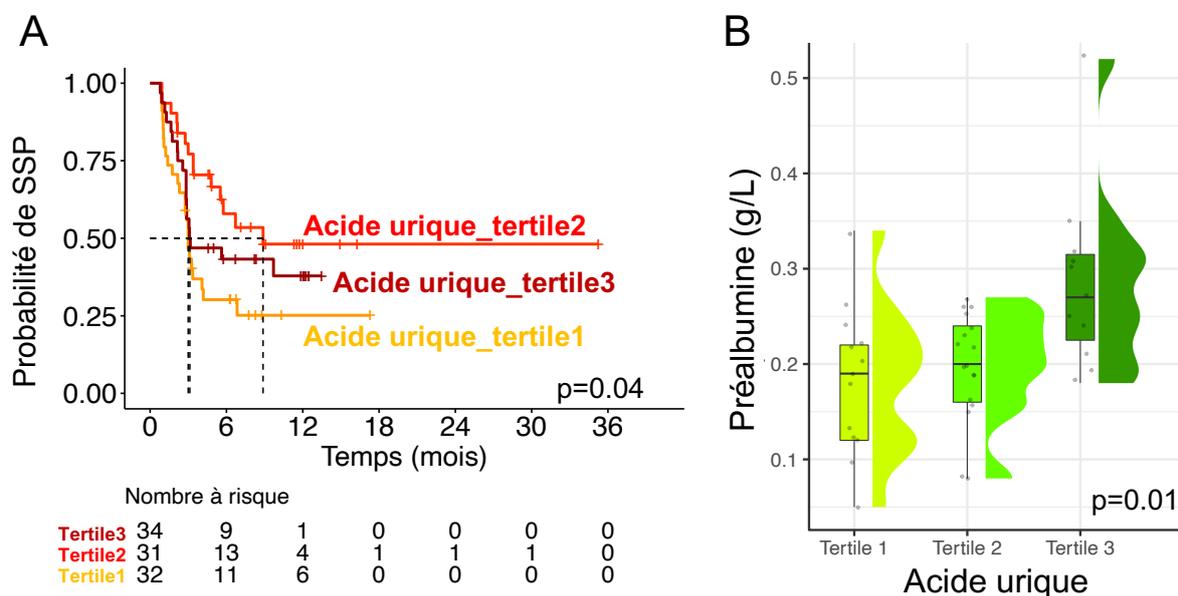


Figure 9 – Illustration de la dualité du rôle prédictif de l'acide urique sur la SSP, en lien notamment avec l'état nutritionnel.

A. Courbe de la SSP en fonction de l'acide urique en tertile, représentée par la méthode de Kaplan Meier. **B.** Graphique en boîte à moustache représentant l'évolution du taux de préalbumine en fonction de l'acide urique en tertile.

D. Caractérisation de l'impact positif des lymphocytes avant lymphodéplétion sur les rémissions

Notre étude exploratoire a permis l'identification du taux de lymphocytes avant LD comme un facteur prédictif de la rémission suite à un traitement par cellules CAR-T dans les LGCB-R/R. Nous avons remarqué que la quasi-totalité des patients de notre cohorte étaient lymphopéniques avant LD (lymphocytes < 1,5 G/L) avec une médiane estimée à 0,55 G/L (**Figure 10A**). Les courbes de la SSP en fonction des tertiles de lymphocytes à la LD illustrent

la relation « dose-effet ». Plus les patients avaient un taux de lymphocytes élevé à la LD, plus leur probabilité de survie sans progression était augmentée ($p=0,06$). Les médianes de SSP des patients des tertiles 1 à 3 étaient respectivement de 2,9 mois ; 5,5 mois et 9,7 mois (**Figure 10B**). L'analyse de la survie globale (SG) a également montré la présence de cet « effet-dose » bénéfique du taux de lymphocytes avant LD ($p=0,02$) (**Figure 10C**). De plus, l'analyse univariée sur la SG a aussi montré un effet significatif du taux de lymphocytes : un *Hazard ratio* (HR) plus bas était retrouvé pour les patients qui avaient les valeurs les plus hautes de lymphocytes (Tertile 1/Tertiles 2-3 : HR 0,41 $p=0,03$ et Tertiles 1-2/Tertile 3 : HR 0,37 ; $p=0,02$). De façon intéressante, l'impact des lymphocytes sur la SSP semblait conservé quelque soit le type de cellules CAR-T employé (**Figure 10D**).

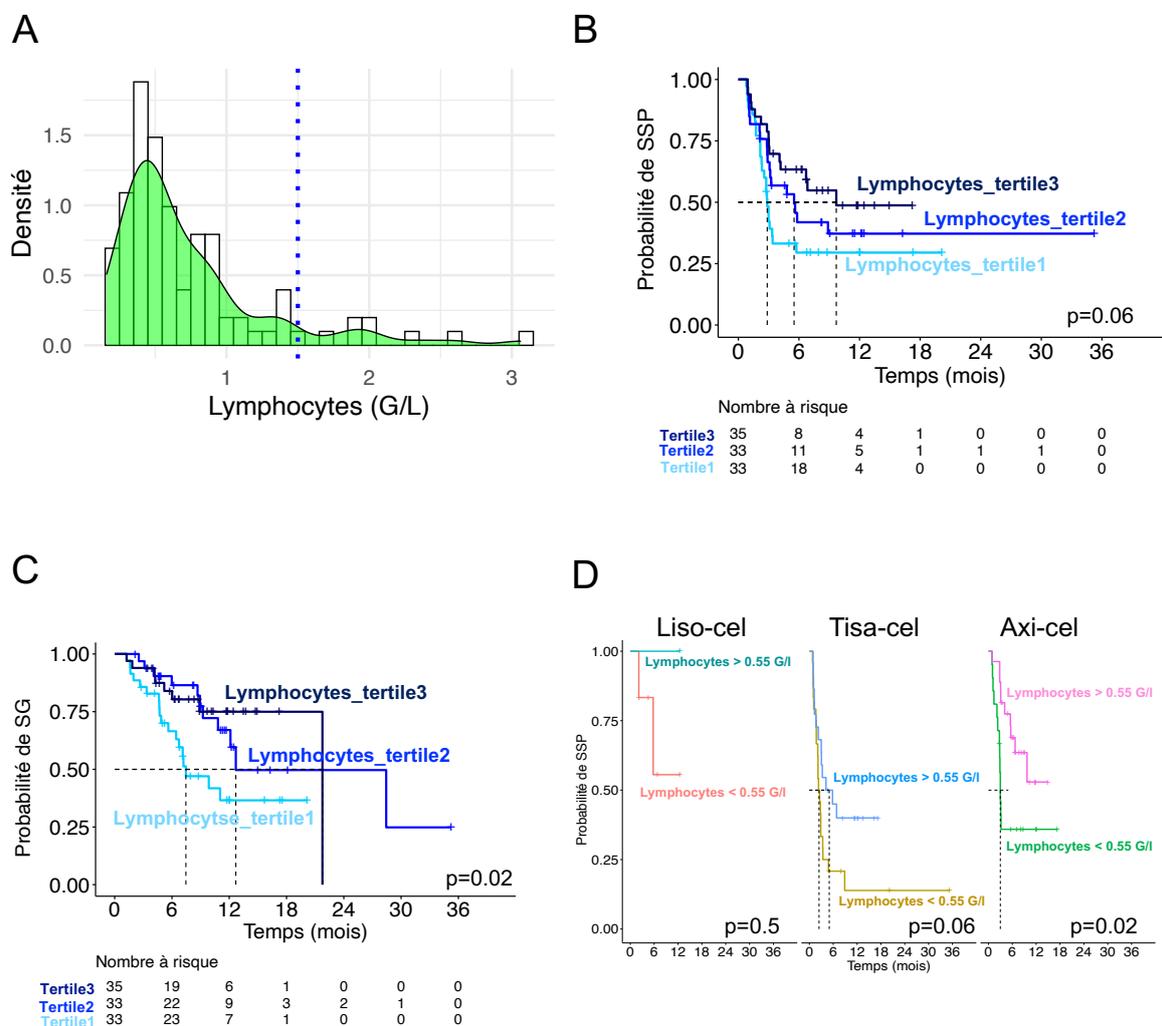


Figure 10 - Impact des lymphocytes avant lymphodéplétion sur la SSP et la SG des patients traités par cellules CAR-T.

A. Distribution des taux de lymphocytes dosés avant lymphodéplétion pour l'ensemble des patients de la cohorte. La ligne verticale en pointillée bleue représente la norme basse des lymphocytes

périphériques, à savoir 1,5 G/L. **B.** Courbes de Kaplan Meier illustrant la SSP en fonction des lymphocytes divisés en tertile avant lymphodéplétion (tertile 1 : 0.09 à 0.44; tertile 2 : 0.44 à 0.76; tertile 3 : 0.76 à 3.06 G/L). Médianes de SSP pour les groupes tertile 1 : 2,9 mois ; tertile 2 : 5,5 mois ; tertile 3 : 9,7 mois. **C.** Courbes de Kaplan Meier illustrant la SG en fonction des lymphocytes divisés en tertile avant lymphodéplétion. Médianes de SG pour les groupes tertile 1 : 7,5 mois ; tertile 2 : 12,7 mois ; tertile 3 : 21,8 mois. **D.** Courbes de Kaplan Meier illustrant la SSP en fonction des lymphocytes divisés selon leur médiane avant lymphodéplétion et selon le type de cellules CAR-T (Tisa-cel, Liso-cel et Axi-cel). En raison d'un trop petit nombre de données pour faire une analyse en tertile, une analyse binaire a été réalisée. Le test du log-rank a été réalisé pour comparer les courbes de survie des différents groupes. SSP : Survie sans progression. SG : Survie Globale.

L'effet du taux de lymphocytes sur la durée de la réponse (DR) a ensuite été analysé. Bien que la différence de DR entre les tertiles de lymphocytes n'ait pas été significative, nous avons observé que la médiane de DR n'était pas atteinte pour les patients dont les taux de lymphocytes étaient les plus hauts alors que les patients pour lesquels la lymphopénie était très profonde avaient une médiane de DR estimée à seulement 4,7 mois (**Figure 11A**).

En ce qui concerne l'obtention d'une réponse dans les 3 mois après injection, les patients avec une valeur de lymphocyte supérieure à la médiane (*i.e* > 0,55 G/L) avaient environ trois fois plus de chance d'être répondeurs (OR = 3,28 ; IC 95% [1,39 – 8,24], $p = 0,009$). Nous avons également évalué la qualité de la réponse obtenue en fonction du taux de lymphocytes dosé avant lymphodéplétion (**Figure 11B**). Les taux de lymphocytes étaient significativement différents entre les groupes de patients en RC, en RP et en maladie stable (MS)/ progressive (MP) ($p < 0,001$). De plus, si nous comparons le groupe des patients en RC aux autres groupes, celui-ci présentait un taux de lymphocytes significativement plus élevé ($p < 0,0001$). Chez ces patients en réponse complète (RC), une meilleure SSP a été observée (test du log-rank : $p < 0,0001$ (**Figure 7B**), en accord avec les données de la littérature.

En conclusion, les lymphocytes avant LD constituent un biomarqueur prédictif indépendant de la rechute en impactant la qualité et la durée des réponses obtenues chez les LGCB R/R traités par des cellules CAR-T.

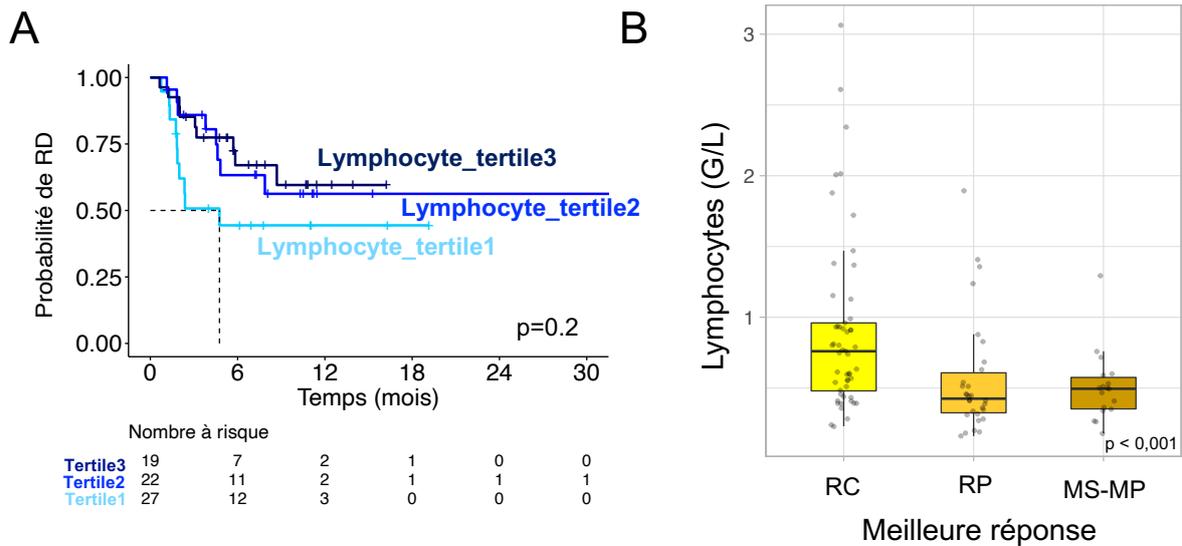


Figure 11- Effet des lymphocytes avant lymphodéplétion sur la durée et la qualité de la réponse des patients traités par cellules CAR-T pour un LGCB-R/R.

A. Courbes de Kaplan Meier illustrant la durée de réponse (DR) en fonction des lymphocytes divisés en tertile (tertile 1 : 0.09 à 0.44; tertile 2 : 0.44 à 0.76; tertile 3 : 0.76 à 3.06 G/L). Médianes de DR pour les différents groupes = tertile 1 : 4,75 mois ; tertile 2 : non atteinte (NA) ; tertile 3 : NA. Comparaison des courbes de DR par le test du log-rank. **B.** Graphique en boîte à moustache représentant la distribution des lymphocytes avant lymphodéplétion (LD) en fonction du type de meilleure réponse obtenue, réponse complète (RC) versus réponse partielle (RP) versus maladie stable (MS)/ maladie progressive (MP). Chaque point correspond aux données d'un patient. Le test de Kruskal-Wallis a été réalisé pour comparer les valeurs des lymphocytes entre les différents types de réponse.

Nous avons ensuite évalué si un sous-type lymphocytaire pouvait être en particulier responsable de l'effet prédictif global des lymphocytes. Au sein de notre cohorte, comme dans la population générale, les lymphocytes du sang périphérique sont principalement des lymphocytes T CD4 (LT CD4) et T CD8 (LT CD8) (**Figure 12A**)⁴⁵. La population de LT CD4 est majoritaire, à l'origine d'un ratio CD4/CD8 supérieur à 1, comme attendu. Nous avons remarqué qu'il existait une profonde lymphopénie B avant même l'initiation du traitement par les cellules CAR-T anti-CD19. Les précédents traitements par RITUXIMAB (anticorps anti-CD20) ont probablement été responsables de cette déplétion lymphocytaire B. A noter que les valeurs des sous-populations n'étaient disponibles que pour la moitié de la cohorte, ce qui a diminué la puissance de nos analyses. Nos résultats ont montré une tendance similaire de l'impact des lymphocytes T CD4 et T CD8 sur la durée de réponse (**Figures 12B et C**) c'est-à-dire qu'il semblait que des taux plus élevés de LT CD4 et LT CD8 étaient favorables à l'obtention de réponses prolongées (p=0,2 et p=0,07). Les analyses de SSP (non représentées ici) montraient également l'effet bénéfique non significatif des valeurs élevées de LT CD4 et

CD8 avant LD. D'autre part, l'étude de la meilleure réponse obtenue a montré que les patients répondeurs et non répondeurs semblaient avoir un taux médian de LT CD4 similaire ($p=0,52$). De même, il n'a pas été observé de différence significative du taux médian de LT CD8 entre les groupes de patients en réponse et sans réponse ($p=0,8$). Malgré l'absence de significativité sur le plan statistique, ces données suggèrent que les deux sous-types de LT CD4 et CD8 jouent un rôle dans l'effet des lymphocytes totaux.

Par analogie avec ce qui a été montré dans les lymphocytes T intra-tumoraux (TILs), il est possible que les LT CD8 cytotoxiques aient un rôle prépondérant dans l'action anti-tumorale par rapport aux lymphocytes LT CD4⁴⁶. L'étude du ratio CD4/CD8 a révélé que 40% des patients avaient un ratio inversé (<1) et donc une plus forte proportion de LT CD8 par rapport aux LT CD4. L'analyse de la SSP a montré qu'un ratio CD4/CD8 inversé (<1) était significativement associé à une meilleure SSP ($p=0,03$) (données non montrées). La probabilité de réponse durable était également significativement augmentée pour les patients au ratio CD4/CD8 inversé ($p=0,007$) (**Figure 12D**). Cependant, aucune différence significative n'a été retrouvée en termes de réponse ($p=0,8$). Enfin, il existait une association significative entre un ratio CD4/CD8 inférieur à 1 et un taux de lymphocytes avant LD élevé (*i.e* $> 0,55$ G/L). Les patients aux lymphocytes élevés avaient presque 4 fois plus de chance d'avoir un ratio inférieur à 1 (OR = 0,27 ; IC95% [0,07 – 0,096], $p = 0,048$). Au total, la SSP et la DR étaient améliorées chez les patients avec un ratio CD4/CD8 <1 , laissant présumer un rôle prédominant des lymphocytes T CD8 dans les rémissions prolongées.

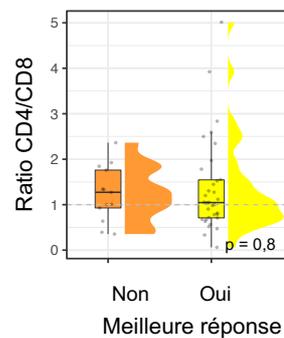
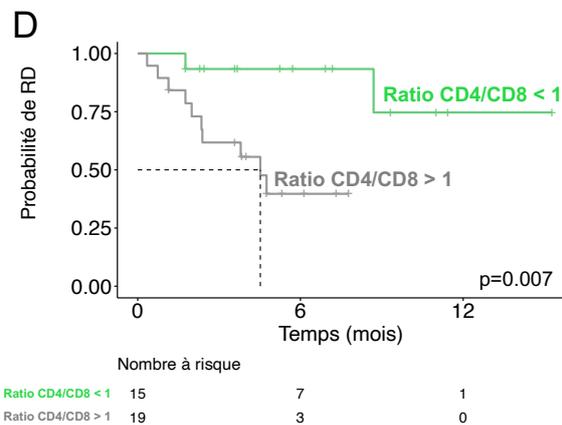
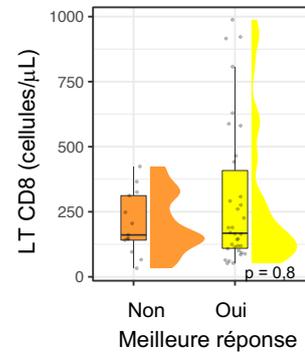
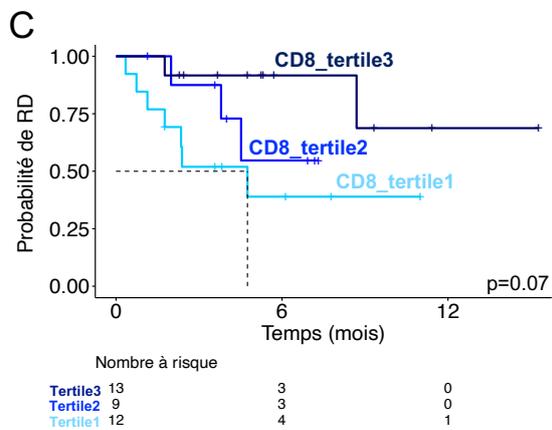
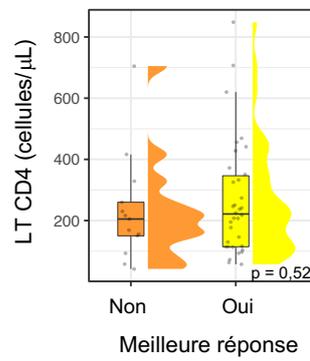
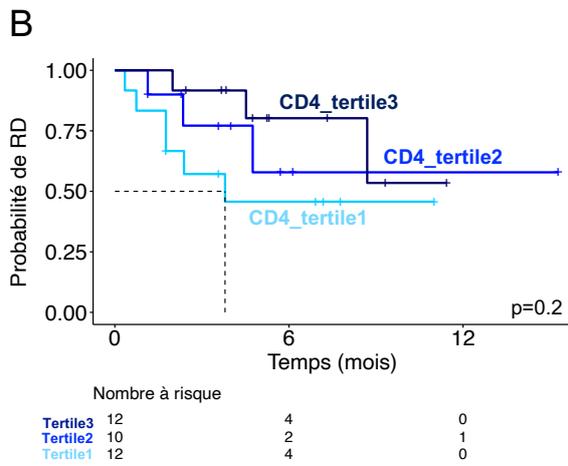
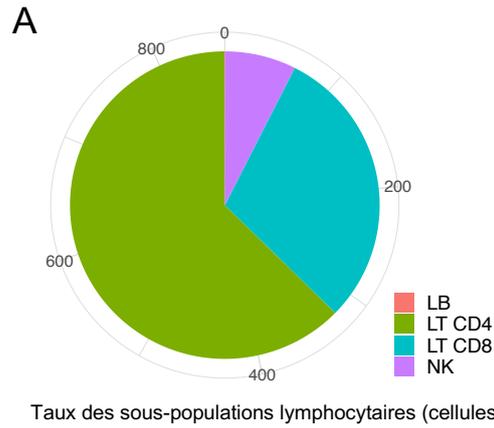


Figure 12 – Impact des sous-population lymphocytaires T sur la réponse et sa durée.

A. Graphique circulaire représentant les différentes sous-populations lymphocytaires comprises dans les lymphocytes totaux périphériques des patients avant lymphodéplétion. **B.** Courbes de Kaplan Meier illustrant la durée de réponse (DR) en fonction des lymphocytes T CD4 avant lymphodéplétion (LD), divisés en tertile. Médianes de DR pour les groupes tertile 1 : 3,8 mois ; tertile 2 : non atteinte (NA) et tertile 3 : NA. **C.** Courbes de Kaplan Meier illustrant la durée de réponse (DR) en fonction des lymphocytes T CD8 avant LD, divisés en tertile. Médianes de DR pour les groupes tertile 1 : 4,8 mois ; tertile 2 : non atteinte (NA) et tertile 3 : NA. **D.** Courbes de Kaplan Meier illustrant la durée de réponse (DR) en fonction du ratio CD4/CD8 normal (*i.e.* >1) versus inversé (*i.e.* <1) avant LD. Médianes de DR pour le groupe ratio CD4/CD8 <1 : NA versus 4,5 mois pour le groupe ratio CD4/CD8 normal, >1. **B. C. D à droite.** Graphiques « *raincloud plot* » représentant la distribution (boîte à moustache) et la densité (graphique en violon) des variables testées (LT CD4, LT CD8 et ratio CD4/CD8) avant lymphodéplétion (LD) en fonction de la réponse. Chaque point correspond aux données d'un patient. La ligne grise en pointillée représente le ratio CD4/CD8 =1. Le test de Mann-Witney-Wilcoxon a été réalisé pour comparer les valeurs des paramètres entre les groupes de patients répondeurs et non répondeurs.

E. Corrélation du nombre de lymphocytes avant lymphodéplétion avec les lymphocytes dosés au moment de la leucaphérèse et après réinjection des cellules CAR-T

Un des piliers du succès thérapeutique des cellules CAR-T est la réalisation de la chimiothérapie de conditionnement par FLUDARABINE et CYCLOPHOSPHAMIDE, qui entraîne notamment la destruction des lymphocytes circulants (médiane de lymphocytes à J0 estimée à 0,05 G/L dans notre cohorte). Il est donc possible que l'impact du taux de lymphocytes avant LD soit lié au rôle qu'ils jouent dans des étapes antérieures, comme la leucaphérèse. La **Figure 13A** montre qu'il existait une association significative entre le taux de lymphocytes avant LD et le taux de lymphocytes circulants juste avant leucaphérèse ($r=0,6$; $p < 0,001$). Ainsi, un meilleur taux de lymphocytes avant LD pourrait se traduire par une meilleure qualité de l'échantillon de leucaphérèse. Pourtant, le taux de lymphocytes avant leucaphérèse n'avait pas d'impact sur la réponse et la SSP de façon statistiquement significative (**Figure 16** en Annexes) suggérant un manque de puissance ou la participation d'autres mécanismes dans l'effet médié par les lymphocytes avant LD.

En reflétant un meilleur état basal du système immunitaire de l'hôte, les lymphocytes pourraient aussi potentialiser l'action anti-tumorale des lymphocytes CAR-T réinjectés en soutenant leur expansion et/ou persistance. Nous avons donc cherché à déterminer le lien entre les lymphocytes présents avant LD et ceux dosés après réinjection du produit de thérapie cellulaire. Avant de commenter les résultats du corrélogramme, il est important de préciser que le nadir de lymphopénie est généralement observé 3/4 semaines après une chimiothérapie par FLUDARABINE d'après la littérature⁴⁷. Les lymphocytes périphériques dosés entre J1 et J30

pourraient donc provenir essentiellement des poches de réinjection et non de la reconstitution immunitaire après chimiothérapie. Le corrélogramme montre qu'il existait une corrélation positive entre les lymphocytes avant LD et les lymphocytes à J0, J15, J30 et J90 (**Figure 13B**). La corrélation entre les lymphocytes à la LD et à J0 pourrait traduire un certain degré de résistance à la LD pour les patients aux taux de lymphocytes les plus élevés. Les associations à J15 et J30 suggèrent un meilleur maintien du nombre de lymphocytes réinjectés et, après J30, une meilleure reconstitution quantitative du pool de lymphocytes après chimiothérapie. Par ailleurs, il n'y avait pas de corrélation entre les lymphocytes avant LD et les lymphocytes dosés à J8, correspondant au pic d'amplification des cellules CAR-T d'après la littérature. Ces données suggèrent que le nombre de lymphocytes à la LD n'a pas d'impact sur le pic d'expansion des lymphocytes réinjectés (sous réserve d'un grand nombre de valeurs manquantes à J8, en raison de la leucopénie profonde globale) mais qu'il pourrait notamment participer à leur meilleure persistance dès J15.

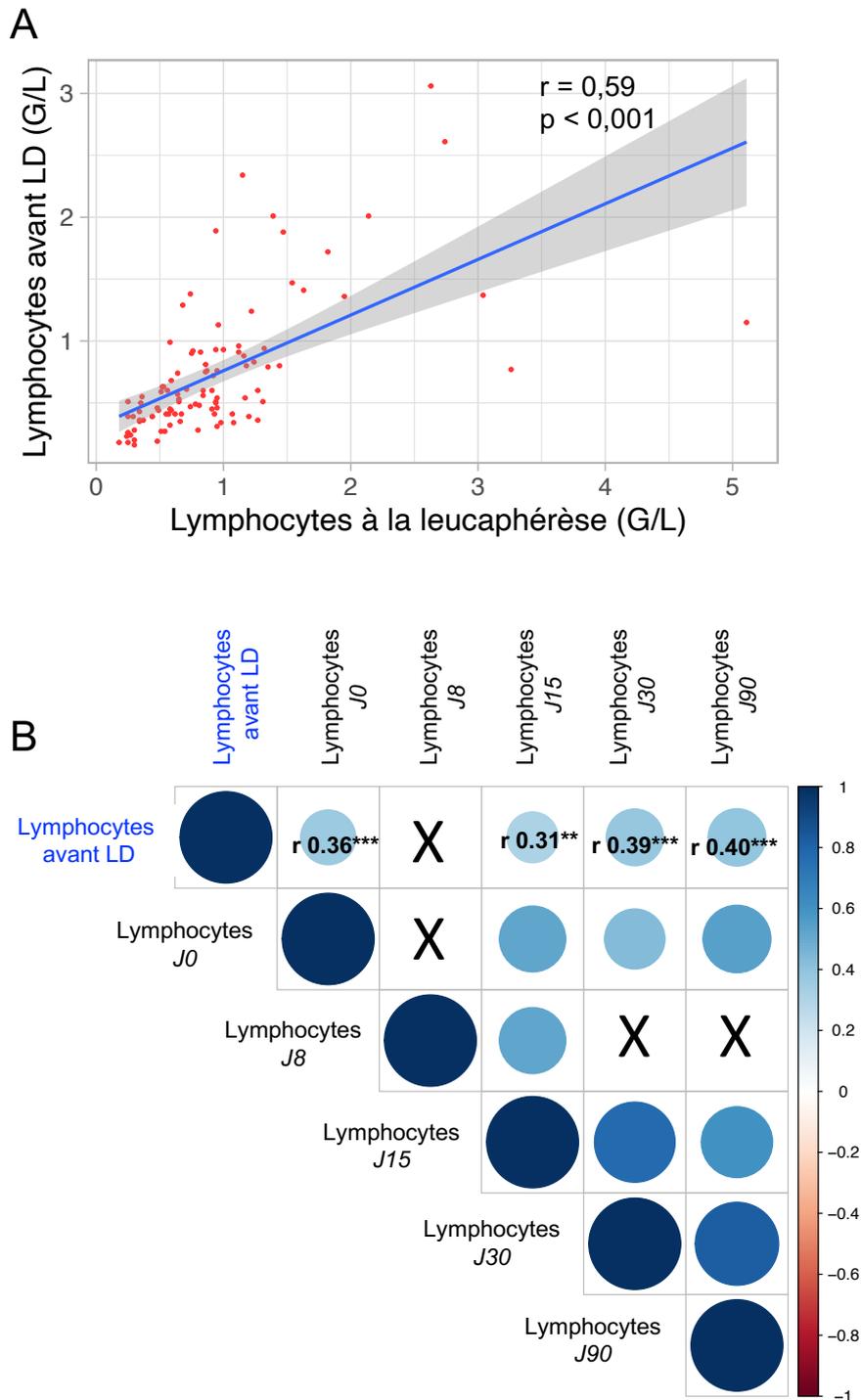


Figure 13 – Association entre le taux de lymphocytes avant lymphodéplétion et le taux de lymphocytes dosés au moment de la leucaphérèse et après réinjection des cellules CAR-T.

A. Corrélation de Pearson des lymphocytes avant lymphodéplétion et des lymphocytes dosés au moment de la leucaphérèse. Chaque point représente un patient. **B.** Correlogramme des lymphocytes avant lymphodéplétion en fonction des lymphocytes dosés après injection des cellules CAR-T à J0, J8, J15, J30, J90. Les ronds pleins représentent une corrélation dont la force de liaison r est représentée par l'intensité de la couleur. Les ronds avec croix représentent l'absence de corrélation. La significativité est représentée ainsi : '***' si $p < 0.001$; '**' si $p < 0.01$; '*' si $p < 0.05$.

F. Corrélation entre le taux de lymphocytes avant LD et le pic d'expansion des lymphocytes T réinjectés, CAR et non CAR

Afin d'évaluer l'impact du taux de lymphocytes avant LD sur l'expansion des cellules CAR-T, nous avons analysé une nouvelle cohorte de 24 patients atteints par un LCGB R/R traités depuis octobre 2020, pour laquelle les données quantitatives des cellules CAR-T après réinjection étaient disponibles. Pour ces patients, le nombre de cellules CAR-T dans le sang périphérique aux jours 8, 15, 30, 90 après réinjection a été déterminé par cytométrie en flux à l'aide d'un anticorps spécifique du CAR. La concentration maximale de cellules CAR-T est détectée au J8 avec une médiane estimée à 60 cellules CAR-T/ μ l (IIQ 31-295). Parmi les lymphocytes T CD3 totaux, il y avait 34% de lymphocytes CAR-T en moyenne. Nos résultats montraient que le nombre de lymphocytes avant LD était corrélé de façon négative à la proportion maximale de cellules CAR-T au sein des lymphocytes T CD3⁺ ($r = -0,54$; $p = 0,007$) (**Figure 14A**). Par conséquent, le nombre de lymphocytes avant LD était positivement associé à la proportion de lymphocytes T non CAR au sein des lymphocytes T totaux. Les corrélations entre le taux de lymphocytes à la LD et les lymphocytes CAR-T et non CAR au J15, J30 et J90 n'ont pas pu être réalisées du fait d'un trop grand nombre de données manquantes. Par ailleurs, aucune différence significative n'a été retrouvée entre les proportions maximales de cellules CAR-T en fonction du statut répondeur des patients ($p = 0,64$) (**Figure 14B**). Des résultats similaires ont été objectivés pour le pic d'expansion des cellules non CAR (données non montrées). Le petit effectif de cette cohorte n'était peut-être pas suffisant pour déceler une différence statistiquement significative.

Au total, le rôle positif des lymphocytes avant LD ne semble pas lié à une meilleure expansion des cellules CAR-T. Cependant, il pourrait être associé à une meilleure expansion des cellules non CAR au détriment de celle des cellules CAR-T. Le mécanisme de l'impact des cellules non CAR dans l'efficacité du traitement de thérapie cellulaire reste par contre entièrement à démontrer.

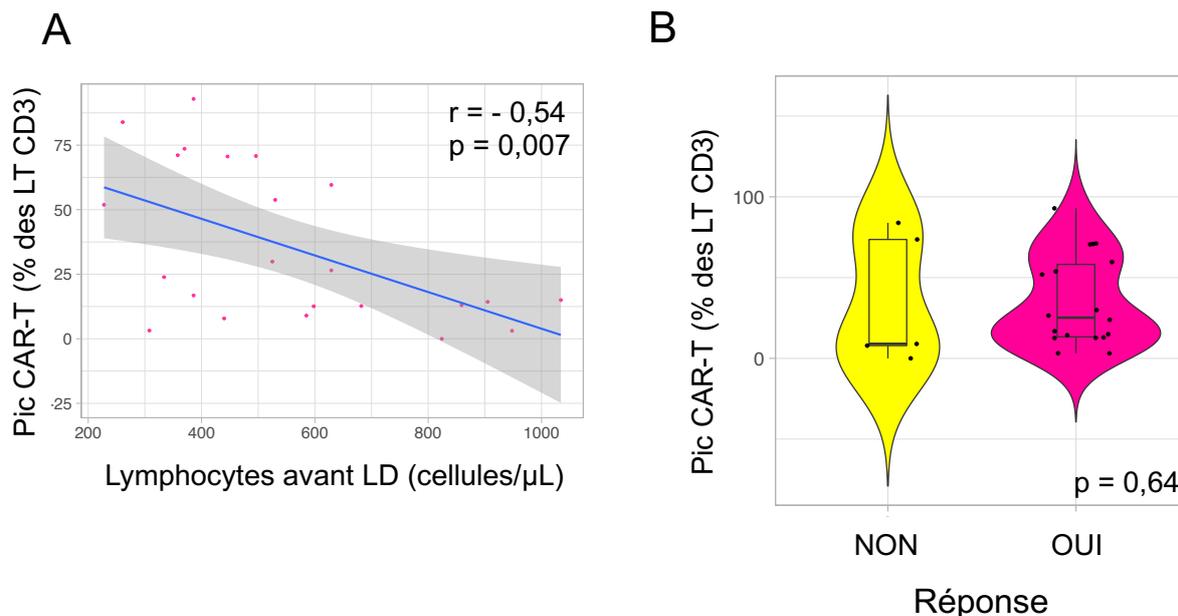


Figure 14 - Corrélation entre les lymphocytes avant lymphodéplétion et les lymphocytes CAR-T.

A. Diagramme de corrélation des lymphocytes avant lymphodéplétion et du pic d'expansion des lymphocytes CAR-T (exprimé en % des lymphocytes T CD3 totaux). **B.** Graphique « raincloud plot » représentant la distribution (boîte à moustache) et la densité (graphique en violon) du pic d'expansion des lymphocytes CAR-T (exprimé en % des lymphocytes T CD3 totaux) en fonction du statut répondeur.

G. Analyse préliminaire des facteurs associés aux toxicités

Nous avons également conduit un travail exploratoire sur la prédiction des toxicités engendrées par les cellules CAR-T. La première étape d'analyse descriptive a permis de confirmer certaines données de la littérature (**Figure 15A**). Le SRC et la NT survenaient chez les patients dont le taux de CRP et le taux de LDH étaient significativement plus élevés avant lymphodéplétion ($p < 0,05$). Il semble exister un lien entre un taux de ferritine élevé et la survenue des toxicités même si nos données ne sont pas statistiquement significatives (données non montrées). Un nouveau paramètre biologique prédictif des toxicités notamment sévères, a été identifié. Il s'agissait du lactate veineux. Renforçant l'hypothèse d'un rôle causal, nous avons montré la présence d'une relation « dose-effet » entre le taux de lactate et le grade de sévérité des toxicités (OR=2,12 ; $p=0,005$ pour le SRC et OR=1,48 ; $p=0,03$ pour la NT). Une lactatémie élevée à la LD augmentait donc le risque de développer un SRC et une NT sévères (**Figure 15B**). Les tumeurs agressives sont capables de dévier leur métabolisme pour utiliser le glucose en condition anaérobie. Ce mécanisme responsable de la production de grande quantité de lactate est appelé « effet Warburg », du nom de son découvreur en 1956. Pour cette raison, nous avons souhaité évaluer la relation entre le lactate veineux et le taux de LDH. Il existait

une corrélation significative ($r=0,64$; $p < 0,001$) illustrant le fait que le lactate, tout comme le taux de LDH, reflétait le volume tumoral, un facteur déjà amplement décrit pour induire des SRC et NT de haut grade (**Figure 15C**).

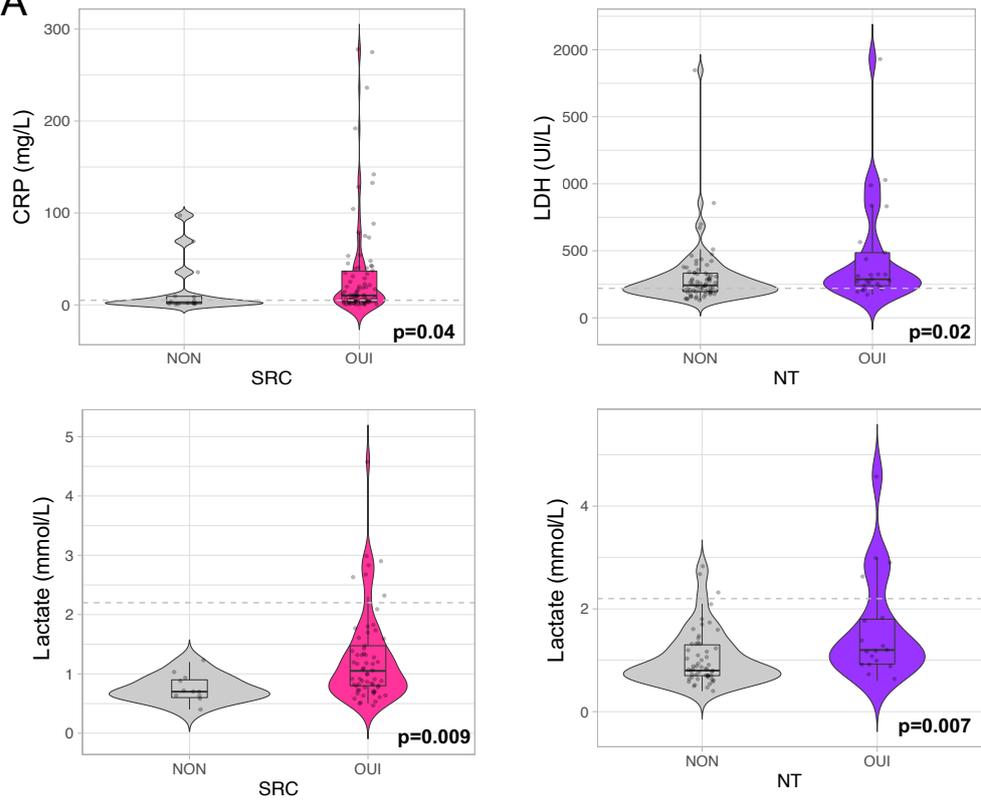
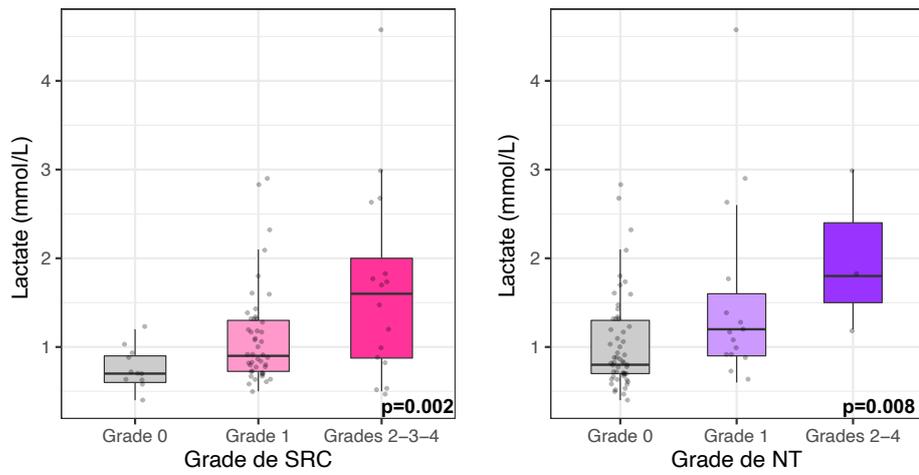
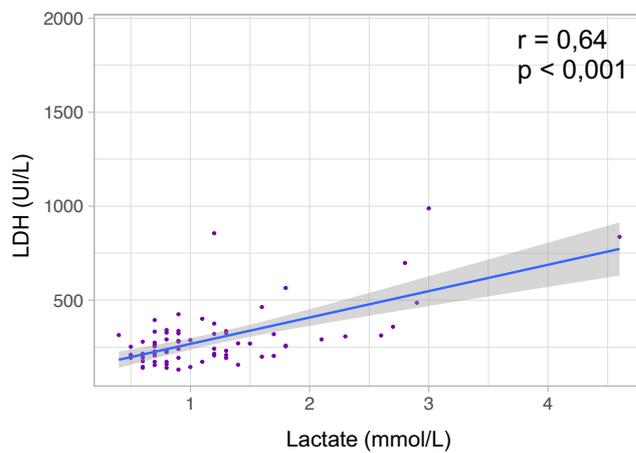
A**B****C**

Figure 15 - Analyse des biomarqueurs avant lymphodéplétion associés à la survenue des toxicités après un traitement par cellules CAR-T.

A. Graphiques « *raincloud plot* » représentant la distribution (boîte à moustache) et la densité (graphique en violon) des variables testées avant lymphodéplétion (LD) en fonction de la survenue d'un syndrome de relargage cytokinique (SRC) ou d'une neurotoxicité (NT). Chaque point correspond aux données d'un patient. La ligne grise en pointillée représente le seuil supérieur de la norme du paramètre étudié. Le test de Mann-Witney-Wilcoxon a été réalisé pour comparer les valeurs des paramètres entre les groupes de patient ayant eu ou non des toxicités. **B.** Graphiques en boîte à moustache représentant l'évolution des valeurs de lactate avant LD en fonction des grades de SRC et de NT. Le test de Kruskal-Wallis a été réalisé pour comparer les valeurs du lactate entre les différents grades de SRC et de NT. **C.** Diagramme de corrélation entre la lactatémie avant lymphodéplétion et le taux de LDH. Chaque point représente un patient. Le test de Pearson a été réalisé pour évaluer la dépendance des variables.

DISCUSSION

L'immunothérapie par cellules CAR-T a révolutionné le pronostic des patients en 3^{ème} ligne thérapeutique pour un LGCB-R/R. Un sous-groupe de patients développe des réponses prolongées dans le temps laissant penser qu'ils peuvent être guéris. Hormis les facteurs relatifs au volume tumoral, aucun biomarqueur robuste n'est actuellement disponible pour sélectionner ces patients. De plus, dans la balance bénéfice/risque impliquée dans le choix de cette option thérapeutique, il est nécessaire d'identifier les patients à risque de SRC et/ou NT sévères pouvant mettre leur vie en danger. Ainsi, dans cette étude rétrospective monocentrique d'une large cohorte de patients avec un LGCB-R/R traité par cellules CAR-T anti-CD19, l'objectif était d'identifier de nouveaux biomarqueurs pour la prédiction de l'efficacité et des toxicités.

Sur le plan des toxicités, l'analyse exploratoire d'une série de paramètres biologiques a révélé qu'un taux de lactate veineux avant LD supérieur à 1 mmol/L permettait de distinguer les patients à risque de développer un SRC et une NT de tout grade. Une relation dose/effet permet d'utiliser le dosage du lactate pour prédire le risque de survenue de toxicités sévères. Cette catégorie de patients pourrait bénéficier d'un suivi plus rapproché et/ou d'interventions thérapeutiques plus précoces, par exemple dès la manifestation de toxicité de grade 1. Tout comme le taux de LDH et la CRP, le rôle prédictif du lactate semble lié à l'agressivité du lymphome avant LD. Cependant, au-delà de la plus grande quantité d'antigènes et de DAMPs (*Damage-Associated Molecular Patterns*) disponibles pour activer les lymphocytes et les macrophages, il apparaît que la molécule du lactate est directement capable de potentialiser l'activation des lymphocytes T⁴⁸. En médiant la suractivation des LT, le lactate produit par la tumeur pourrait déclencher des SRC et NT encore plus sévères.

Sur le plan des déterminants de l'efficacité, l'acide urique est un facteur prédictif d'une meilleure SSP lorsqu'il est compris dans une valeur intermédiaire (236 – 305 µmol/L) reflétant à la fois un meilleur état nutritionnel et un volume tumoral modéré. Le taux de lymphocytes avant LD est un biomarqueur robuste et jamais encore rapporté pour son association avec le devenir des patients traités par cellules CAR-T. Le rôle des lymphocytes est indépendant des biomarqueurs déjà décrits (CRP et taux de LDH) et du nombre de lignes antérieures, seul facteur clinique restant associé au devenir des patients au sein de la cohorte (données publiées¹¹). Les patients les moins lymphopéniques ont plus de chance d'être en réponse complète, ont une durée de réponse prolongée et une meilleure SSP. L'effet bénéfique des lymphocytes est conservé entre les 3 types de cellules CAR-T insinuant que le mécanisme est indépendant du

domaine de costimulation (CD28 ou 41BB) et de la proportion fixe de LT CD4 :CD8 au sein des poches avant réinjection.

Parmi les lymphocytes, les LT CD4 et CD8 semblent tous deux médier cet effet. Cependant, l'impact positif du ratio CD4/CD8 inférieur à 1 suggère un rôle prédominant des LT CD8 à l'instar de ce qui a été décrit pour les *TILS* endogènes ou la thérapie cellulaire par *TILS*, l'ancêtre des cellules CAR-T^{49,50}. Schématiquement, le pool des LT CD4 est constitué de deux sous-types cellulaires, à savoir les LT CD4 auxiliaires et les LT régulateurs. Ainsi, on pourrait imaginer que l'impact défavorable d'un ratio CD4/CD8 supérieur à 1 serait dû à une plus forte proportion de LT CD4 régulateurs capables d'inhiber l'action des LT CD8 minoritaires. Une étude détaillée des sous-populations de lymphocytes T CD4 à la LD permettrait d'étayer cette hypothèse.

La découverte de l'impact des lymphocytes avant LD ouvre un nouveau champ de réflexion concernant le mécanisme d'action des cellules CAR-T, qui est encore peu compris. Nous avons exploré deux pistes principales (**Figure 16**). D'une part, un rôle en partie exercé plus précocement par les lymphocytes périphériques au moment de la leucaphérèse. Dans la littérature, une étude de « vie réelle » a déjà montré qu'un taux plus élevé de lymphocytes périphériques au moment de la leucaphérèse était associé à une meilleure efficacité des cellules CAR-T⁶. Chez les patients les moins lymphopéniques, l'échantillon de leucaphérèse pourrait être de meilleure qualité en contenant plus de lymphocytes et proportionnellement moins de cellules myéloïdes délétères. En ce sens, des données obtenues par le centre de santé du CHLS montrent que le seul facteur prédictif du nombre de lymphocytes collectés est le taux de lymphocytes périphériques avant aphérèse (O. Hequet *et al.* en soumission). Par conséquent, chez les patients très lymphopéniques, le protocole de collecte des lymphocytes doit être optimisé (par l'augmentation du nombre de masse sanguine à traiter) entraînant une plus forte proportion de cellules granuleuses par rapport aux lymphocytes, ces dernières étant responsables d'une perte de viabilité des leucocytes collectés⁵¹. Bien que non analysé en détails, un fort taux de monocytes collectés pourrait aussi rendre le produit de thérapie cellulaire moins efficace en inhibant notamment les étapes d'activation des lymphocytes avant transduction.

D'autre part, les lymphocytes endogènes pourraient participer à l'action anti-tumorale menée par les cellules CAR-T de façon directe ou indirecte. Ainsi, des lymphocytes plus nombreux avant LD pourraient traduire un meilleur état global du système immunitaire du patient, capable de mieux soutenir l'implantation *in vivo* des lymphocytes CAR-T réinjectés. En ce qui concerne la phase d'amplification à J8, au contraire, nos résultats montrent que la proportion des cellules CAR-T est plus faible que celle des lymphocytes T non transduits chez

les patients aux taux de lymphocytes plus élevés avant LD. De tels résultats évoquent plusieurs mécanismes possibles : (i) dans le contexte d'un meilleur système immunitaire de départ, est-ce que la réplication des lymphocytes non CAR-T est plus efficace que celle des lymphocytes T génétiquement modifiés? (ii) est-ce que les lymphocytes CAR et non CAR-T ont les mêmes capacités de réplication *in vivo* et donc que la différence de leur proportion respective à J8 proviendrait de différences existant dans le produit au moment de sa réinjection ? Cette dernière hypothèse renforcerait le rôle capital du produit initial de leucaphérèse. L'analyse précise du contenu des poches de cellules CAR-T devrait permettre de répondre à ces interrogations. De même, l'analyse phénotypique des populations lymphocytaires du produit de leucaphérèse et/ou des poches avant réinjection permettrait de déterminer si une prédominance de lymphocytes T CD8 est observée chez les patients en rémission prolongée, comme suggérée lors d'une communication orale présentée par une équipe de l'hôpital Saint Louis. De façon plus globale, ces résultats soulèvent la question du rôle tenu par les « autres » lymphocytes non CAR-T infusés au patient. D'après la littérature, l'ampleur du pic lymphocytes périphériques entre J0 et J14 est un reflet de l'expansion des lymphocytes CAR-T, permettant de prédire les réponses à 3 mois dans les LAL B et les LGCB ^{52,53}. Dans l'étude portant sur les LGCB, la valeur du pic des lymphocytes entre J0 et J14 est de 1G/L, or les valeurs maximales de cellules CAR-T sont de l'ordre de 50 cellules/ μ l (d'après la littérature et nos résultats), ce qui suggère que la majorité des lymphocytes périphériques sont les lymphocytes non transduits réinjectés. En effet, la chimiothérapie de cytotoxicité entraîne une lymphopénie prolongée de 3 à 4 semaines, rendant peu probable le fait que ces lymphocytes soient ceux issus de la reconstitution immunitaire. Cependant, ni la proportion des cellules CAR-T et non CAR-T, ni le pic de lymphocytes périphériques n'étaient associés à une meilleure efficacité du traitement, potentiellement par manque de puissance.

Dans l'hypothèse d'une action directe des lymphocytes endogènes, notre étude, comme la plupart des études actuelles, a comme limitation majeure de porter sur les lymphocytes périphériques circulants, sans assurance que ceux-ci soient le reflet des lymphocytes infiltrés au sein de la tumeur. En effet, on pourrait imaginer qu'un plus fort taux de lymphocytes avant LD soit corrélé à une plus forte infiltration des lymphocytes endogènes au sein de la tumeur. Ces derniers seraient capables de mieux résister à la chimiothérapie de LD, par exemple en étant activés⁴⁷. Ils pourraient ainsi aider les lymphocytes réinjectés dans le site tumoral. Des biopsies pour évaluer l'infiltration des lymphocytes dans le microenvironnement lymphomateux, avant et après réinjection, seraient nécessaires mais s'avèrent difficiles à réaliser au quotidien. Selon la littérature, après réinjection, la plupart des lymphocytes intra-

tumoraux n'expriment pas de CAR, illustrant encore une fois le fait que si ils sont nécessaires, les lymphocytes CAR-T ne fonctionnent probablement pas seuls^{37,38}.

Hors contexte spécifique de thérapie cellulaire, le rôle pronostique du taux de lymphocytes notamment au moment du diagnostic, est en fait largement établi que ce soit dans les tumeurs solides ou dans les lymphomes⁵⁴. Bien que son mécanisme ne soit pas élucidé, l'hypothèse privilégiée est celle d'une meilleure immunité initiale du patient. Ainsi, alors que nous pensons qu'un rationnel spécifique au traitement par cellules CAR-T explique nos résultats, il est possible qu'ils traduisent aussi cet impact pronostique global des lymphocytes dans les cancers. L'ensemble des mécanismes à l'origine de l'impact des lymphocytes est encore très spéculatif mais plaide pour la réalisation précoce du traitement par cellules CAR-T afin de bénéficier d'un système immunitaire le plus compétent possible.

Si l'impact pronostique des lymphocytes venait à être confirmé dans une cohorte indépendante de validation, des mesures correctrices de la lymphopénie avant la LD pourraient optimiser l'efficacité du traitement. Dans notre cohorte, la lymphopénie ne semblait pas en lien avec un nombre plus élevé de lignes thérapeutiques antérieures ni avec l'âge plus élevé des patients (données non montrées). Par contre, les patients dont l'index de masse corporel était plus faible avant LD avaient tendance à être plus lymphopéniques (données non montrées : $r=0,19$; $p=0,06$). Il serait intéressant de déterminer si des carences en vitamine C ou en zinc existent dans cette population et si elles ont un impact sur la lymphopénie et le pronostic. Par ailleurs, la radiothérapie est généralement très pourvoyeuse de lymphopénie en induisant un excès de catabolisme des lymphocytes. Seuls 2 patients dans notre cohorte ont bénéficié d'une radiothérapie d'attente ne permettant pas d'évaluer son impact sur le taux de lymphocytes avant LD. Pourtant, il existe actuellement plutôt un engouement pour sa réalisation en tant que traitement d'attente avant la LD, notamment en raison d'une synergie avec les cellules CAR-T⁵⁵. L'emploi de doses variables ou le site d'irradiation pourraient influencer la profondeur de la lymphopénie induite par la radiothérapie⁵⁶.

Pour finir, avec la généralisation de l'utilisation des cellules CAR-T, il est important de partager notre expérience et de fournir une aide à la rationalisation des bilans biologiques pour la communauté médicale utilisant cette immunothérapie. En pratique, avant la LD, nos résultats montrent que l'on peut restreindre ces bilans aux paramètres habituellement utilisés avant prescription d'une chimiothérapie (numération formule sanguine (NFS), évaluation de la fonction rénale et du bilan hépatique). Hors contexte clinique le nécessitant, le dosage systématique de la troponine, du BNP, de la PCT, de la lipase ou encore de l'albumine par exemple n'apporte pas de plus-value à la prise en charge des patients. Les lymphocytes et

l'acide urique couplés à la CRP et au taux de LDH alertent le médecin sur les chances d'efficacité du traitement. Le lactate veineux apparaît utile pour la prédiction des toxicités sévères. Après actualisation de nos résultats sur les données de suivi prolongé et validation sur une cohorte indépendante, il serait intéressant d'établir un score prédictif de l'efficacité des cellules CAR-T contenant le taux de lymphocytes avant LD.

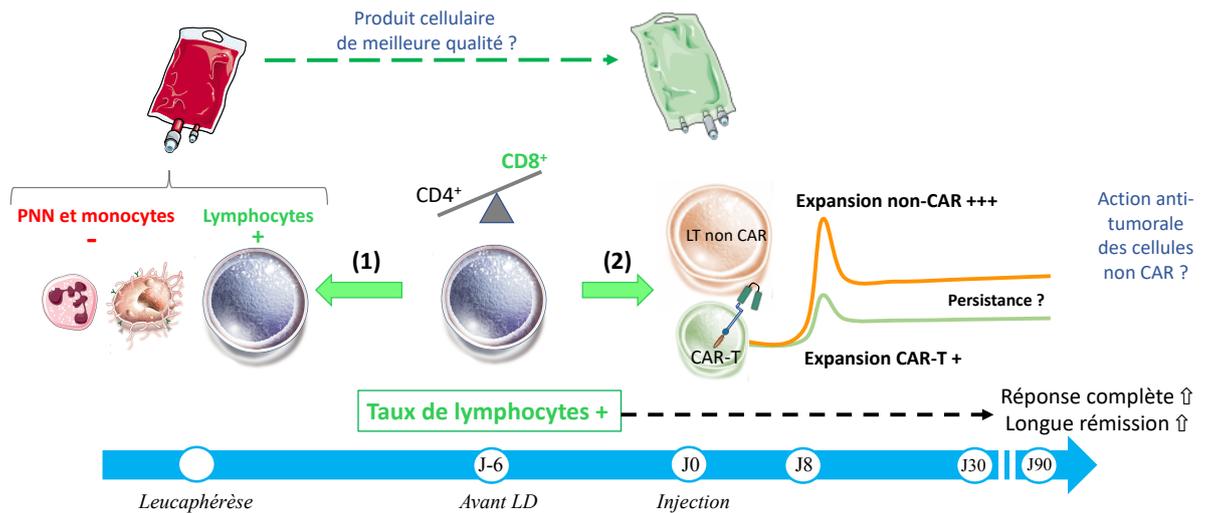


Figure 16 – Schéma des hypothèses mécanistiques à l'origine de l'impact positif des lymphocytes avant lymphodéplétion.

L'action des lymphocytes avant LD pourrait être principalement médiée par les LT CD8. (1) L'effet bénéfique des lymphocytes avant LD serait le reflet de l'effet d'un meilleur taux de lymphocytes au moment de la leucaphérèse. L'échantillon prélevé serait de meilleure qualité contenant plus de lymphocytes que de polynucléaires neutrophiles (PNN) ou de monocytes. Par des mécanismes non étudiés, les étapes de fabrication pourraient être impactées, ce qui rendrait le produit final de thérapie cellulaire plus efficace. (2) L'effet positif des lymphocytes avant LD pourrait provenir d'une aide aux fonctions anti-tumorales des lymphocytes CAR-T réinjectés. Directement (en étant donc résistants à la chimiothérapie de LD au sein des tissus ?) ou indirectement, ils pourraient soutenir l'étape de multiplication des lymphocytes et/ou leur persistance. Nos résultats montrent que les lymphocytes non CAR sont proportionnellement plus importants que les lymphocytes CAR-T chez les patients avec un fort taux de lymphocytes initial. Il reste à déterminer si une plus forte proportion de cellules non CAR impacte les réponses et les rémissions.

BIBLIOGRAPHIE

1. Sehn LH, Salles G. Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *N. Engl. J. Med.* 2021;384(9):842–858.
2. Crump M, Neelapu SS, Farooq U, et al. Outcomes in refractory diffuse large B-cell lymphoma: results from the international SCHOLAR-1 study. *Blood.* 2017;130(16):1800–1808.
3. Rosenbaum L. Tragedy, Perseverance, and Chance — The Story of CAR-T Therapy. *N. Engl. J. Med.* 2017;377(14):1313–1315.
4. Morris EC, Neelapu SS, Giavridis T, Sadelain M. Cytokine release syndrome and associated neurotoxicity in cancer immunotherapy. *Nat. Rev. Immunol.* 2021;
5. Parker KR, Migliorini D, Perkey E, et al. Single-Cell Analyses Identify Brain Mural Cells Expressing CD19 as Potential Off-Tumor Targets for CAR-T Immunotherapies. *Cell.* 2020;183(1):126-142.e17.
6. Jacobson CA, Hunter B, Armand P, et al. Axicabtagene Ciloleucel in the Real World: Outcomes and Predictors of Response, Resistance and Toxicity. *Blood.* 2018;132(Supplement 1):92–92.
7. Siddiqi T, Abramson JS, Li D, et al. Patient Characteristics and Pre-Infusion Biomarkers of Inflammation Correlate with Clinical Outcomes after Treatment with the Defined Composition, CD19-Targeted CAR T Cell Product, JCAR017. *Blood.* 2017;130(Supplement 1):193.
8. Neelapu SS, Locke FL, Bartlett NL, et al. Axicabtagene Ciloleucel CAR T-Cell Therapy in Refractory Large B-Cell Lymphoma. *N. Engl. J. Med.* 2017;377(26):2531–2544.
9. Schuster SJ, Bishop MR, Tam CS, et al. Tisagenlecleucel in Adult Relapsed or Refractory Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *N. Engl. J. Med.* 2019;380(1):45–56.
10. Abramson JS, Palomba ML, Gordon LI, et al. Lisocabtagene maraleucel for patients with relapsed or refractory large B-cell lymphomas (TRANSCEND NHL 001): a multicentre seamless design study. *Lancet Lond. Engl.* 2020;396(10254):839–852.
11. Sesques P, Ferrant E, Safar V, et al. Commercial anti-CD19 CAR T cell therapy for patients with relapsed/refractory aggressive B cell lymphoma in a European center. *Am. J. Hematol.* 2020;95(11):1324–1333.
12. Nastoupil LJ, Jain MD, Spiegel JY, et al. Axicabtagene Ciloleucel (Axi-cel) CD19 Chimeric Antigen Receptor (CAR) T-Cell Therapy for Relapsed/Refractory Large B-Cell Lymphoma: Real World Experience. *Blood.* 2018;132(Supplement 1):91–91.

13. Jaglowski S, Hu Z-H, Zhang Y, et al. Tisagenlecleucel Chimeric Antigen Receptor (CAR) T-Cell Therapy for Adults with Diffuse Large B-Cell Lymphoma (DLBCL): Real World Experience from the Center for International Blood & Marrow Transplant Research (CIBMTR) Cellular Therapy (CT) Registry. *Blood*. 2019;134(Supplement_1):766–766.
14. Jacobson C. Long-Term Survival and Gradual Recovery of B Cells in Patients with Refractory Large B Cell Lymphoma Treated with Axicabtagene Ciloleucel (Axi-Cel). 2020;
15. Schuster SJ, Tam CS, Borchmann P, 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. *Lancet Oncol*. 2021;22(10):1403–1415.
16. Chong EA, Ruella M, Schuster SJ. Five-Year Outcomes for Refractory B-Cell Lymphomas with CAR T-Cell Therapy. *N. Engl. J. Med*. 2021;384(7):673–674.
17. Chong EA, Levine BL, Schuster S. Clinical outcomes for anti-CD19 CAR T cell (CTL019) products not meeting commercial release specifications. *Cytotherapy*. 2020;22(5, Supplement):S29.
18. Fraietta JA, Nobles CL, Sammons MA, et al. Disruption of TET2 Promotes the Therapeutic Efficacy of CD19-targeted T-cells. *Nature*. 2018;558(7709):307–312.
19. Deng Q, Han G, Puebla-Osorio N, et al. Characteristics of anti-CD19 CAR T cell infusion products associated with efficacy and toxicity in patients with large B cell lymphomas. *Nat. Med*. 2020;26(12):1878–1887.
20. Locke FL, Rossi J, Neelapu SS, et al. Product characteristics associated with in vivo expansion of anti-CD19 CAR T cells in patients treated with axicabtagene ciloleucel (axicel). *J. Clin. Oncol*. 2017;35(15_suppl):3023–3023.
21. Awasthi R, Mueller KT, Yanik GA, et al. Evaluation of In Vivo CAR Transgene Levels in Relapsed/Refractory Pediatric and Young Adult ALL and Adult DLBCL Tisagenlecleucel-Treated Patients. *Blood*. 2018;132(Supplement 1):899.
22. Ayuk FA, Berger C, Badbaran A, et al. Axicabtagene ciloleucel in vivo expansion and treatment outcome in aggressive B-cell lymphoma in a real-world setting. *Blood Adv*. 2021;5(11):2523–2527.
23. Lamure S, Van Laethem F, De Verbizier D, et al. Clinical and Product Features Associated with Outcome of DLBCL Patients to CD19-Targeted CAR T-Cell Therapy. *Cancers*. 2021;13(17):4279.
24. Betsch A, Rutgeerts O, Fevery S, et al. Myeloid-derived suppressor cells in lymphoma: The good, the bad and the ugly. *Blood Rev*. 2018;32(6):490–498.

25. Jain MD, Zhao H, Atkins R, et al. Tumor Inflammation and Myeloid Derived Suppressor Cells Reduce the Efficacy of CD19 CAR T Cell Therapy in Lymphoma. *Blood*. 2019;134(Supplement_1):2885.
26. Jain MD, Zhao H, Wang X, et al. Tumor interferon signaling and suppressive myeloid cells are associated with CAR T-cell failure in large B-cell lymphoma. *Blood*. 2021;137(19):2621–2633.
27. Noaks E, Peticone C, Kotsopoulou E, Bracewell DG. Enriching leukapheresis improves T cell activation and transduction efficiency during CAR T processing. *Mol. Ther. - Methods Clin. Dev.* 2021;20:675–687.
28. Andreadis C, Tam CS, Borchmann P, et al. Correlation of Bridging and Lymphodepleting Chemotherapy with Clinical Outcomes in Patients with Relapsed/Refractory Diffuse Large B-Cell Lymphoma Treated with Tisagenlecleucel. *Blood*. 2019;134(Supplement_1):2883.
29. Neelapu SS. CAR-T efficacy: is conditioning the key? *Blood*. 2019;133(17):1799–1800.
30. Turtle CJ, Hanafi L-A, Berger C, et al. Immunotherapy of non-Hodgkin lymphoma with a defined ratio of CD8+ and CD4+ CD19-specific chimeric antigen receptor-modified T cells. *Sci. Transl. Med.* 2016;8(355):355ra116.
31. Gattinoni L, Finkelstein SE, Klebanoff CA, et al. Removal of homeostatic cytokine sinks by lymphodepletion enhances the efficacy of adoptively transferred tumor-specific CD8+ T cells. *J. Exp. Med.* 2005;202(7):907–912.
32. Hirayama AV, Gauthier J, Hay KA, et al. The response to lymphodepletion impacts PFS in patients with aggressive non-Hodgkin lymphoma treated with CD19 CAR T cells. *Blood*. 2019;133(17):1876–1887.
33. Bukhari A, El Chaer F, Koka R, et al. Rapid relapse of large B-cell lymphoma after CD19 directed CAR-T-cell therapy due to CD-19 antigen loss. *Am. J. Hematol.* 2019;94(10):E273–E275.
34. Vercellino L, Di Blasi R, Kanoun S, et al. Predictive factors of early progression after CAR T-cell therapy in relapsed/refractory diffuse large B-cell lymphoma. *Blood Adv.* 2020;4(22):5607–5615.
35. Dean EA, Mhaskar RS, Lu H, et al. High metabolic tumor volume is associated with decreased efficacy of axicabtagene ciloleucel in large B-cell lymphoma. *Blood Adv.* 2020;4(14):3268–3276.
36. Locke FL, Rossi JM, Neelapu SS, et al. Tumor burden, inflammation, and

product attributes determine outcomes of axicabtagene ciloleucel in large B-cell lymphoma. *Blood Adv.* 2020;4(19):4898–4911.

37. Chen P-H, Lipschitz M, Wright K, et al. Analysis of CAR-T and Immune Cells within the Tumor Micro-Environment of Diffuse Large B-Cell Lymphoma Post CAR-T Treatment By Multiplex Immunofluorescence. *Blood.* 2018;132(Supplement 1):678.

38. Reiss DJ, Do T, Kuo D, et al. Multiplexed Immunofluorescence (IF) Analysis and Gene Expression Profiling of Biopsies from Patients with Relapsed/Refractory (R/R) Diffuse Large B Cell Lymphoma (DLBCL) Treated with Lisocabtagene Maraleucel (liso-cel) in Transcend NHL 001 Reveal Patterns of Immune Infiltration Associated with Durable Response. *Blood.* 2019;134(Supplement_1):202.

39. Du M, Hari P, Hu Y, Mei H. Biomarkers in individualized management of chimeric antigen receptor T cell therapy. *Biomark. Res.* 2020;8:13.

40. Locke FL, Ghobadi A, Jacobson CA, et al. Long-term safety and activity of axicabtagene ciloleucel in refractory large B-cell lymphoma (ZUMA-1): a single-arm, multicentre, phase 1-2 trial. *Lancet Oncol.* 2019;20(1):31–42.

41. Dean EA, Mhaskar RS, Lu H, et al. High metabolic tumor volume is associated with decreased efficacy of axicabtagene ciloleucel in large B-cell lymphoma. *Blood Adv.* 2020;4(14):3268–3276.

42. Lee DW, Santomasso BD, Locke FL, et al. ASTCT Consensus Grading for Cytokine Release Syndrome and Neurologic Toxicity Associated with Immune Effector Cells. *Biol. Blood Marrow Transplant. J. Am. Soc. Blood Marrow Transplant.* 2019;25(4):625–638.

43. Cheson BD, Fisher RI, Barrington SF, et al. Recommendations for Initial Evaluation, Staging, and Response Assessment of Hodgkin and Non-Hodgkin Lymphoma: The Lugano Classification. *J. Clin. Oncol.* 2014;32(27):3059–3067.

44. Choi HK, Liu S, Curhan G. Intake of purine-rich foods, protein, and dairy products and relationship to serum levels of uric acid: the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Arthritis Rheum.* 2005;52(1):283–289.

45. Régent A, Kluger N, Bérezné A, Lassoued K, Mouthon L. Démarche diagnostique devant une lymphopénie : quand penser à la lymphopénie CD4+ idiopathique ? *Rev. Médecine Interne.* 2012;33(11):628–634.

46. Sato E, Olson SH, Ahn J, et al. Intraepithelial CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes and a high CD8+/regulatory T cell ratio are associated with favorable prognosis in ovarian cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2005;102(51):18538–18543.

47. Takada K, Danning CL, Kuroiwa T, et al. Lymphocyte depletion with

fludarabine in patients with psoriatic arthritis: clinical and immunological effects. *Ann. Rheum. Dis.* 2003;62(11):1112–1115.

48. Rundqvist H, Veliça P, Barbieri L, et al. Lactate potentiates differentiation and expansion of cytotoxic T cells. 2019.

49. Chen J, He Q, Liu J, et al. CD8⁺ tumor-infiltrating lymphocytes as a novel prognostic biomarker in lung sarcomatoid carcinoma, a rare subtype of lung cancer. *Cancer Manag. Res.* 2018;10:3505–3511.

50. Kondratiev S, Sabo E, Yakirevich E, Lavie O, Resnick MB. Intratumoral CD8⁺ T lymphocytes as a prognostic factor of survival in endometrial carcinoma. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 2004;10(13):4450–4456.

51. Desoutter J, Ossart C, Lacassagne M-N, et al. Cryopreservation and thawing of hematopoietic stem cell CD34-induced apoptosis through caspase pathway activation: Key role of granulocytes. *Cytotherapy.* 2019;21(6):612–618.

52. Novo M, Sidiqi MH, Paludo J, et al. Peak Lymphocyte Count after CAR T Infusion Is a Clinically Accessible Test That Correlates with Clinical Response in Axicabtagene Ciloleucel Therapy for Lymphoma. *Blood.* 2019;134(Supplement_1):4106.

53. Absolute lymphocyte count proliferation kinetics after CAR T-cell infusion impact response and relapse - PubMed.

54. Ray-Coquard I, Cropet C, Van Glabbeke M, et al. Lymphopenia as a prognostic factor for overall survival in advanced carcinomas, sarcomas, and lymphomas. *Cancer Res.* 2009;69(13):5383–5391.

55. Fang PQ, Gunther JR, Wu SY, et al. Radiation and CAR T-cell Therapy in Lymphoma: Future Frontiers and Potential Opportunities for Synergy. *Front. Oncol.* 2021;11:644.

56. Cesaire M, Le Mauff B, Rambeau A, Toutirais O, Thariat J. [Mechanisms of radiation-induced lymphopenia and therapeutic impact]. *Bull. Cancer (Paris).* 2020;107(7–8):813–822.

ANNEXES

A. Figures supplémentaires

Variables	Médiane	Limites tertiles	Valeurs minimales	Valeurs maximales
ALAT (UI/L)	18	15 – 25	6	135
ASAT (UI/L)	35	22 - 28	13	93
Albumine (g/L)	24	33 – 37	16.6	44.1
BNP (ng/L)	50	32 - 75	11	1076
CPK (UI/L)	36	30 – 63	7	486
CRP (mg/L)	30	4 – 21	0.4	278
Ferritine (µg/L)	1000	275 – 580	19	9594
GGT (UI/L)	38	30 – 65	9.5	635
Lactate (mmol/L)	1	0.8 – 1.2	0.4	4.6
LDH (UI/L)	220	220 – 315	130.5	1931
Lipase (UI/L)	15	13 – 20	4	125
Magnésium (mmol/L)	0.77	0.74 – 0.78	0.33	0.9
PAL (UI/l)	95	85 – 110	42	482
PCT (µg/L)	0.07	0.05 – 0.09	0.02	2
Troponine (ng/L)	10	6.85 – 13.7	5	47
Acide urique (µmol/L)	267	236 – 305	111	668
Calcium (mmol/L)	2.3	2.22 – 2.35	1.72	3
Créatinine (µmol/L)	68	59 – 76	36	252
Phosphore (mmol/L)	1.1	1.03 – 1.21	0.62	1.58
Triglycérides (g/L)	1.2	0.97 – 1.48	0.54	4
Urée (mmol/L)	4	3.5 – 4.7	1.9	16
Vitamine D (nmol/L)	47	/	14	90
Fibrinogène (g/L)	3.7	3.1 – 4.4	1.79	8.24
Ratio TCA	1	0.93 – 0.99	0.52	1.75
TP (%)	90	83 – 95	47	114
Hémoglobine (g/L)	100	97 – 109	66.5	150
Lymphocytes (G/L)	0.55	0.45 – 0.75	0.16	3.06
PNN (G/L)	2.55	2.05 – 2.66	0.14	19.7
Plaquettes (G/L)	195	149 – 228	21	659.5
Préalbumine (g/L)	0.2	0.18 – 0.24	0.05	0.52
Ag aspergillaire	0.25	/	0.1	0.42
Glucane (pg/mL)	0.05	/	0.03	0.27
CD4 (cellule/µL)	216	150 – 254	42	848
CD8 (cellule/µL)	165	128 – 266	33	988
NK (cellule/µL)	100	43 -70	0	198

Tableau 4 - Tableau descriptif des paramètres biologiques analysés.

Les variables significativement associées à la survie sans progression en analyse univariée ont été écrites en violet. Les variables indépendamment associées à la survie sans progression en analyse multivariée ont été écrites en bleu.

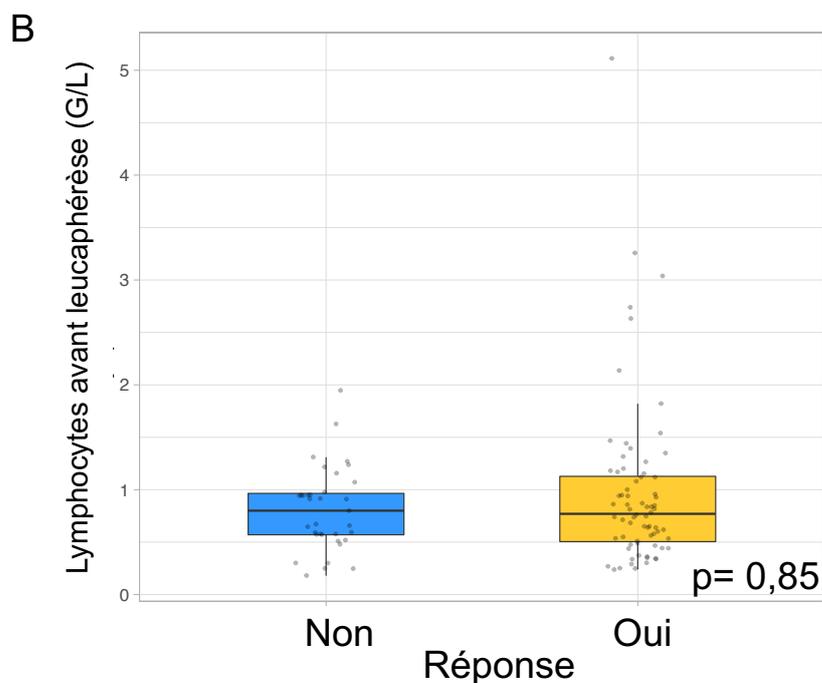
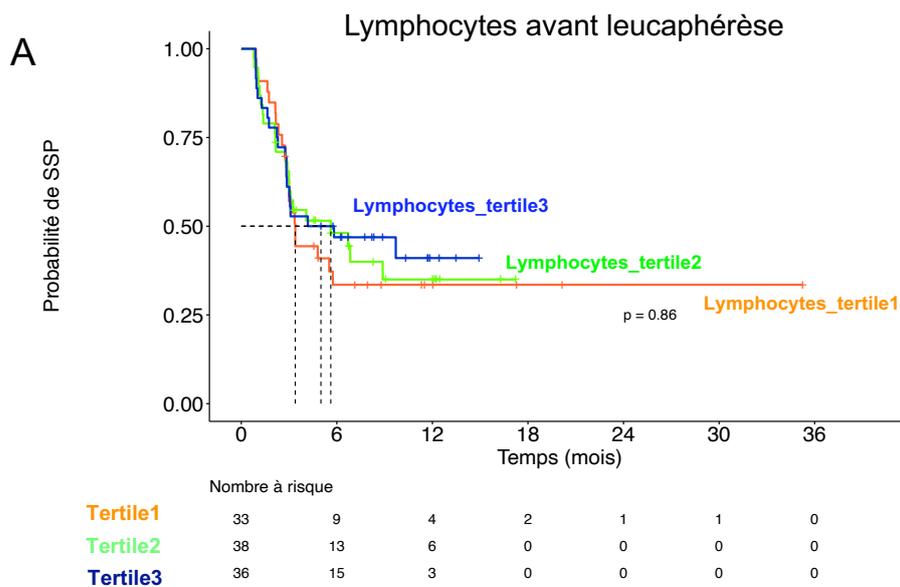


Figure 16 – Impact des lymphocytes périphériques avant leucaphérèse sur la SSP et la réponse.
A. Courbes de Kaplan Meier illustrant la SSP en fonction des lymphocytes avant leucaphérèse, divisés selon leur tertile de distribution. Le test du log-rank a été réalisé pour comparer les courbes de survie des différents groupes. SSP : Survie sans progression. **B.** Graphique en boîte à moustache représentant la distribution des lymphocytes avant leucaphérèse en fonction de la réponse. Chaque point correspond aux données d'un patient. Le test de Mann-Witney-Wilcoxon a été réalisé pour comparer les valeurs du paramètre entre les groupes de patient répondeurs et non répondeurs.

B. Conclusions officielles de thèse



Nom, prénom du candidat : CORDEIL Stéphanie

CONCLUSIONS

Les lymphocytes T autologues génétiquement modifiés pour exprimer un récepteur antigénique chimérique dirigé contre le CD-19 (cellules *CAR-T* anti CD-19) constituent désormais le traitement de rattrapage incontournable des lymphomes à grandes cellules B réfractaires ou en rechute après 2 lignes thérapeutiques. Trois essais cliniques pivots (ZUMA-1, JULIET et TRANSCEND) ont effectivement rapporté des taux de réponse allant jusqu'à 80%, restant sans équivalent dans cette population de patients au pronostic particulièrement défavorable. Par ailleurs, jusqu'à 40% des patients demeurent en rémission persistante jusqu'à 4 ans après une seule injection de cellules *CAR-T*. Ces données mettent également en lumière que plus de la moitié des patients va malheureusement rechuter. Par conséquent, les enjeux majeurs de la recherche médicale actuelle sont d'une part, l'identification de ce groupe de patients potentiellement guéri grâce aux cellules *CAR-T* et d'autre part, l'amélioration de notre compréhension des mécanismes d'action de ce « médicament vivant ». Les données actuelles montrent que la majorité des facteurs habituellement pronostiques dans les lymphomes B agressifs semblent « gommés » par les cellules *CAR-T*.

L'objectif principal de ce travail de thèse est la recherche de nouveaux marqueurs biologiques capables de prédire l'efficacité du traitement par cellules *CAR-T* dans les lymphomes à grandes cellules B réfractaires ou en rechute. Au travers de cette étude qui se veut exploratoire, la découverte de bio-marqueurs pronostiques essentiels pour la prise en charge personnalisée des patients à risque de rechute, pourrait également révéler des mécanismes physiopathologiques de résistance aux cellules *CAR-T* encore insoupçonnés.

Cette étude rétrospective monocentrique menée au CHU de Lyon Sud a porté sur une cohorte de 107 patients présentant un lymphome à grandes cellules B en rechute ou réfractaires après au moins 2 lignes thérapeutiques. Les patients ont été traités par cellules *CAR-T* anti CD19 dans le cadre d'essais cliniques ou en « vie réelle » suite à l'obtention de l'AMM, sur la période de janvier 2017 à octobre 2020. Plus de trente paramètres biologiques, hématologiques et biochimiques, facilement réalisables dans la pratique quotidienne ont été sélectionnés. Les résultats de leurs dosages avant le début de la chimiothérapie de lymphodéplétion (6 jours avant l'infusion des cellules *CAR-T*) ont été collectés.

Les patients de la cohorte avaient une médiane d'âge de 59 ans [IIQ 20,3 – 78,5]. Ils présentaient un état général conservé (82% avaient un PS à 0-1) et une absence de signes B malgré une maladie disséminée (74% de stade Ann Arbor III-IV) au moment de la décision de traitement par cellules *CAR-T*. Cinquante patients ont bénéficié des cellules *CAR-T* Axi-cel, cinquante autres des cellules Tisa-cel tandis que seulement 7 patients ont reçu les cellules Liso-cel. Avec une durée de suivi médiane de 141 jours, la médiane de survie sans progression de la cohorte était de 124 jours [IIQ 92 - 295] tandis que la médiane de survie globale était de 386 jours [IIQ 336 - non atteinte]. Nous avons observé un taux de meilleure réponse globale (*i.e* réponses partielle et complète définies selon les critères de Deauville aux TEP à 1 et/ou à 3 mois après infusion des cellules *CAR-T*) de 76%. Enfin, la moitié des patients était toujours en réponse 240 jours [140 - non atteinte] après avoir reçu le traitement.

Dans un premier temps, nous avons conduit une analyse univariée exploratoire sur la survie sans progression (SSP) de l'ensemble des paramètres biologiques dosés avant lymphodéplétion (LD). Afin de déceler d'éventuels effets-doses, les variables biologiques quantitatives ont la plupart du temps été analysées en tant que variables catégorielles selon les tertiles de leur distribution. Six variables biologiques étaient significativement associées à la SSP. Il s'agissait du taux de lymphocytes, du ratio TCA, de l'acide urique, des triglycérides, de la CRP et des LDH. Après analyse multivariée prenant en compte ces variables significatives en univarié, seuls les lymphocytes et l'acide urique avant LD restaient indépendamment associés à la SSP des patients. De plus, après ajustement sur l'unique facteur clinique indépendamment associé à la SSP déjà publié pour les patients traités dans notre centre, à savoir le nombre de lignes de chimiothérapie antérieure, les lymphocytes et l'acide urique conservaient leur caractère pronostique indépendant.

Pour la suite du travail, nous nous sommes attachés à mieux caractériser les lymphocytes avant LD en tant que nouveau facteur pronostique, non décrit auparavant. L'analyse des courbes de survie représentant la SSP des patients regroupés selon les valeurs des lymphocytes en tertiles a révélé un effet dose sur la SSP. En effet, les patients avec des taux de lymphocytes bas (1^{er} tertile de 0,09 à 0,44 G/l) avaient une médiane de SSP de 87 jours ; les patients dont le taux de lymphocytes était compris dans le 2^{ème} tertile (de 0,44 à 0,76 G/l) bénéficiaient d'une meilleure médiane de SSP à 168 jours et enfin, les patients avec les taux de lymphocytes les plus élevés (3^{ème} tertile de 0,76 à 3,06 G/l) rechutaient encore plus tardivement, avec une médiane de SSP estimée à 295 jours. De plus, les lymphocytes avant LD étaient également associés à un bénéfice en termes de survie globale de façon dose dépendante (test du log rank, $p = 0,016$). Par ailleurs, une analyse en sous-groupe a montré que l'impact des lymphocytes avant LD sur la SSP était conservé quelque soit le type de cellules CAR-T utilisé, Axi-cel, Tisa-cel ou Liso-cel.

Nous avons ensuite montré que les lymphocytes semblaient exercer un effet global sur l'efficacité du traitement par cellules CAR-T. En effet, d'une part, les patients dont les taux de lymphocytes étaient plus élevés avant LD, avaient significativement plus de chance d'être répondeurs au traitement par cellules CAR-T (OR = 2,63 [IC 95% 1,04-7,12]). D'autre part, un taux de lymphocytes plus important avant LD augmentait la probabilité des patients d'obtenir une réponse prolongée (test du log rank, $p = 0,046$). En effet, les patients dont les lymphocytes avant LD étaient compris dans les tertiles 2 et 3 avaient une médiane de durée de réponse non atteinte contre une médiane à 71,5 jours pour les patients du tertile 1.

Afin de déterminer si un type cellulaire au sein des lymphocytes totaux périphériques était spécifiquement responsable de cet impact sur la réponse et la rémission des patients, nous avons analysé l'effet des lymphocytes T CD4, T CD8 et des *Natural Killers* (NK). A noter que les patients présentaient tous une profonde lymphopénie B à rattacher probablement au(x) précédent(s) traitement(s) par RITUXIMAB. Aucun des 3 sous-types lymphocytaires n'impactaient la SSP de façon significative. La comparaison des taux des lymphocytes T CD4, T CD8 et NK n'était pas significativement différente entre les patients répondeurs et non répondeurs. Cependant, un taux de lymphocytes T CD8 plus élevé avant LD était associé à des durées de réponse plus importantes de façon significative (test du log rank, $p = 0,038$). La même tendance était observée concernant les taux de lymphocytes T CD4 alors qu'un tel effet n'a pas été observé avec les NK. Le dosage des sous-populations étant uniquement disponible pour 38 patients de notre cohorte, nos analyses ont pu être limitées par un défaut de puissance.



Enfin, nous avons mis en évidence que les lymphocytes périphériques dosés avant LD étaient fortement corrélés au taux de lymphocytes au moment de la leucaphérèse (test de Pearson, $r = 0,59$, $p = 5,8.10^{-11}$). Une corrélation était également observée entre les lymphocytes avant LD et les lymphocytes dosés après infusion des cellules CAR-T (*i.e* jour 0) au jour + 8, jour + 15, jour + 30 et jour + 90).

En conclusion de ce travail préliminaire, les lymphocytes avant LD apparaissent comme un nouveau facteur biologique indépendant prédictif de la rechute et de la réponse après traitement par cellules CAR-T chez les patients atteints par un lymphome B agressif réfractaire. L'effet des lymphocytes avant LD devra être prochainement validé sur une deuxième cohorte indépendante de patients traités par cellules CAR-T. Si ce biomarqueur pronostique venait à être confirmé, alors les facteurs à l'origine de la lymphopénie devront être identifiés afin de pouvoir faire l'objet d'un meilleur contrôle à l'avenir. Nos premiers résultats montrent que la profondeur de la lymphopénie avant LD ne semble pas en lien avec un nombre élevé de lignes thérapeutiques antérieures.

La suite de ce travail va essentiellement s'orienter autour de l'exploration du mécanisme d'action éventuel des lymphocytes endogènes du patient avant lymphodéplétion. L'impact que nous observons est-il le reflet d'un taux de lymphocytes plus élevé au moment de la leucaphérèse, déjà décrit comme associé à la réponse aux cellules CART dans la littérature ? Existe-t-il une interaction entre les sous-populations lymphocytaires T du patient et les cellules CAR-T responsables d'une meilleure expansion et persistance de ces dernières, deux facteurs connus comme liés à l'efficacité des cellules CAR-T ? Ou s'agit-il de l'effet pronostique des lymphocytes déjà connu en oncologie générale sans que le mécanisme ne soit encore élucidé à ce jour ?

Le Président de la thèse,
Pr BACHY Emmanuel

Vu :
Pour le Président de l'Université,
Pr Gilles RODE-CLAUDON
Le Doyen de la Faculté de Médecine Lyon Est



Professeur Gilles RODE
Administrateur provisoire
Vu et permis d'imprimer
Lyon, le 15 SEPTEMBRE 2021



Stéphanie Cordeil - Nouveaux biomarqueurs pour la prédiction des rechutes et des toxicités dans les lymphomes B agressifs réfractaires traités par cellules CAR-T.

RESUME : Le traitement par les cellules CAR-T anti-CD19 a considérablement amélioré le pronostic des patients atteints par un lymphome à grandes cellules B réfractaire ou en rechute (LGCB-R/R). Pourtant, plus de la moitié des patients rechute encore après ce traitement. Il est donc essentiel d'identifier les facteurs permettant de distinguer rémission prolongée et rechute précoce ainsi que ceux impliqués dans l'apparition des toxicités potentiellement sévères, à savoir, le syndrome de relargage cytokinique (SRC) et la neurotoxicité (NT). Dans le but de découvrir de nouveaux biomarqueurs prédictifs de l'efficacité des cellules CAR-T et des toxicités induites par ces dernières, notre étude a porté sur une trentaine de paramètres biologiques dosés avant lymphodéplétion (LD) au sein d'une cohorte de 107 patients traités au CHU de Lyon Sud. Sur le plan pronostique, l'analyse multivariée des six paramètres significatifs en univarié (acide urique, triglycérides, CRP, ratio TCA, LDH, lymphocytes) a montré que l'acide urique ($p=0,03$) et les lymphocytes ($p=0,02$) avant LD étaient des biomarqueurs indépendants prédictifs de la survie sans progression (SSP). Un taux élevé de lymphocytes avant LD était associé à une meilleure qualité de réponse (rémission complète versus rémission partielle et maladie stable/progressive, $p<0,001$). Les patients dont le ratio CD4/CD8 était inférieur à 1 avant LD ont eu une meilleure SSP ($p=0,03$) suggérant un rôle prédominant des lymphocytes T CD8. D'un point de vue mécanistique, nos résultats ont indiqué que l'effet des lymphocytes avant LD pourrait être expliqué par une meilleure qualité du produit de leucaphérèse (lymphocytes avant LD et au moment de l'aphérèse : $r= 0,54$; $p=0,007$) et/ou une plus forte expansion des cellules T non CAR par rapport aux cellules CAR-T (lymphocytes avant LD et pic d'expansion des cellules non CAR : $r= 0,59$; $p<0,001$). Sur le plan des toxicités, un taux élevé de lactate veineux avant LD a permis de prédire la survenue des toxicités sévères avec un effet dose (SRC : OR=2,12 ; $p=0,005$ / NT : OR=1,48 ; $p=0,03$). En conclusion, la découverte de l'impact des taux de lymphocytes et de lactate avant LD améliore respectivement l'identification des patients à risque de rechute et de toxicités sévères. Ces biomarqueurs ouvrent ainsi de nouvelles pistes pour une meilleure compréhension du mode d'action de cette immunothérapie, ce qui permettrait *in fine* de vaincre les mécanismes de résistance pour améliorer les taux de rémissions à long terme.

MOTS CLES : Lymphome à grandes cellules B, cellules CAR-T, biomarqueurs

JURY :

Président : Monsieur le Professeur Emmanuel BACHY
Membres : Monsieur le Professeur Hervé GHESQUIERES
Madame le Professeure Alexandra TRAVERSE-GLEHEN
Monsieur le Docteur Laurent JALLADES
Monsieur le Docteur Pierre SESQUES

DATE DE SOUTENANCE : 22 octobre 2021

ADRESSE POSTALE DE L'AUTEUR : 25^{ter} rue Challemeil Lacour, 69007 LYON
EMAIL : stephanie.cordeil@chu-lyon.fr