

CAR T Cell:

Comment s'adapter aux multiplicités de conditions de prélèvements de lymphocytes pour CAR T cells

✿ Docteur Tarik KANOUNI

✦ Unité d'Aphérèse Thérapeutique et
d'Hémovigilance,

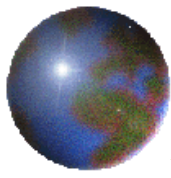
• CHU SAINT ELOI MONTPELLIER

- Session Collecte Cellulaire par Cytaphérèse (Auditorium)
- SFH 29-30/01/2026



Objectif cellulaire de collecte, Modèle avant l'arrivée des CART.

- ❖ En thérapie cellulaire CSH: Relation linéaire entre l'objectif de collecte et la réinjection des cellules car pas de transformation dans le processus.
 - ❖ Cellules fraîches le jour même pas de modification.
 - ❖ Séjour cellules fraîches avec un délai de 24 à 48h ou légère perte en termes de viabilité.
 - ❖ Processus de cellules congeler. (perte de 10%-20% CD34)
- ❖ L'objectif de cellules à prélever est directement relié à la quantité de cellules injectés
 - ❖ Caractère contraignant pour atteindre l'objectif, si possible recollecter
- ❖ En car T c'est différent du fait de l'expansion des cellules transduites
 - ❖ Découplage collecte injection
 - ❖ Phase d'expansion des lymphocytes CD3⁺ est systématiquement incluse
 - ❖ - Activation T (CD3/CD28)
 - ❖ - Transduction virale
 - ❖ - Expansion obligatoire pour atteindre la dose finale
 - ❖ - Variabilité selon qualité des T initiaux



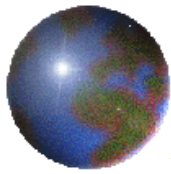
Etat des lieux des demandes de prélèvement de lymphocytes pour CART

Produit	Objectifs cellulaire	Objectif non cellulaire	Autre condition
Kymriah (Novartis)	CD3 $\geq 1 \times 10^9$ ou TNC $\geq 2 \times 10^9$ => Objectif contraignant		Cryoconservation <24h Ne pas dépasser 3 10 ⁹ CD3
Yescarta (Kite/Gilead)	5–10 $\times 10^9$ MNC (~12–15 L)		30 cm de tubulure
Tecartus (Kite/Gilead)	Pas d'objectif publié (2–4 $\times$ TBV)	MCL: 2×10^6 /kg; ALL adulte: 1×10^6 /kg	Ajusté au CD3/ALC
Breyanzi (BMS)		1/ si Ly ≥ 1 G/L traiter 7 Litres 2/ si Ly < 1 G/L traiter 12 Litres	Ne pas traité plus que la cible indiqué 150 ml à prélever d'emblé mixé; vol collecte ≤ 450 ml 10 cm de tubulure disponible
Abecma (BMS)		1/ si Ly $\geq 0,5$ G/L traiter 2 VST 2/ si Ly < 0,5 G/L traiter 3 VST	
Carvykti (Janssen/Legend)	Pas d'objectif publié	Recommander de traiter 2 à 4 TBV	



Conclusion

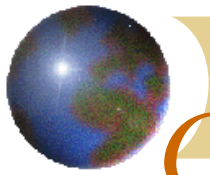
- ❖ Non standardisé
- ❖ Ils sont issus de protocole ayant permis de valider les CART
- ❖ Ils sont indicatif CAD à postériori car pas de nouvelle Aphérèse (sauf KYMRIAH)



Dose CART à Administrer

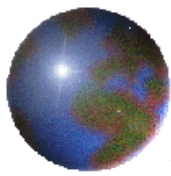
Produit	Par Kilo en 10 ⁶	Totaux en 10 ⁸	Commentaires
Kymriah (Novartis) LAL	0,1-5	0,1-2,5	
Kymriah (Novartis) LNH DLBCL	0,1-2,5	0,6-6	
Yescarta (Kite/Gilead)	2	max 2	
Tecartus (Kite/Gilead)	1 (LAL) 2 (MCL)	MCL: 2×10^6 /kg; ALL adulte: 1×10^6 /kg	Ajusté au CD3/ALC
Breyanzi (BMS)		Dose fixe: 0,9–1,1	CD4/CD8 = 1:1 2 seringues 1 CD4 et 1 CD8
Abecma (BMS)		Dose fixe: 3–5	
Carvykti (Janssen/Legend)	0,5-1 (cible 0,75)		

🎯 Dose injectée en CART précise et plutôt homogène

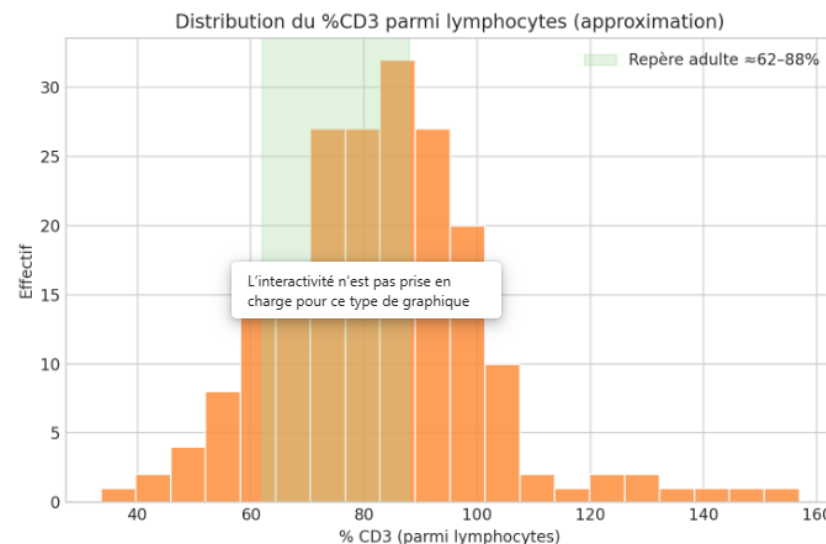
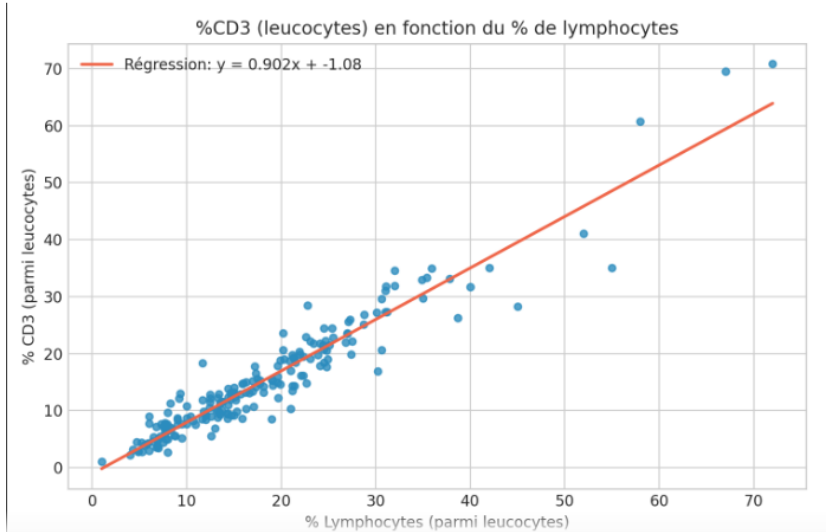


Comment s'adapter aux conditions pour une aphérèse optimale

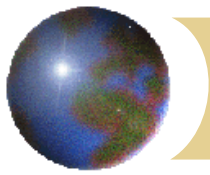
- ✿ Conditions liées aux patients
 - ▣ Lymphopénie, rapport Ly/CD3+
 - ▣ Autre facteur anémie , ..
- ✿ Est-il possible de prédire les objectifs demandés?
 - ▣ Approcher une modélisation de l'Aphérèse sur la collecte de lymphocyte
 - ▣ Rendement Ly, CD3 et voir leur variabilité,
 - Algorithme
 - Fiabilité ...
- ✿ On n'aborde pas la question « qualitative » des lymphocytes
 - ▣ Historique et le délai des derniers ttt de chimio et éviction des médicaments toxiques pour les ly



Analyse lymphocyte sanguin / CD3+ en pré aphérèse DLBCL (sans cellules anormales)



- On nous demande de collecter des CD3 qui ne sont pas facilement disponible
- Lymphocyte technique cytologique
 - Lymphocytes totaux en cytologie est notre repère, c'est elle qui est disponible
 - nous évaluons la lymphopénie en amont à la consultation la veille de l'Aphérèse et le jour J
- Lymphocyte CD3 + disponible en cytométrie
 - Le jour de la collecte +- à postériori*
- Analyse : 197 collectes analysées
- Tous DLBCL sans ly anormaux
 - Graphique 1
 - Analyse % CD3 / Leuco versus % Lympho / Leuco
 - Distribution homogène en %
 - Graphique 2
 - Distribution du % de CD 3 au sein des lymphocytes
 - En comparaison / Population normale (verts claire)



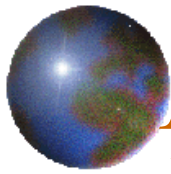
Cellule cible à collecter

✚ Proportion des CD3 / Lymphocyte et leur variabilité en situation clinique

Situation clinique	Lymphocytes totaux (attendus)	Lymphocytes CD3 (T) — proportion/absolu	Mécanisme / Points clés
Individu sain	$\approx 1,0-4,0 \times 10^9/L$	CD3 $\approx 60-80\%$ des lymphocytes ($\approx 0,6-2,5 \times 10^9/L$ selon total)	Répartition normale T/B/NK; T CD3 majoritaires.
Traitement anti-CD20 (rituximab, obinutuzumab...)	Souvent normal ou ↓ léger (transitoire)	% CD3 ↑ relatif (B ↓); absolu CD3 généralement stable ($\pm$ léger ↑)	Déplétion B (CD20+); T non ciblés → proportion T augmente.
Prolifération lymphocytaire B non-CD3 — LLC (CLL), LAL, LNH manteaux	↑↑ (lymphocytose) +- pancytopénie	% CD3 ↓ (dilué par expansion B); absolu CD3 normal ou ↓	Clonalité B CD19+/CD5+ typique; T souvent fonctionnellement altérés.
Traitement anti-CD3 (p.ex. muromonab-CD3/OKT3) ou thérapies T-cell depleting	↓ (souvent)	CD3 ↓↓↓ (profonde lymphopénie T); % CD3 ↓ marqué et absolu ↓	Ciblage direct des T CD3+ → lymphopénie T; risque infectieux ↑.

Efficacy of CAR T-cell therapy is not impaired by previous bispecific antibody treatment in large B-cell lymphoma, Blood jul 2024

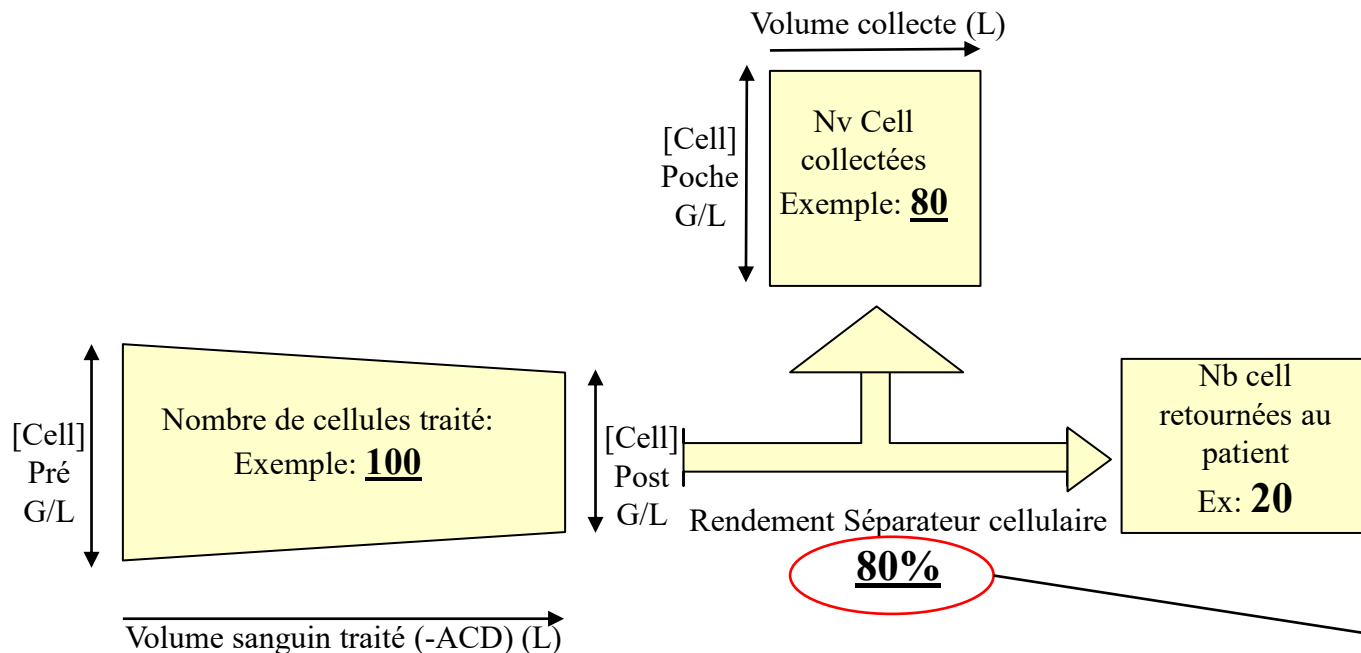
Temps médian entre la dernière dose de BsAb et la leucaphérèse : 51 jours (fourchette : 13 à 512 jours)
BsAbs demie-vie plustot courte (10-20 jours). Entraiant une faisabilité des CART



Rendement de collecte: le Concept

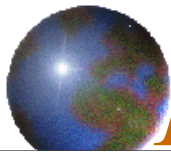
Concept: Rapport exprimé en pourcentage

- Quantité totale d'une cellules traités dans un séparateur cellulaire
- Quantité totale de cellules récupéré dans la poche



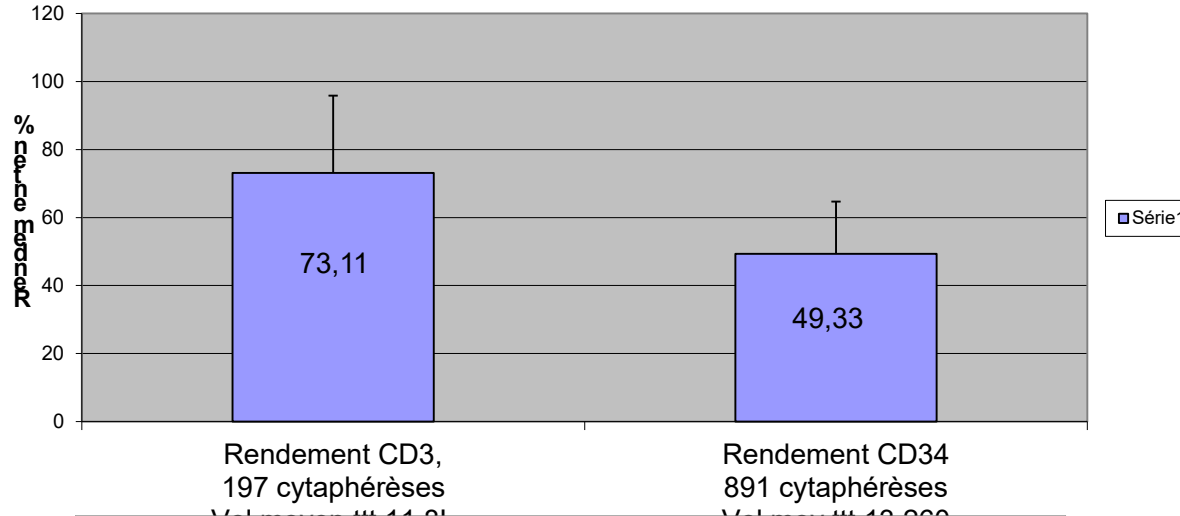
Plus cette valeur est stable et meilleurs sera la prédictibilité

$$Rendement(\%) = \frac{[cell]poche (G/L) \times Vol Poche(L)}{\frac{[cell] pré + [cell] post (G/L)}{2} \times Vol ttt(L)}$$



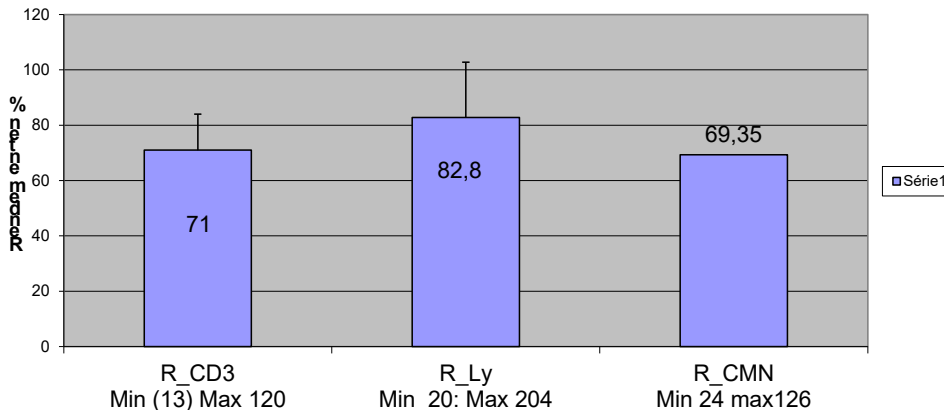
Rendement Recueil CART

**Rendement moyen en CD3 en comparaison avec Rendement moyen en CD34
Sur OPTIA programme CMNC**

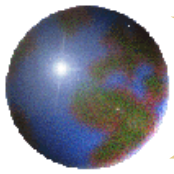


- ✚ Analyse sur 222 Aphérèses
- ✚ Volume moyen traité 11,8 L
- ✚ Résultat de 77,11,72 %
- ✚ Ecart type = 22,2
- ✚ Toutes sur OPTIA et le programme CMNC
- ✚ Rend Supérieur à celui de CD34 (analysé sur 891 Cyta)

**Rendement moyen en CD3 en comparaison avec Rendement moyen en Ly et CMN
Sur OPTIA programme CMNC**

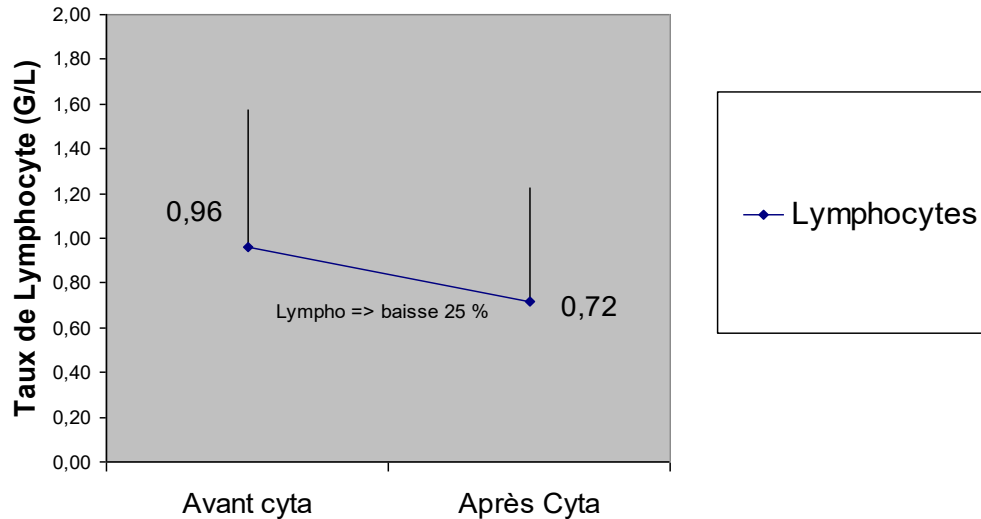


- ✚ Equivalence des rendements?
- ✚ Analyse sur 207 aphérèses:
- ✚ CD3 (cytométrie)
- ✚ Lymphocytes (cytologie)
- ✚ CMN cytologie
- ✚ CI équivalent



Rendement: baisse du taux de Lymphocytes en post Aphérèse

Evaluation pré - Post Aphérèse CART de paramètres sanguins collectés
Lymphocytes



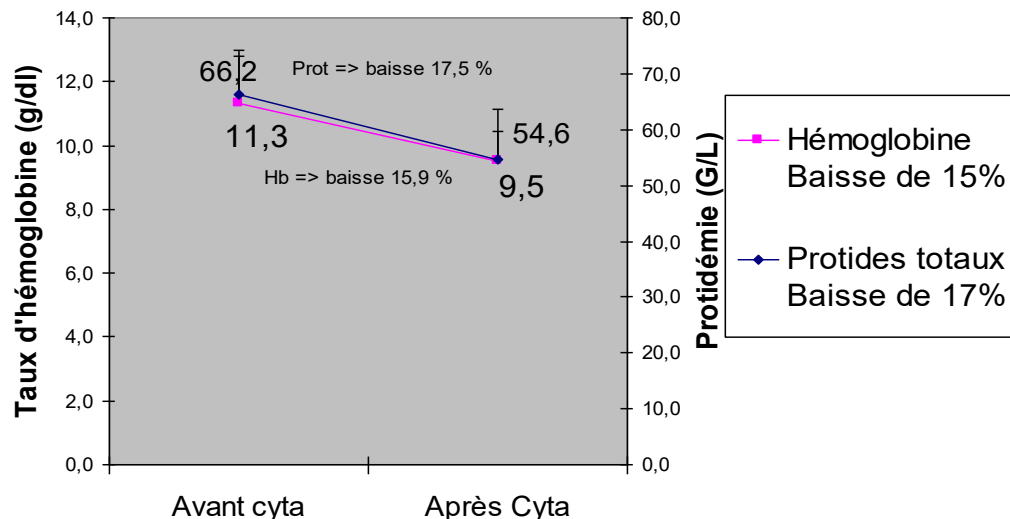
- ✦ Analyse faite sur 55 cytaphérèses avec données avant et après
- ✦ Intérêt de l'évaluation baisse en post cyta

- Avec un Rendement à 74%, en ttt 1 masse sanguine je dois m'attendre à une baisse significative
- or ici avec 3 masses ttt il n'y a qu'une baisse moyenne de 25%

Conclusion:

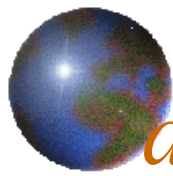
- => pas de phénomène d'épuisement de la ressource avec le vol ttt
- Je continue à être efficace même après 3 masses sanguines.

Evaluation pré - Post Aphérèse CART de paramètres sanguins non collectés
Hémoglobine et Protides sériques totaux

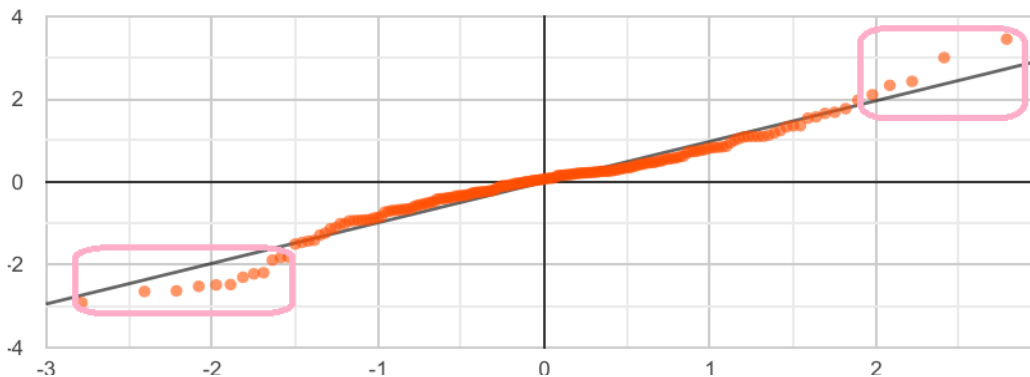
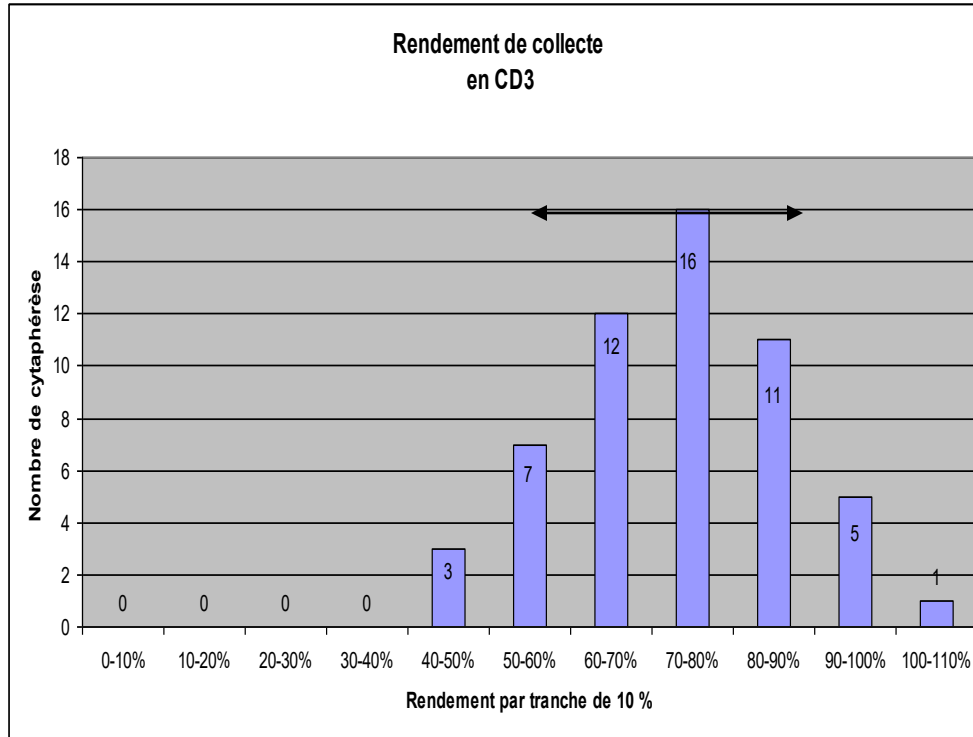


- ✦ Baisse à pondérer par un phénomène de dilution par l'ACD
- ✦ Analyse faite sur 55 cytaphérèses avec données avant et après sur 2 paramètres **non épurés**

- Hémoglobine: baisse de 15,9%
- Protides: baisse de 17,5



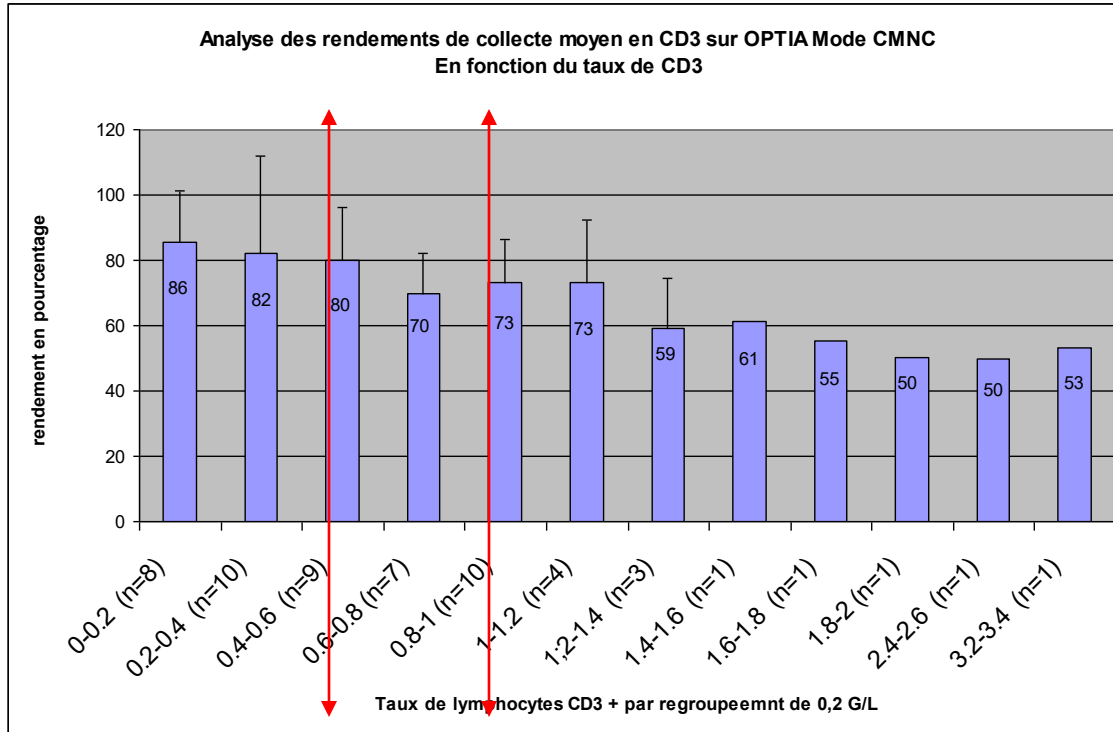
Rendement sur collecte: Intervalle de confiance



- ✚ Une condition de prédictibilité est la distribution de type normale (gaussienne)
- ✚ Intervalle de confiance: quel risque je prends de me tromper si je prend cette moyenne comme référence.
- ✚ distribution des rendements **gaussienne** => intervalle de confiance prend toute sa valeur
- ✚ Graphique du bas: sur 220 cytophères analyses
- ✚ diagrammes quantiles quantiles (Q-Q plots)
- ✚ Outils statistiques qui comparent les points à une distribution normale
- ✚ Valeur statistique $p=0,4815$
- ✚ Valeur aberrante aux extrémités
- ✚ Les très faibles rendements



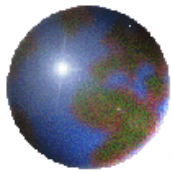
Rendement sur collecte: Répartition



- Une de nos préoccupations est de collecter efficacement les patients ayant un taux de Lymphocyte bas.
- Analyse du rendement en fonction de la lymphodéplétion dans le sang
- Le rendement est constant quelque soit le taux de lymphocyte.
- Surtout pour les lymphopénies sévères $< 0,2 \text{ G/L}$ $n = 8$



.



Application d'un algorithme

❖ Critère pour appliquer l'algorithme/ Rendement:

- ❖ Stables dans le temps au delà de 3 masses sanguine sans épuisement de la ressource
- ❖ En moyenne de 72% mais pondéré à 40% => intervalle de confiance 80%
- ❖ Stable quelque soit la concentration de la cellules à récupérer
- ❖ Au total: fiable pour Extrapoler nb de cellules à collectées
- ❖ Notion de pondération de l'intervalle de collecte plus on pondéré plus on traite de volume songions
- ❖ C'est un paramètre

$$❖ \text{Rendement}(\%) = \frac{[cell]poche \left(\frac{G}{L}\right) * Vol Poche(L)}{[cell]sg \left(\frac{G}{L}\right) * Vol ttt(L)}$$

$$❖ \text{Rendement}(\%) = \frac{Objectif (Giga)}{[cell]sg \left(\frac{G}{L}\right) * Vol ttt(L)}$$

$$❖ \text{Vol ttt} (L) = \frac{Objectif (Giga)}{[cell]sg(G/L) * \text{Rend}\% \text{ pondéré}}$$

❖ Exemple Collecte de CMN

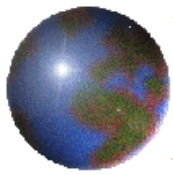
- ❖ Objectif CMN: 5 Giga
- ❖ Concentration Sang 1 G/L
- ❖ Rendement : 70% mais pondéré - 30% = 40%

$$❖ \text{Vol ttt} (L) = \frac{5 (Giga)}{[1](G/L) * 0,4} = 12,5 L$$

Objectif

Valeur patient

Ponderation
Intervalle de confiance



Homogénéiser control qualité

- Devant les différents objectifs
- Reprendre tous les critères des objectifs cellulaires à Les appliquer aux
- Cela nous donne des repères

Objectif Cellulaire

>5 10⁹ CMN totaux

	%	Total en Giga recueilli	Par Kilo en 10 E8	Rendement %
CMN poche	98,5	8,1	1,2	72
Lymphocytes	47,5	3,9	0,6	72
CD 3	50,7	4,5	0,6	55
CNT	100%	8,2	NA	13

NB Vtt:

1,6

DUREE (min)

183

Observation 1

- Cas idéale:
- Lymphopénie relative 0,8G/L
- TT de=1,6 vol sg
- Bon rendement 72%
- Objectif atteint

Objectif Cellulaire

>5 10⁹ CMN totaux

	%	Total en Giga recueilli	Par Kilo en 10 E8	Rendement %
CMN poche	84,0	4,5	0,8	35
Lymphocytes	14,0	0,8	0,1	35
CD 3	5,2	0,3	0,0	39
CNT	100%	5,4	NA	11

NB Vtt:

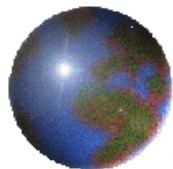
4,2

DUREE (min)

270

Observation 2:

- Echec transduction
- En raison de ly coll bas
- Ly sang 0,1 G/L
- Ttt 15000 L (4,2 MS)
- Rendement faible 35%
- Ly Col 0,3 faible



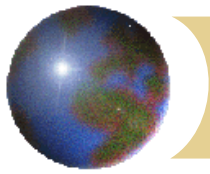
Comment s'adapter

- ✚ Selon procédure de centre, tableau synthétique mis à jour et validé après chaque modification

CART Doc=126 Ver=486 Protocol Utilisation Selon Origine CART Create=02_02_2025_12_25

Produit	yescarta AMM	Técarts AMM	KTE X19 ATU	Alycarte (Yescarta) Ess. Clinique	Kymriah AMM, ATU pour LF	JCAR Fol Ess. Clinique	ABECMA Ess. Clinique
DCI	Axicabtagene ciloleucl	Brexucabtagene Autoleucl	Axicabtagene ciloleucl	Axicabtagene ciloleucl	tisagenlecleucl	Lisocabtagene Maraleucl BMS-986387	idecabtagene vicleucl (ide-cel) BMS-986395
Labo	Gléad/Kite	Gléad/Kite	Gléad/Kite	Gléad/Kite	Novartis	BMS Celgène	BMS Celgène
Indication	DLBCL rechute ou réfractaire adulte après 2 lignes.	Lymphome du manteau adulte rechute / réfractaire 2 ^{ème} ligne	LAL Adulte rechute / réfractaire 2 ^{ème} ligne	DLBCL 1 ^{ère} rechute	DLBCL rechute adulte + LAL enfants jusqu'à 25 ans + LF adulte rechute réfractaire 2 ^{ème} ligne	Lymphome Folliculaire adulte rechute / réfractaire 2 ^{ème} ligne	MNO Adulte
Envoi	Envoi	Envoi	Envoi	Envoi	Congélation UTC	Envoi	Envoi CELLEX
Objectif	5 Giga CMN	5 Giga CMN	5 Giga CMN	5 Giga CMN Vol traité entre 12 et 15 Litres	– CD3 > 1G – TNC (cellules nucléées totale) > 2 Giga – CD3 > 3%	– Si Lymphocytes sang du matin: < 1 G traiter 12L > 1G traiter 7L – Rajouter 150 ml de plasma en début de séance	– Lymphocyte circulant (LC) ≥ 500/μL = 2 VST – LC ≤ 500/μL = 3 VST – Pas de plasma collecté Volume de produit collecté ≥ 50cc
Documents	– document kite connect à remplir – Etiquette	– Feuille verte – Document réception UTC – Document de confirmation – Etiquette	– Document EU réquisition – Formulaire fournis par labo reçu par UTC – UE sérologie formulaire	– Formulaire d'information recherche identification – Fiche sérologie – EU réquisition formulaire	Idem cyta standard	– Fiche leuco recherche clinique – Fiche prélèvement celgène	– Documents étiquettes bilan – Fiche prélèvement Celgène – Fiche formulaire de confirmation d'ATH
Bilan	Bilan standard: NFS + biochimie Immunophénotypage Dosage CD3	0	0	Bilan standard		Tube protocolaire => bilan en locale au CHU	– Planchette d'étiquettes vierges – Boîte blanche
Strip	NON 30 cm de tubulure	NON 30 cm de tubulure	NON 30 cm de tubulure	NON 30 cm de tubulure	Pas de contraintes	Stripok Tubulure de 10 cm Retrait du clamp	
Etiquetage	Double étiquetage: Labo ATH fine	Double étiquetage: Labo ATH fine	Double étiquetage: Labo manuscrite ATH	Double étiquetage: – Manuscrite (réception UTC dans container de transport) – Petite étiquette bridée	Standard cytophèrese	Double étiquetage: ATH CART mini Etiquette labo préimprimé sur le Site	Double étiquetage: Etiquette labo site BMS ATH CART mini
Remarque		0	En ATU doit passer comme yescarta en AMM		Si objectif non atteint, 2 ^{ème} cyta le lendemain	Contact: Nelly Besson	

*Fiche collection Certificat Conformance



Conclusion

- ✚ Les objectifs de collecte sont facilement atteignables
 - ✚ Même en cas de lymphopénie.
 - ✚ On peut compenser par des volumes traité allant jusqu'à 4 Volume sanguin si permis par la procédure du labo CART

- ✚ Meme si l'objectif n'est pas atteint, l'expansion des lymphocytes CD3⁺ permet de compenser et atteindre **l'objectif de production CART**

- ✚ Rare cas non-conformité de type echec de production avec niveau de transduction trop faible dont la cause est directement liée à
 - ✚ lymphopénie profonde +/- mauvais rendement