



HAL
open science

Développement d'outils innovants et sécurisés de thérapie cellulaire et génique basés sur la reprogrammation de lymphocytes T dans un contexte d'immunothérapie anti-tumorale

Elodie Bôle-Richard

► **To cite this version:**

Elodie Bôle-Richard. Développement d'outils innovants et sécurisés de thérapie cellulaire et génique basés sur la reprogrammation de lymphocytes T dans un contexte d'immunothérapie anti-tumorale. Immunologie. Université de Franche-Comté, 2016. Français. NNT : 2016BESA3001 . tel-01508651

HAL Id: tel-01508651

<https://theses.hal.science/tel-01508651>

Submitted on 14 Apr 2017

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITE DE FRANCHE-COMTE
UFR Sciences Médicales et Pharmaceutiques
École Doctorale Environnements-Santé



Thèse présentée et soutenue
En vue de l'obtention du titre de
Docteur de l'Université de Franche-Comté
Spécialité : Sciences de la Vie et de la Santé
Le 24 juin 2016

par

Elodie BÔLE-RICHARD

**DÉVELOPPEMENT D'OUTILS INNOVANTS ET SÉCURISÉS
DE THÉRAPIE CELLULAIRE ET GÉNIQUE BASÉS SUR LA
REPROGRAMMATION DE LYMPHOCYTES T DANS UN
CONTEXTE D'IMMUNOTHÉRAPIE ANTI-TUMORALE**

Sous la direction du Dr Marina DESCHAMPS et du Dr Christophe FERRAND

Composition du Jury :

Dr Els VERHOEYEN, CR2 INSERM UMR1065, Université de Nice	Rapporteur
Pr Danièle BENSOUSSAN, Unité de Thérapie Cellulaire et Tissus, CHU Nancy	Rapporteur
Dr Bruno LIOURE, Unité de greffe et de thérapie cellulaire, CHU Strasbourg	Examineur
Pr Olivier ADOTEVI, INSERM UMR1098, EFS Besançon	Examineur
Dr Christophe FERRAND, INSERM UMR1098, EFS Besançon	Directeur de thèse
Dr Marina DESCHAMPS, INSERM UMR1098, EFS Besançon	Co-encadrante

REMERCIEMENTS

Mes premiers remerciements s'adressent aux membres du jury qui ont accepté de juger ce travail malgré leurs nombreuses obligations : le **Professeur Danièle BENSOUSSAN** et le **Docteur Els VERHOEYEN** en tant que rapporteurs, le **Docteur Bruno LIOURE** en tant qu'examineur et le **Professeur Olivier ADOTEVI**, examinateur qui a également accepté de présider ce jury. Je vous remercie pour l'intérêt que vous avez bien voulu porté à ce travail.

Ce travail de thèse a été réalisé au sein de l'UMR1098 "Interaction Hôte-Greffon-Tumeur et Ingénierie Cellulaire et Génique". Je tiens à remercier les **Professeurs Philippe SAAS, Christophe BORG** et **Olivier ADOTEVI** qui m'ont accueillie au sein de leur équipe.

Merci au **Dr Christophe FERRAND**, mon directeur de thèse, merci pour tes idées et tes conseils tout au long de ces années. Un grand merci au **Dr Marina DESCHAMPS** qui m'a encadrée durant mes années de thèse. Nous avons formé un sacré duo, j'ai apprécié travailler à tes côtés et j'espère que ce n'est que le début. Merci pour la confiance que tu m'as accordée, tes conseils et tes astuces. Même si tu n'as pas pu passer ton HDR, tu es quand même ma directrice de thèse !!

Merci au groupe TRANSFERT et particulièrement à **Jean-Marie CERTOUX** et **Idir IDIRENE**.

Jean-Marie, c'est toi qui m'a tout appris à l'EFS, j'ai beaucoup apprécié échanger avec toi et travailler à tes côtés. Tu connais tout de l'histoire de l'EFS et tu as toujours une anecdote à partager ! Merci aussi pour tes corrections et tes encouragements.

Idir, merci pour tes connaissances de la réglementation qui m'ont bien aidée pendant la rédaction de ce manuscrit.

Je tiens également à remercier les chercheurs de l'unité pour leurs conseils et leurs encouragements : merci au **Professeur Francine GARNACHE-OTTOU**, aux **Docteurs Yann GODET** et **Sylvain PERRUCHE**.

Cette thèse fut l'occasion de rencontrer et d'échanger avec de nombreuses personnes, étudiants, techniciens, ingénieurs, chercheurs, merci à tous et particulièrement à mes supers collègues : **Jean-René** et **Francis** (les dompteurs de souris), **Anne Dup'**, **Pat'**, **Clémentine**.

Clémentine, merci pour ton aide si précieuse surtout lors de la rédaction de mon manuscrit et de la préparation de ma soutenance, sans toi, cette période aurait été encore plus difficile et certainement beaucoup moins sympa... Heureusement que tu étais là !! Merci pour tous ces bons moments et ses fous rires partagés au labo ou en dehors. Tu n'étais pas là le jour J mais comme tu rentres 4^{ème} des championnats du monde, tu es tout excusée !! Allez la France !!

Merci également à **Annick**, ma maman du labo et **Stéphanie**, ma grande sœur du labo ! Si j'en suis là aujourd'hui, c'est avant tout grâce à vous, vous m'avez fait découvrir le laboratoire et le monde de la recherche pendant mon stage de BTS puis de Master 2 pour Annick. Vous m'avez toujours soutenue, encouragée et aidée. Je suis fière d'avoir été votre étudiante et j'espère que l'on gardera encore contact longtemps... Merci Stéphanie pour la relecture finale de mon manuscrit et la correction des fautes d'orthographe. À très bientôt autour d'une bonne pizza !!

Tcheck à **Élise**, mes premières semaines de stage de BTS ont eu lieu en même temps que tes premières semaines de stage de M2, et quelles semaines !! Je pense que je ne pourrai pas les oublier ;-) Au labo ou pour un footing ensoleillé, on a toujours passé de bons moments ! Je suis très contente de garder contact même depuis l'autre côté de la Manche... Merci aussi à **François** pour sa bonne humeur communicative. A la prochaine les copains pour une soirée sushi !!

Enfin, le plus important, merci à ma famille :

À **mes parents** qui ont toujours été là et qui m'ont toujours soutenue et encouragée : ça y est, j'y suis arrivée !!

À **Mathieu**, mon frère qui m'impressionnera toujours !

À **Laura**, ma sœur et son mental d'acier, je suis fière de toi et de ton parcours, je suis convaincue que tu réussiras à obtenir ce que tu veux...

À **ma mamie** et **mon papy**, merci pour tous ces bons moments, je ne doute pas qu'il y en aura encore plein. Je vous admire, vous êtes pour moi un modèle, je suis fière d'être votre petite fille.

À mes filleules **Lisa** et **Perrine**, « ça y est, j'ai fini l'école » !

Merci aussi à mes supers cop' : **Manart** tu m'as choisie comme témoin pour ton mariage, puis comme marraine pour Perrine, c'était magique ! Merci pour ces bons moments passés dans ton Jura avec **Julien** et les enfants ; **Maman** et **Xavier**, vous êtes toujours là pour nous accueillir avec Jordane pour un goûter, un apéro, me changer les idées et penser à autre chose... J'ai une petite pensée pour ces milliers de cailloux que l'on a cassés ensemble pour la construction de votre belle maison et qui ont été redoutables pour me faire changer d'air !!

Et le meilleur pour la fin, merci à toi, **Jordane**, tu m'as soutenue et encouragée durant mes 3 années de thèse, tu as toujours été là même dans les moments difficiles. Merci de t'être occupé de tout pendant la rédaction et la préparation de l'oral. Une nouvelle vie est devant nous, c'est une nouvelle page à écrire pour nous

SOMMAIRE

SOMMAIRE.....	5
LISTES DES FIGURES.....	11
LISTES DES TABLEAUX.....	13
LISTE DES ABREVIATIONS	15
INTRODUCTION.....	17
Chapitre 1 : Développement d'immunothérapies anti-tumorales.....	19
1. Immunosurveillance des cancers.....	19
1.1. Historique.....	19
1.2. Principe de l'immunosurveillance des cancers	20
1.3. L'immunoédition : la théorie des 3E	21
1.4. La réponse T anti-tumorale.....	23
2. L'immunothérapie anti-tumorale	26
2.1. L'immunothérapie passive	27
2.1.1. Les anticorps.....	27
2.1.2. Développement des anticorps monoclonaux en cancérologie	28
2.1.3. Exemple de développement d'un anticorps monoclonal anti-HER2 : le Trastuzumab	30
2.1.4. Inhibiteurs de checkpoints immunologiques	30
2.1.5. Développement des BiTE®.....	33
2.2. L'immunothérapie active	34
2.2.1. L'immunothérapie active non spécifique	34
2.2.2. L'immunothérapie active spécifique	34
Chapitre 2 : Modifications génétiques et reprogrammation des lymphocytes T	37
1. Transfert de gène.....	37
1.1. Les différentes techniques de transfert de gène en thérapie génique.....	37
1.2. Les vecteurs viraux.....	37
1.2.1. Généralités sur les γ -rétrovirus et les lentivirus	38
1.2.2. Production de particules rétrovirales.....	39
1.2.3. Design/conception des vecteurs	41
1.3. Des nouveaux axes de recherche.....	43
1.3.1. Les nucléases à doigt de Zinc.....	43
1.3.2. Techniques TALEN et CRISPR.....	44
2. Développement de stratégies d'immunothérapies adoptives innovantes.....	45
2.1. Le transfert adoptif de lymphocytes T infiltrant la tumeur.....	45
2.2. TCR transgéniques.....	46

2.3.	Ciblage de l'environnement tumoral : reprogrammation du microenvironnement tumoral.....	48
3.	Modifications génétiques des LT par les CAR	50
3.1.	La technologie CAR.....	51
3.1.1.	Structure.....	51
3.1.2.	Activation des CAR et transduction du signal.....	52
3.2.	Production des LT CAR en clinique.....	53
3.3.	Les antigènes ciblés.....	54
3.3.1.	Applications dans les hémopathies	55
3.3.2.	Applications dans les tumeurs solides.....	56
3.3.3.	Les effets secondaires	57
Chapitre 3 : Sécurisation des thérapies cellulaires		59
1.	Développement des stratégies de sécurisation	59
1.1.	L'allogreffe	59
1.1.1.	Définition.....	59
1.1.2.	La GvHD	60
1.2.	Rationnel de la sécurisation des thérapies cellulaires	60
2.	Développement de systèmes suicides	61
2.1.	Des systèmes suicides en cours de développement	61
2.1.1.	Les systèmes utilisant des enzymes	61
2.1.2.	Le système iFas.....	62
2.1.3.	Le système CD20/Rituximab.....	62
2.1.4.	Le système EGFR/Cetuximab.....	63
2.2.	Le système HSV-tk/Ganciclovir	64
2.3.	Le système iCaspase-9/AP1903.....	66
2.3.1.	Principe.....	66
2.3.2.	Utilisation en clinique.....	67
3.	Contrôle spatio-temporel de l'activation des récepteurs chimériques	68
Chapitre 4 : Aspects réglementaires des Médicaments de Thérapie Innovante		72
1.	Les essais cliniques et leurs réglementations	72
1.1.	Différentes phases	72
1.2.	Nouvelles réglementations européennes en vigueur	73
1.2.1.	Qu'est-ce qu'un MTI ?	73
1.2.2.	Mise en place de la réglementation	74
2.	Production de CGM pour les essais cliniques	74
2.1.	Les normes de fabrication et la classification des locaux.....	74
2.2.	Développement clinique de cellules génétiquement modifiées.....	75
3.	Place de l'EFS	76
3.1.	Présentation.....	76

3.2.	L'EFS Bourgogne/Franche-Comté	76
OBJECTIFS DE LA THESE		78
MATERIELS ET METHODES.....		82
1.	Matériels.....	84
1.1.	Les cellules	84
1.1.1.	Les lignées cellulaires d'emballage	84
1.1.2.	Les lignées cellulaires de glioblastome.....	84
1.1.3.	Les lignées cellulaires T	84
1.1.4.	Obtention de lymphocytes T primaires	84
1.1.5.	Isolement des cellules NK.....	85
1.2.	Les vecteurs.....	85
1.3.	Cytométrie en flux.....	85
2.	Techniques de culture cellulaire	86
2.1.	Culture cellulaire	86
2.2.	Établissement d'une lignée d'emballage PG13	87
2.2.1.	Transfection transitoire des GP86.....	87
2.2.2.	Transduction des PG13.....	87
2.3.	Transduction de PBMC.....	88
2.4.	Tests de cytotoxicité par co-culture	88
3.	Techniques de préparation et d'analyse des acides nucléiques	88
3.1.	Électrophorèse sur gel d'agarose	88
3.2.	Extraction d'ADN plasmidique	89
3.2.1.	Miniprep.....	89
3.2.2.	Maxiprep	89
3.3.	Digestion par des endonucléases de restriction	89
3.4.	Transformation des bactéries compétentes	89
3.5.	Extraction des acides nucléiques	89
3.5.1.	Extraction d'ADN	89
3.5.2.	Extraction d'ARN	90
3.6.	Transcription inverse (RT-PCR).....	90
3.7.	PCR qualitative	90
3.8.	Purification des produits de PCR.....	91
3.9.	Étude de la méthylation du promoteur LTR.....	91
4.	Techniques de préparation et d'analyse des protéines	91
4.1.	Dosage de la production de cytokines par ELISA	91
4.2.	Extraction de protéines.....	92
4.3.	Dosage des protéines.....	92

4.4. Western Blotting	92
4.5. Fractionnement sub cellulaire	93
RESULTATS	97
<i>Résultat I</i>	99
Improving the safety of cell therapy products by suicide gene transfer	99
<i>Résultat II</i>	105
Exposure to hypomethylating agent, 5-Azacytidine, may improve iCasp9 suicide gene therapy for treating GvHD in allografts	105
<i>Résultat III</i>	119
Side by CIDE	119
<i>Résultat IV</i>	125
Développement d'une construction de reprogrammation du microenvironnement tumoral	127
Développement d'un CAR dirigé contre l'antigène EGFRvIII	129
DISCUSSIONS PERSPECTIVES	133
Sécurisation des thérapies cellulaires.....	135
Reprogrammation des LT avec un CAR et nouveaux axes de développement	136
Modulation du microenvironnement tumoral et amélioration de la stratégie CAR	138
Association avec les inhibiteurs de checkpoints immunologiques	142
Gestion des effets secondaires.....	142
Vers une utilisation dans un contexte allogénique	143
Conclusion générale	145
BIBLIOGRAPHIE	147
ANNEXES	163
<i>Annexe I</i>	165
New CD20 alternative splice variants: molecular identification and differential expression within hematological B cell malignancies	165
<i>Annexe II</i>	183
Prevention of hepatitis C virus infection by adoptive allogeneic immunotherapy using suicide gene-modified lymphocytes: an in vitro proof-of-concept.....	183
<i>Annexe III</i>	195
Recherche biomédicale : ETUDE CLINIQUE Side by CIDE	195
<i>Annexe IV</i>	199

Ciblage de l'antigène EGFRvIII, exprimé dans les glioblastomes, par une approche d'immunothérapie anti-tumorale, utilisant des lymphocytes T génétiquement modifiés pour exprimer un récepteur antigénique chimérique (CAR).....	199
L'exposition à un agent hypo-méthylant, 5-azacytidine améliore l'induction d'apoptose de lymphocytes T génétiquement modifiés exprimant iCasp9/ Δ CD19 après traitement à l'AP1903.	199
Annexe V.....	205
Hypomethylating agent 5-azacytidine exposure to improve AP1903 treatment for apoptosis induction of iCasp9/ Δ CD19 gene modified T cells	205
Annexe VI.....	209
Liste des communications orales.....	209
Annexe VII.....	211
Développement d'outils innovants et sécurisés de thérapie cellulaire et génique basés sur la reprogrammation de lymphocytes T dans un contexte d'immunothérapie anti-tumorale	211

LISTES DES FIGURES

Figure 1 : Relation entre infiltrat de cellules immunitaires et progression de différents cancers.	20
Figure 2 : La théorie de l'immunoédition selon R. Schreiber (Schreiber et al., 2011).	22
Figure 3 : Mécanismes mis en place par la tumeur pour échapper au contrôle du le système immunitaire.	23
Figure 4 : Les différentes sous-populations de lymphocytes T CD4 et leurs rôles dans le cancer.....	24
Figure 5 : Historique et faits marquants de l'immunothérapie du cancer.	26
Figure 6 : Structure des IgG.....	28
Figure 7 : Humanisation des anticorps thérapeutiques.	28
Figure 8 : Mécanismes d'action indirecte des anticorps monoclonaux.....	29
Figure 9 : Développement d'inhibiteurs de checkpoints immunologiques. D'après Marques-Rodas et al., 2015.	31
Figure 10 : Rôle de CTLA-4 dans l'inhibition des lymphocytes T.	31
Figure 11 : Mécanisme d'action de PD-1, PDL-1, PDL-2.	32
Figure 12 : Les anticorps BiTE® (A) et leur mode d'action (B).	33
Figure 13 : Activation de la transcription par mutagénèse insertionnelle (Trono, 2003).	38
Figure 14 : Structure d'une particule rétrovirale	39
Figure 15 : Production des particules rétrovirales contenant le gène d'intérêt par la lignée d'empaquetage.	40
Figure 16 : Plasmides de production des particules lentivirales pseudotypés VSV-G.	41
Figure 17 : Structure de l'IRES.	42
Figure 18 : Séquences nucléiques et peptidiques des différents 2A utilisés actuellement.....	43
Figure 19 : Stratégie thérapeutique utilisant la nucléase à doigt de Zinc dans le cadre du VIH (Lombardo and Naldini, 2014).	43
Figure 20 : L'édition du génome par le système TALEN (Maeder and Gersbach, 2016).	44
Figure 21 : La technologie CRISPR/Cas9 (Source : biotechn.asia).	45
Figure 22 : Technique d'isolement et d'expansion des TILs.....	46
Figure 23 : Reconnaissance de l'antigène et signaux nécessaires à l'activation des lymphocytes T (Kershaw et al., 2013).....	47
Figure 24 : Technique d'obtention de LT génétiquement modifiés avec un TCR (Restifo et al., 2012).....	48
Figure 25 : Propriétés de l'interleukine-12 sur le système immunitaire.	49
Figure 26 : Effet de l'interleukine-12 produite de façon spécifique et contrôlée (Zhang et al., 2011).	50
Figure 27 : Principe de construction d'un CAR.	51
Figure 28 : Les différentes générations de CAR.	52
Figure 29 : Cascade d'activation en conséquence de la reconnaissance de l'antigène et aboutissant aux fonctions effectrices du LT (Kershaw et al., 2013).....	53
Figure 30 : Production de lymphocytes T génétiquement modifiés par un CAR pour une application clinique (Maus and June, 2016).....	54
Figure 31 : Développement de protocoles cliniques utilisant des lymphocytes T génétiquement modifiés avec CAR ciblant un antigène de tumeur solide (Corrigan-Curay et al., 2014).	56
Figure 32 : Principe général d'un gène suicide.	60

Figure 33 : Modélisation de la protéine humaine EGFR (huEGFR) en comparaison avec la protéine tronquée huEGFRt qui a conservé son domaine de liaison au Cetuximab. D'après Wang et al., 2011.	64
Figure 34 : Le système suicide HSV-tk	65
Figure 35 : Comparaison de la Caspase-9 endogène avec la iCaspase-9.	66
Figure 36 : Rôles de la Caspase-9 endogène et de la iCaspase-9.....	67
Figure 37 : Suivi des patients ayant développés une GvHD et ayant été traités avec l'AP1903 dans l'essai CASPALLO.	68
Figure 38 : La technique « Logic-gated CARs » consiste à dissocier les molécules de co-stimulation (Klebanoff et al., 2016)	69
Figure 39 : La stratégie iCAR.	69
Figure 40 : Contrôle de l'activation des CAR par un système inductible : ON-switch CAR (Wu et al., 2015).	70
Figure 41 : Les CAR peuvent être des récepteurs « masqués » ce qui rend la reconnaissance de l'antigène impossible.....	70
Figure 42 : Les différentes étapes du développement d'un médicament.	72
Figure 43 : Différents systèmes permettant la production de cellules génétiquement modifiées en système clos.	76
Figure 44 : Développements de MTI menés à l'EFS Bourgogne/Franche-Comté.	77
Figure 45 : Cartes de restriction des vecteurs utilisés.	85
Figure 46 : Principe du fractionnement cellulaire.	95
Figure 47 : Construction rétrovirale pSFG iCaspase9-2A-ΔCD19.....	121
Figure 48 : Étapes allant de la recherche à la soumission et l'acceptation du protocole Side by Side à l'ANSM.....	123
Figure 49 : Vecteur rétroviral pSFG-iCasp9.2A.ΔCD34 / hIL-12.NFAT.	127
Figure 50 : Expression du transgène ΔCD34 suite à la transduction avec le vecteur rétroviral pSFG-iCasp9.2A.ΔCD34/hIL-12.NFAT.....	127
Figure 51 : Production d'IL-12 par les lymphocytes génétiquement modifiés.	128
Figure 52 : Bioactivité de l'IL-12 sécrétée par les CGM.....	128
Figure 53 : Vecteur rétroviral pSFG-CAR-EGFRvIII3 : LTR-MR1scFv-CD28-4.1BB-CD3ζ-IRES-iCasp9-2A-ΔCD19-LTR.	129
Figure 54 : Expression du CAR EGFRvIII dans la lignée d'emballage PG13.	130
Figure 55 : Expression membranaire du CAR EGFRvIII et reconnaissance du peptide cible par les lymphocytes T génétiquement modifiés.	131
Figure 56 : Reconnaissance des cellules cibles U87 EGFRvIII par les lymphocytes T CAR EGFRvIII.	131
Figure 57 : Modèle murin dans 3 souches de souris disponibles : Nude, NOG et NSG.	132
Figure 58 : Les différents sous populations de LT mémoires et leurs capacités (Gattinoni and Restifo, 2013). ...	138
Figure 59 : Développement des stratégies de CAR armés permettant une meilleure efficacité et une meilleure persistance des LT CAR.....	140
Figure 60 : Structure d'un CAR universel.....	141
Figure 61 : Structure des TanCAR (A) et reconnaissance de la cible tumorale (B).....	143
Figure 62 : Stratégies permettant l'amélioration des immunothérapies utilisant des CAR.....	145

LISTES DES TABLEAUX

Tableau I : Techniques de transfert de gène en thérapie génique	37
Tableau II : Immunothérapies utilisant des CAR CD19 dans le traitement de la LAL	55
Tableau III : Caractéristiques des lignées cellulaires d’empaquetage	84
Tableau IV : Listes des anticorps utilisés	86
Tableau V : Liste des anticorps primaires et secondaires utilisés	93
Tableau VI : Tableau comparatif des études TKO-I et Side by CIDE réalisées par notre équipe	122

LISTE DES ABREVIATIONS

A

ADCC : Antibody-Dependent Cell-mediated Cytotoxicity

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

ADNg : Acide DésoxyriboNucléique génomique

Allo-CSH : allogreffe de Cellules Souches Hématopoïétiques

ANSM : Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de santé

ARN : Acide RiboNucléique

B

BiTE : Bispecific T-cell Engager

BPF : Bonnes Pratiques de Fabrication

C

CAR : Chimeric Antigen Receptor ou Récepteur Chimérique à l'Antigène

CD : Cluster of Differentiation

CDC : Complement-Dependent Cytotoxicity

CDR : Complementarity Determining Region

CGM : Cellules Génétiquement Modifiées

CID : Chemical Inducer of Dimerization

CIFRE : Conventions Industrielles de Formation par la REcherche

CMH I, II : Complexe Majeur d'Histocompatibilité de classe I, II

CPA : Cellule Présentatrice d'Antigènes

CPP : Comité de Protection des Personnes

CRISPR : Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat

CRS : Cytokine Release Syndrome

CTLA-4 : Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated protein-4

D

dCK : désoxyCytidine Kinase

E

EFS : Établissement Français du Sang

EFS B/FC : Établissement Français du Sang Bourgogne/Franche-Comté

EMA : European Medicines Agency ou Agence Européenne du Médicament

F

FDA : Food and Drug Administration

G

GCV : Ganciclovir

GMP : Good Manufacturing Process

GvHD : Graft *versus* Host Disease ou maladie du greffon contre l'hôte

GvL : Graft *versus* Leukemia

GvT : Graft *versus* Tumor

H

HSCT : Hematopoietic stem cell transplantation

HSV-tk : Thymidine kinase du virus Herpès Simplex

I

ICOSL : Inducible T-cell CO-Stimulator Ligand

IFN γ : Interféron γ

IgG : Immunoglobuline de type G

IL : interleukine

IRES : Internal Ribosome Entry Site

L

LAL : Leucémie Aigüe Lymphoblastique

LB : Lymphocyte B

LLC : Leucémie Lymphoïde Chronique

LNH : Lymphome Non Hodgkinien

LT : Lymphocyte T

LTh : Lymphocyte T helper

LTreg : Lymphocyte T régulateur

M

MDSC : Cellules myéloïdes suppressives

MLV : Murine Leukemia Virus

MPSV : Myeloproliferative Sarcoma Virus

MSCV : Mouse Stem Cell Virus

MTI : Médicament de Thérapie Innovante

MTI-PP : Médicament de Thérapie Innovante Préparé Ponctuellement

N

NFAT : Nuclear Factor of Activated T-cells

NK : Natural Killer

P

PD-1 : Programmed cell Death 1

PDL-1 : Programmed Death Ligand 1

T

TAA : Tumor Associated Antigen

TALEN : Transcription Activator-Like Effector Nucleases

TCR : T-cell Receptor

TIL : Tumor Infiltrating Lymphocyte

TLS : Tumor Lysis Syndrom

TNF α : Tumor Necrosis Factor

INTRODUCTION

Chapitre 1 : Développement d'immunothérapies anti-tumorales

1. Immunosurveillance des cancers

La réponse immunitaire est l'ensemble des mécanismes de défense de l'organisme permettant de dissocier le soi et le non-soi. Les cellules et les médiateurs de l'immunité coopèrent afin d'assurer à l'organisme une protection continue contre les agressions tout en maintenant une certaine tolérance vis-à-vis du soi. Le système immunitaire est divisé en 2 parties : l'immunité innée et l'immunité adaptative. Mise en jeu très rapidement (dans les minutes et les heures qui suivent une infection), l'immunité innée est la première ligne de défense de l'organisme. Elle fait intervenir différents facteurs solubles tels que le complément, les cytokines et chimiokines, des protéines ainsi que des cellules comme les granulocytes, macrophages, cellules dendritiques et cellules Natural Killer (NK). La réponse immunitaire adaptative est plus tardive mais aussi plus spécifique. Les médiateurs essentiels de l'immunité adaptative sont les lymphocytes T (LT) et les lymphocytes B (LB).

1.1. Historique

L'histoire de l'immunosurveillance commence au XIX^{ème} siècle grâce à Paul Ehrlich et William Coley qui observent des régressions tumorales chez des patients qui développaient un épisode infectieux. Dans les années 1960, Burnet et Thomas vont confirmer ces observations chez la souris et émettent l'hypothèse que les lymphocytes T joueraient un rôle essentiel dans la reconnaissance et l'élimination des cellules tumorales en démontrant l'existence d'antigènes tumoraux (Burnet, 1957).

Cette théorie a été validée par de nombreuses preuves expérimentales (modèles murins KO) et cliniques telles que la corrélation entre immunodépression et incidence des cancers. De plus, la corrélation entre infiltrat T et devenir des patients atteints de cancer a été largement étudiée dans différents types de cancers (**Figure 1**). Un fort infiltrat lymphocytaire est associé à de bons résultats cliniques pour de nombreux types tumoraux (mélanome, sein, vessie, ovaire...) (Fridman et al., 2012).

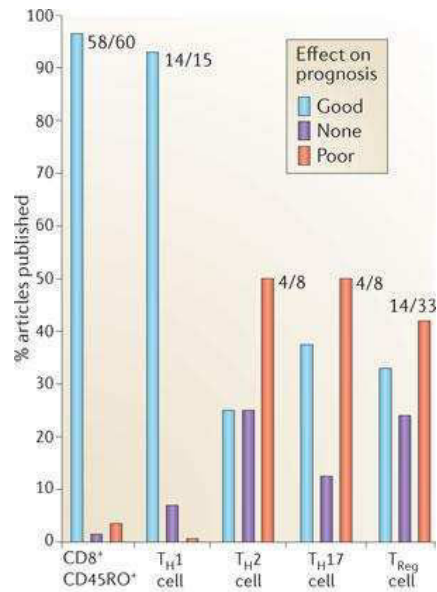


Figure 1 : Relation entre infiltrat de cellules immunitaires et progression de différents cancers.

Cette analyse, effectuée sur 124 articles publiés, étudie l'impact des différentes sous-populations de lymphocytes T (cytotoxiques, helper, mémoires, régulateurs) sur le pronostic de patients atteints de cancer (20 types différents de cancer ont été analysés). «Good» signifie que le type de cellule est associé à un bon pronostic, «None» signifie qu'il n'y avait pas de corrélation et «Poor» signifie que les cellules sont associées à un mauvais pronostic (Fridman et al., 2012).

1.2. Principe de l'immunosurveillance des cancers

Le système immunitaire adaptatif est capable de reconnaître les tumeurs comme étrangères au soi. En effet, les tumeurs expriment des antigènes, qui peuvent être reconnus par le système immunitaire comme des antigènes étrangers. Ce sont les travaux de Thierry Boon qui ont permis d'avoir la certitude de l'existence d'antigènes tumoraux chez l'homme en 1991 (van der Bruggen et al., 1991). Ces antigènes associés aux tumeurs (TAA) peuvent être de différents types :

- Les antigènes mutés sont présents uniquement sur les cellules tumorales. Les analyses du transcriptome ont permis d'identifier de nombreux antigènes spécifiques des cellules tumorales issus de mutagenèse. L'inconvénient principal de ces antigènes est qu'ils sont spécifiques pour chaque tumeur et qu'ils nécessitent du temps pour leur identification. Le premier antigène muté identifié est l'antigène MAGE-1 dans le mélanome (van der Bruggen et al., 1991).

- Les antigènes surexprimés, tels que hTERT (Vonderheide, 2002), sont des antigènes non exprimés ou très faiblement sur les cellules saines et dont l'expression est fortement augmentée sur les cellules tumorales. Dans cette catégorie, on trouve l'antigène HER-2 qui est couramment ciblé en cancérologie à l'aide de l'anticorps monoclonal Trastuzumab notamment dans le cancer du sein.

- Les antigènes de différenciation sont des antigènes associés à la différenciation des cellules en un tissu particulier. Le premier antigène mélanocytaire identifié est Melan-A/MART-1, exprimé par plus de 90% des mélanomes (Coulie et al., 1994).

- Les antigènes « cancer testis » sont normalement exprimés par les cellules germinales testiculaires ou trophoblastes placentaires.
- Les antigènes viro-induits sont la conséquence d'une infection virale des cellules. C'est le cas des cancers induits par EBV ou HPV.

Des LT spécifiques de ces antigènes tumoraux ont été identifiés notamment parmi les lymphocytes T infiltrant la tumeur (TIL, Tumor-Infiltrating Lymphocytes), démontrant donc une reconnaissance des cellules tumorales par le système immunitaire. Lors de cette reconnaissance, le LT est capable de lyser la cellule tumorale grâce, entre autres, à la sécrétion de perforines et granzymes pour induire l'apoptose. En effet, les perforines créent des pores dans la membrane de la cellule cible afin de permettre aux granzymes de pénétrer dans la cellule et d'activer l'apoptose en amont des caspases. Les LT peuvent également induire l'apoptose grâce aux ligands Fas/TRAIL par la « voie des récepteurs de mort ».

Le concept d'immunosurveillance est intégré dans le concept général de la surveillance des cancers par le système immunitaire : l'immunoédition ou théorie des 3E (Dunn et al., 2004).

1.3. L'immunoédition : la théorie des 3E

L'immunoédition résulte de la pression de sélection exercée par le système immunitaire lors de la surveillance des tumeurs qui va modifier le phénotype tumoral pour sélectionner et favoriser les variants tumoraux résistants. Ce phénomène dynamique comprend 3 phases : Elimination, Equilibre, Echappement (**Figure 2**) (Schreiber et al., 2011).

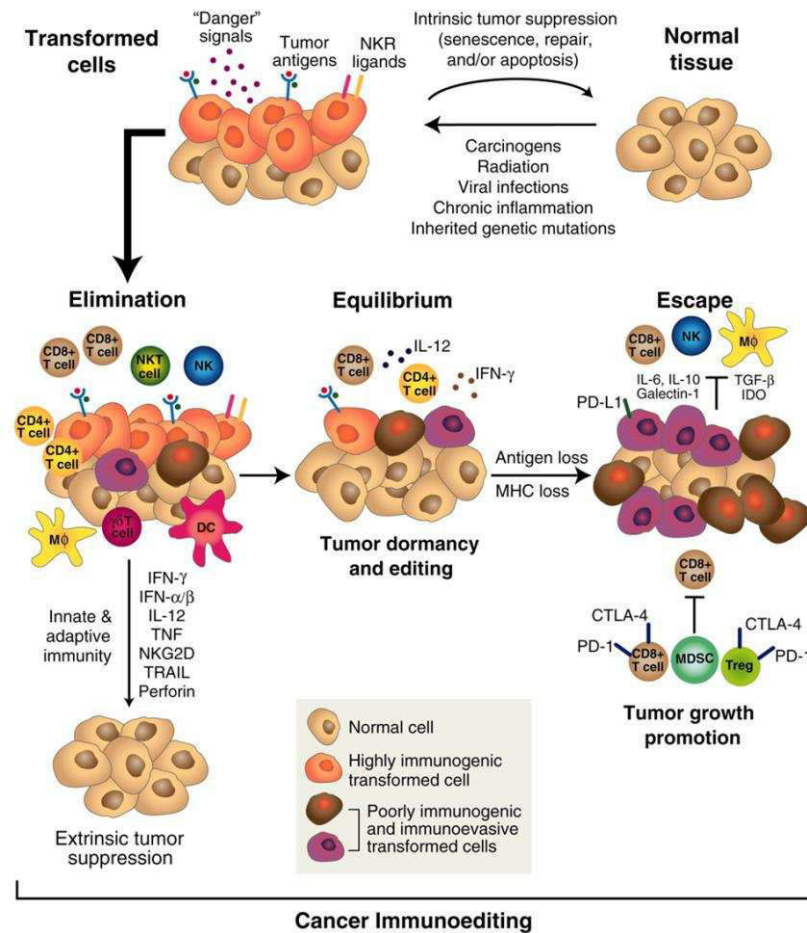


Figure 2 : La théorie de l'immunoédition selon R. Schreiber (Schreiber et al., 2011).

La phase d'élimination est la conséquence de l'immunosurveillance des cancers, elle consiste en la surveillance et l'élimination des cellules considérées comme étrangères au soi par le système immunitaire.

La phase d'équilibre est une phase de persistance des cellules cancéreuses due à une élimination incomplète des cellules par le système immunitaire.

Enfin, la phase d'échappement correspond à la progression du cancer qui dépasse le système immunitaire. Les cellules cancéreuses sont capables de développer différentes stratégies pour échapper au système immunitaire et ainsi, favoriser leur survie et la progression de la tumeur (Figure 3). La mise en place d'un environnement immunosuppresseur accompagne fréquemment l'échappement tumoral : l'expression de molécules inhibitrices de la réponse anti-tumorale ainsi que la sécrétion de cytokines immunosuppressives par exemple, contribuent à favoriser le développement tumoral. L'environnement immunosuppresseur créé par exemple par l'IL-10 joue un rôle antagoniste sur plusieurs fonctions des cellules dendritiques, cellules présentatrices de l'antigène majeures dans l'initiation de la réponse immunitaire (Pinzon-Charry et al., 2005). En effet, l'IL-10 diminue la différenciation des monocytes en cellules dendritiques, l'expression des molécules de co-stimulation et la stimulation des

LT favorisant ainsi leur anergie (Fujii et al., 2001). L'expression de la Galectine-1 est corrélée à l'agressivité des tumeurs et la formation de métastases. Il a été démontré qu'elle jouait un rôle négatif dans la modulation de la prolifération et la survie des LT (Rubinstein et al., 2004). Cet environnement immunosuppresseur peut également être induit par des populations régulatrices comme les lymphocytes T régulateurs (Treg) ou les cellules myéloïdes suppressives (MDSC). Les cellules tumorales peuvent diminuer l'expression du Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH) et des molécules de co-stimulation ce qui permet de moduler l'apprêtement et la présentation des peptides empêchant l'activation des LT. Enfin, l'augmentation de l'expression de ligands pro-apoptotiques tels que B7-H1 ou FasL, est une stratégie permettant l'induction de l'apoptose des LT (Vyas et al., 2014).

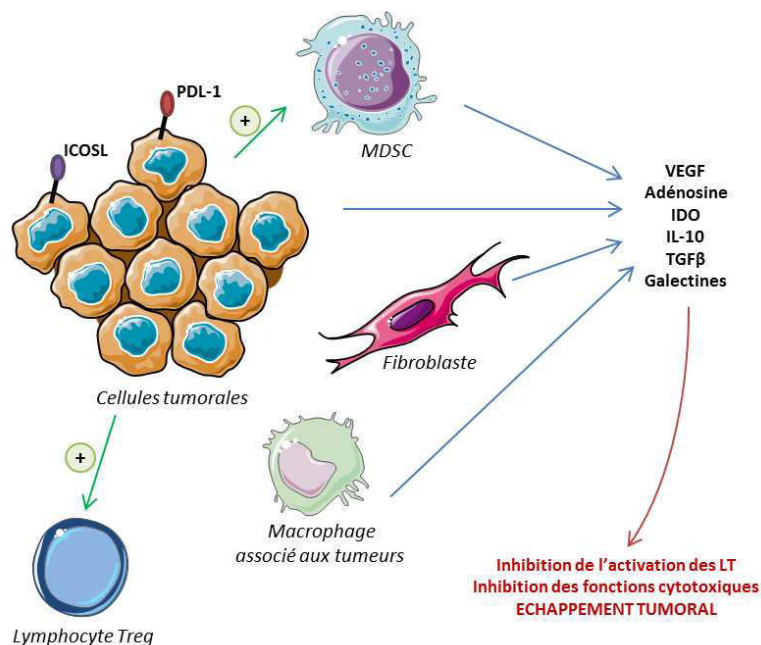


Figure 3 : Mécanismes mis en place par la tumeur pour échapper au contrôle du le système immunitaire.

1.4. La réponse T anti-tumorale

Les lymphocytes T jouent un rôle essentiel dans l'immunité à médiation cellulaire. Les LT CD4, auxiliaires ou helper (Th), ont longtemps été considérés comme des acteurs secondaires de l'immunité par rapport aux lymphocytes T CD8 cytotoxiques. Cependant, il est désormais admis que les LT CD4 jouent un rôle dans la mise en place de la réponse immunitaire adaptative. En effet, ils sont capables de réguler l'activation, la prolifération et la différenciation de nombreuses populations cellulaires telles que les lymphocytes T CD8, les LB et les macrophages (Zhu et al., 2010).

Les LT CD8 cytotoxiques sont des composants essentiels de la réponse immunitaire adaptative, générant à la fois les cellules effectrices et des lymphocytes mémoires à longue durée de vie permettant une réponse secondaire rapide (Kaech and Cui, 2012). Les LT CD8 reconnaissent des peptides présentés par le CMH de classe I exprimé à la surface de toutes les cellules nucléées. Suite à

cette reconnaissance, les LT CD8 naïfs prolifèrent rapidement, avec une phase d'expansion clonale, et génèrent des lymphocytes effecteurs. Les LT CD8 effecteurs sont directement cytotoxiques grâce à la sécrétion de granzymes et perforines mais aussi à l'expression de ligands des récepteurs de mort ce qui va permettre le déclenchement de l'apoptose des cellules cibles. Durant la phase de contraction qui suit, la plupart des LT CD8 meurent par apoptose, tandis qu'une petite sous-population de LT CD8 spécifiques d'antigènes se développe en une population de lymphocytes mémoires à longue durée de vie (Williams and Bevan, 2007).

Les LT CD4 helper reconnaissent des antigènes présentés sous forme de peptides de 12 à 20 acides aminés, présentés par le CMH de type II exprimé à la surface des Cellules Présentatrices d'Antigènes (CPA). Ils peuvent également reconnaître les peptides présentés par le CMH II des cellules tumorales et produire des cytokines qui vont gêner la croissance tumorale ou induire la mort cellulaire (Kobayashi et al., 2006a; Kobayashi et al., 2004; Kobayashi et al., 2006b). L'action des CD4 a lieu *via* la sécrétion de cytokines et l'expression de CD40L. Après la rencontre avec l'antigène, les T CD4 naïfs peuvent se différencier en plusieurs sous-populations aux fonctions diverses (**Figure 4**).

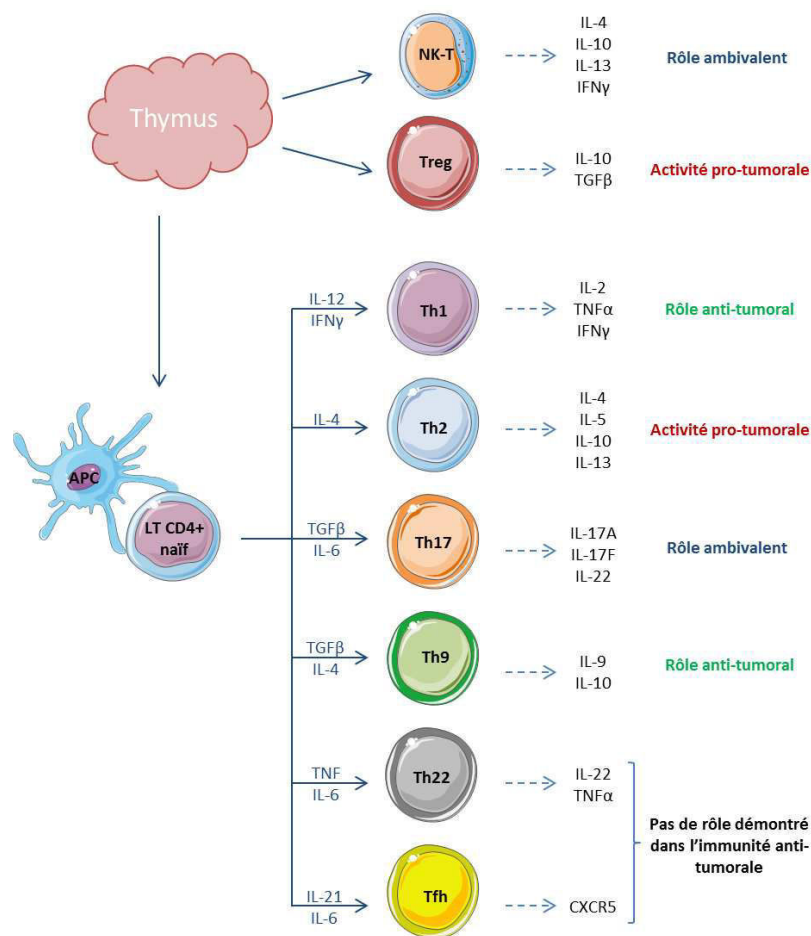


Figure 4 : Les différentes sous-populations de lymphocytes T CD4 et leurs rôles dans le cancer. Ces populations se différencient à partir des T CD4 naïfs, suite à la rencontre avec l'antigène et à la composition du microenvironnement. Les cytokines caractéristiques des différentes sous populations sont également indiquées.

Ces populations ont été identifiées sur la base des cytokines qu'elles sécrètent mais aussi l'expression de récepteurs membranaires et de facteurs de transcription spécifiques. Le rôle des CD4 dans la réponse anti-tumorale dépend essentiellement de leur polarisation. Les sous populations Th1, Th2 et Th17 sont les populations de CD4 helper les plus connues. La différenciation Th1 et Th2 est contrôlée par un équilibre entre l'INF γ qui favorise les Th1, et l'IL-4 qui induit plutôt les Th2.

La sous population **Th1** sécrète principalement de l'IL-2, IFN γ et TNF α . C'est une population qui intervient dans la réponse immunitaire anti-tumorale car elle est capable de mobiliser les acteurs de la réponse anti-tumorale tels que les LT CD8 ou les NK (Glimcher and Murphy, 2000). Les lymphocytes Th1 permettent la génération et la maturation des lymphocytes T CD8 cytotoxiques anti-tumoraux. La présence de ces cellules est un facteur de bon pronostic dans plusieurs cancers (Fridman et al., 2012).

Les lymphocytes **Th2** sont caractérisés par la sécrétion d'IL-4, IL-5 et IL-13. Ils expriment le récepteur CCR4 et le facteur de transcription GATA-3. Les Th2 jouent un rôle dans l'immunité humorale et sont impliqués dans l'activation des LB et l'induction de la sécrétion d'immunoglobulines. Ils interviennent dans les réponses allergiques (Steinke and Borish, 2001). Les Th2 jouent un rôle dans le contrôle et la régulation de la réponse immunitaire, permettant ainsi la prévention des maladies auto-immunes. En contrôlant la réponse immunitaire, ils ont plutôt une activité pro-tumorale bien que certaines études leur attribuent des effets bénéfiques, notamment *via* des interactions avec les éosinophiles (Ellyard et al., 2007).

Les lymphocytes **Th17** jouent, quant à eux, un rôle dans l'immunité antibactérienne et antifongique (Aggarwal et al., 2003). Ils expriment le facteur de transcription ROR γ t et le récepteur CCR6. Selon le type de cancer, ils sont de bon ou mauvais pronostic. Les Th17 peuvent avoir une activité anti-tumorale : il a été montré que, dans la tumeur, ils sont capables de sécréter des cytokines effectrices (Almeida et al., 2007; Precopio et al., 2007). De plus, leur présence au sein de la tumeur est positivement corrélée à la présence d'autres cellules effectrices telles que les LT CD8 et les NK, et est négativement corrélée à la présence de lymphocytes T régulateurs (Kryczek et al., 2009). Cependant, un rôle pro-tumoral peut également leur être attribué. En effet, l'IL-17 sécrétée est capable d'induire la vascularisation de la tumeur et donc de promouvoir la croissance tumorale (Wilke et al., 2011).

Il existe également une sous-population de lymphocytes T régulateurs (**Treg**). Ces lymphocytes représentent 5 à 6% des lymphocytes T et sont issus du thymus. Il existe toutefois une population de Tregs induits par différenciation de LT naïfs en réponse à une stimulation et en présence de TGF- β (Chen et al., 2003; Li et al., 2007). Les Treg expriment fortement le CD25 et le facteur de transcription Foxp3. Ils agissent pour contrôler les réponses immunitaires dans le but de prévenir les réponses auto-

immunes. Ainsi, en créant un environnement immunosuppresseur conduisant à l'anergie des cellules effectrices, ils ont plutôt un rôle pro-tumoral (Kennedy and Celis, 2008).

2. L'immunothérapie anti-tumorale

L'immunothérapie anti-tumorale est une stratégie thérapeutique qui s'appuie sur le principe d'immunosurveillance des cancers : le système immunitaire étant naturellement capable de reconnaître les cellules cancéreuses et de les détruire, l'immunothérapie consiste à mobiliser artificiellement les cellules immunitaires pour qu'elles reconnaissent et éliminent les cellules malignes. Grâce aux différents succès cliniques survenus, l'immunothérapie a été considérée, en 2013, comme la percée majeure en terme de traitement contre le cancer (Couzin-Frankel, 2013). En effet, l'identification de nombreux TAA, les progrès des techniques et la meilleure compréhension du système immunitaire, ont permis le développement d'un nombre croissant d'essais d'immunothérapie (Figure 5). Le succès de ces immunothérapies repose largement sur l'identification d'antigènes tumoraux. En 2014, 403 peptides antigéniques dérivés de tumeur ont été recensés (Peptide database, www.cancerimmunity.org).

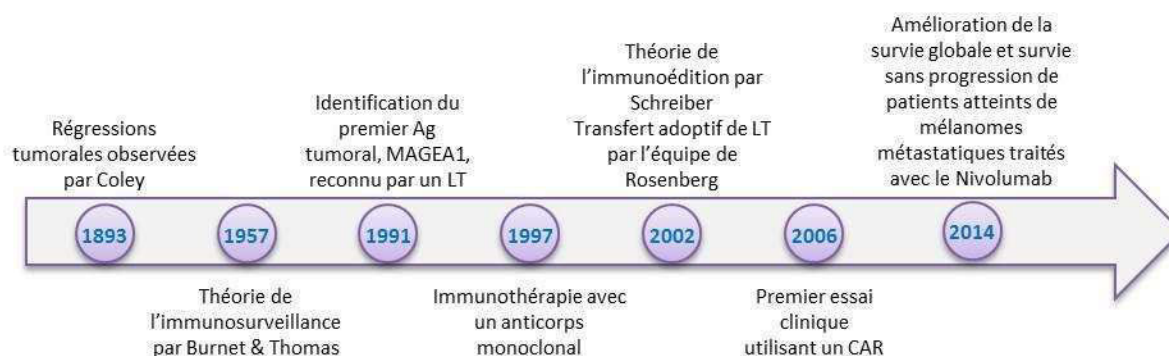


Figure 5 : Historique et faits marquants de l'immunothérapie du cancer.

L'identification du premier antigène de tumeur au début des années 1990 a été un moteur pour le développement de l'immunothérapie anti-cancer. En 1997, le Rituximab (anti-CD20) fut le premier anticorps monoclonal anti-cancéreux approuvé par la FDA (Food and Drug Administration) pour une utilisation en clinique dans le traitement des lymphomes non-hodgkiniens. Depuis les années 2000, les essais d'immunothérapie se multiplient en utilisant des approches variées.

L'équipe de Rosenberg est une équipe pionnière dans le développement d'immunothérapies anti-cancer. En effet, dès 1984, cette équipe a obtenu des régressions de métastases (en nombre et en taille) en injectant des LT activés dans différents modèles murins. Cet effet a pu être potentialisé par l'injection d'IL-2 (Rosenberg et al., 1985). Ces résultats encourageants, observés chez la souris, ont engendré de nombreuses études chez l'homme qui ont montré la possibilité d'amplifier des LT *ex-vivo* notamment à partir de biopsies (TIL).

Il existe aujourd'hui différents types d'immunothérapie : l'immunothérapie passive à base d'anticorps monoclonaux, l'immunothérapie active utilisant des cytokines telles que l'IFN α , l'IL-2 ou encore le TNF et l'immunothérapie adoptive qui utilise les effecteurs de la réponse immunitaire comme les lymphocytes T. Cette dernière sera traitée au cours du chapitre 2. Depuis une vingtaine d'années, de nouvelles thérapies cellulaires contre le cancer basées sur la manipulation *ex vivo* puis la ré-infusion des cellules immunitaires autologues ou allogéniques ont été largement testées en clinique. Ces différentes approches d'immunothérapie ont montré un grand potentiel pour le traitement des cancers, notamment des cancers résistants aux thérapies conventionnelles (chirurgie, radiothérapie, chimiothérapie).

2.1. L'immunothérapie passive

2.1.1. Les anticorps

L'immunothérapie passive consiste à injecter au patient des anticorps monoclonaux (mAb) spécifiques. Les mAb sont des anticorps qui reconnaissent tous le même épitope car ils sont issus d'un même plasmocyte. L'utilisation des anticorps pour cibler les cellules cancéreuses a été proposée, pour la première fois, par Paul Ehrlich au début du XX^{ème} siècle.

Les anticorps jouent un rôle important dans le système immunitaire pour la reconnaissance et l'élimination des antigènes étrangers. Il existe 5 classes d'anticorps en fonction de leur chaîne lourde (IgG, IgM, IgA, IgD, IgE). Ces sont les IgG qui sont le plus couramment utilisées pour le développement d'immunothérapies. Au niveau structural, les anticorps sont composés de 2 domaines de liaison à l'antigène (Fab) liés grâce à une région flexible (hinge) et une région constante (Fc) (**Figure 6**). Le domaine constant contribue au recrutement du système immunitaire. En effet, il est capable d'initier la cytotoxicité dépendante du complément (CDC), et peut se lier aux récepteurs Fc γ exprimés par les effecteurs de l'immunité tels que les cellules NK, les neutrophiles, les phagocytes ou les cellules dendritiques. Le domaine variable est composé de 3 régions hypervariables (CDR) et confère à l'anticorps sa spécificité antigénique (Weiner et al., 2010).

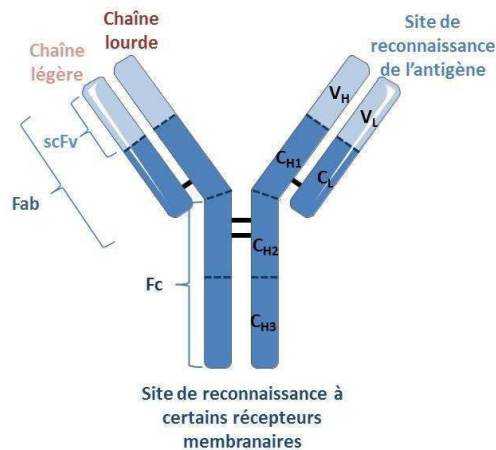


Figure 6 : **Structure des IgG.**

Une IgG est composée de 2 chaînes lourdes et 2 chaînes légères. Chaque chaîne légère est composée d'un domaine constant (C_L) et d'un domaine variable (V_L) alors que les chaînes lourdes sont composées de 3 domaines constants (C_{H1} , C_{H2} , C_{H3}) et d'un domaine variable (V_H). Les chaînes lourdes et légères sont liées entre elles par des ponts disulfures.

2.1.2. Développement des anticorps monoclonaux en cancérologie

C'est le développement des hybridomes murins par Köhler et Milstein qui a permis l'émergence des anticorps monoclonaux thérapeutiques (Kohler and Milstein, 1975). Les anticorps monoclonaux sont alors rapidement devenus de véritables outils de diagnostic. Cependant, leurs applications cliniques ont été limitées par leur origine murine. En effet, l'utilisation des anticorps murins chez l'homme se trouve limitée par des problèmes d'immunogénicité et de faibles capacités à activer le système immunitaire suite à la reconnaissance de la cible. Le développement des souris humanisées et les avancées technologiques sur les hybridomes et le phage display ont permis de limiter ces phénomènes d'immunogénicité en minimisant la proportion de séquences murines dans la composition des anticorps (Figure 7).

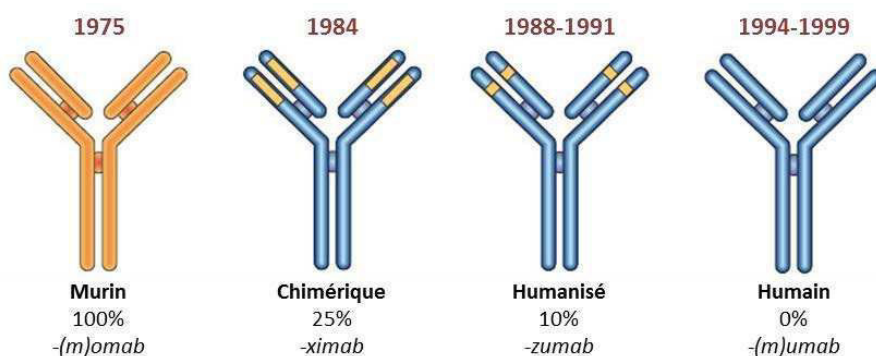


Figure 7 : **Humanisation des anticorps thérapeutiques.**

Au fil du temps, des manipulations génétiques ont permis l'obtention d'anticorps monoclonaux comportant une fraction murine de moins en moins importante limitant les phénomènes d'immunogénicité. D'après Brekke and Sandlie, 2003.

En cancérologie, le but des thérapies utilisant des anticorps est de cibler spécifiquement les cellules tumorales et d'induire, de façon directe ou indirecte, leur élimination. Ces dernières années, cette stratégie connaît un succès grandissant aussi bien dans les tumeurs liquides que dans les tumeurs solides.

Lors de la reconnaissance de l'antigène, les mAb vont entraîner la mort de la cellule selon différents mécanismes (Scott et al., 2012; Weiner et al., 2010). Les anticorps peuvent avoir une toxicité directe en induisant l'apoptose par liaison aux récepteurs de mort ou en bloquant certains récepteurs. Ils peuvent notamment bloquer la dimérisation de récepteurs et ainsi inhiber la transduction des signaux, entraînant alors une réduction de la prolifération et de l'apoptose. Cela peut être le cas des anticorps ciblant les cellules du stroma ou responsables de la vascularisation.

La mort de la cellule peut aussi être induite de façon indirecte par la phagocytose ou par l'activation du complément (**Figure 8**). Ces mécanismes font intervenir les récepteurs Fc qui reconnaissent la portion Fc des anticorps fixés sur une cible. Ces récepteurs Fc sont portés par plusieurs effecteurs tels que les cellules NK, les cellules phagocytaires ou encore les protéines du complément. La reconnaissance de la partie Fc d'un anticorps va permettre d'initier l'ADCC (Antibody-Dependent Cell Cytotoxicity) qui conduit à l'apoptose des cellules cibles suite à la libération de granzymes et perforines par les cellules effectrices. Ces récepteurs Fc sont également capables d'induire la phagocytose qui conduit alors à la dégradation de la cible par les enzymes lysosomales. Enfin, le complément, notamment la protéine C1, est également capable de reconnaître la partie Fc des anticorps et conduire à la formation du complexe d'attaque membranaire aboutissant ainsi à la mort de cellule.

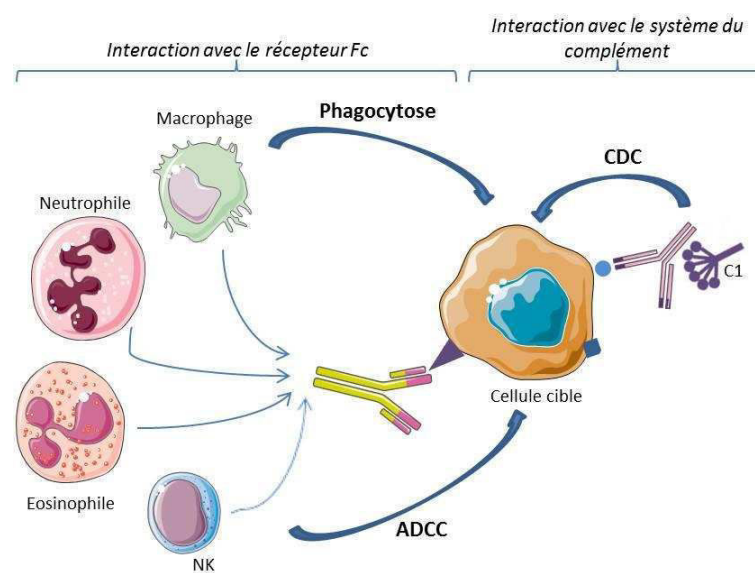


Figure 8 : Mécanismes d'action indirecte des anticorps monoclonaux.

2.1.3. Exemple de développement d'un anticorps monoclonal anti-HER2 : le Trastuzumab

Le Trastuzumab (Herceptin®, Genentec) fut le premier mAb développé en clinique dans le traitement des cancers du sein. C'est un mAb humanisé dirigé contre le domaine extracellulaire de la protéine HER2 (Carter et al., 1992). HER2 est un récepteur à activité tyrosine kinase qui stimule la transduction de signaux impliqués dans le contrôle de la prolifération cellulaire (Baselga and Albanell, 2001). L'équipe de Slamon a observé que 18 à 30% des tumeurs mammaires expriment HER2, cette expression est associée à des tumeurs agressives et est facteur de mauvais pronostic (Slamon et al., 1987). Ainsi, du fait de son expression membranaire, sa surexpression dans les cellules tumorales, ses rôles dans la prolifération et la transformation cellulaire, HER2 est apparu comme une très bonne cible pour le développement d'une thérapie ciblée. Approuvée en 1998 pour une utilisation en clinique, l'utilisation de cet anticorps a amélioré considérablement le devenir des patientes atteintes de cancer du sein métastatique HER2+ (Baselga et al., 2012; Krop et al., 2012). En effet, lorsqu'il est utilisé en combinaison à de la chimiothérapie en 1^{ère} ligne, le trastuzumab est associé à une réduction significative du risque de progression et de décès comparativement à la chimiothérapie seule.

Les mAb peuvent aussi être conjugués à des drogues, c'est le cas, par exemple, du trastuzumab-emtansine (T-DM1). Dans ce cas, l'anti-HER2 est associé à un agent cytotoxique inhibiteur de la polymérisation des microtubules qui empêche la division cellulaire et induit la mort des cellules (Martinez et al., 2015).

2.1.4. Inhibiteurs de checkpoints immunologiques

Comme nous l'avons vu précédemment, la tumeur est capable d'exprimer des molécules induisant l'inhibition des LT et de la réponse immunitaire. Ainsi, depuis quelques années, des inhibiteurs de checkpoints immunologiques ont été développés afin de cibler les modulateurs de l'activation lymphocytaire (**Figure 9**). Ces molécules prometteuses ont obtenu des résultats positifs dans différents cancers en permettant au patient de mettre en place une réponse anti-tumorale efficace.

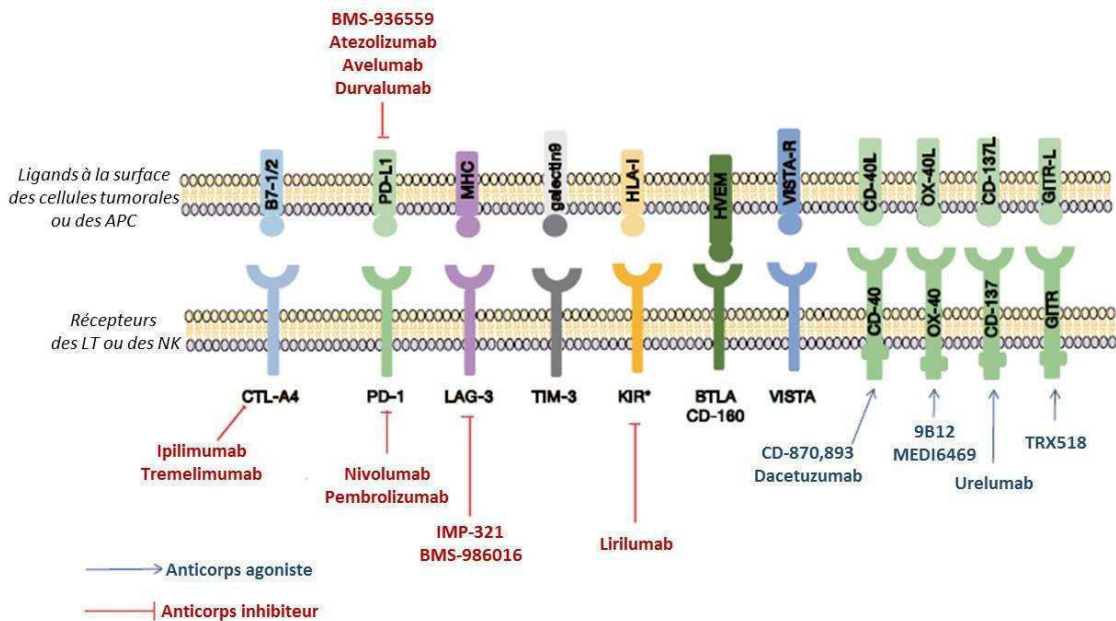


Figure 9 : Développement d'inhibiteurs de checkpoints immunologiques. D'après Marques-Rodas et al., 2015.

À ce jour, seul l'ipilimumab (anti-CTLA-4) et le nivolumab (anti-PD-1) ont été approuvés pour le traitement du mélanome métastatique. Ces traitements ont permis l'obtention de réponse immunitaire anti-tumorale et un allongement de la survie globale (Delyon et al., 2015; Hamid, 2014). L'ipilimumab (anti-CTLA-4) est le premier à avoir été approuvé en mars 2011 dans le mélanome avancé. CTLA-4 est un récepteur antagoniste de CD28 qui reconnaît les mêmes récepteurs B7 et est capable d'inhiber l'activation et les fonctions effectrices des LT. En effet, il empêche le signal 2 de l'activation lymphocytaire (Rudd et al., 2009). L'ipilimumab, en se liant et en bloquant CTLA-4, lève le frein inhibiteur à l'activation des LT (Figure 10).

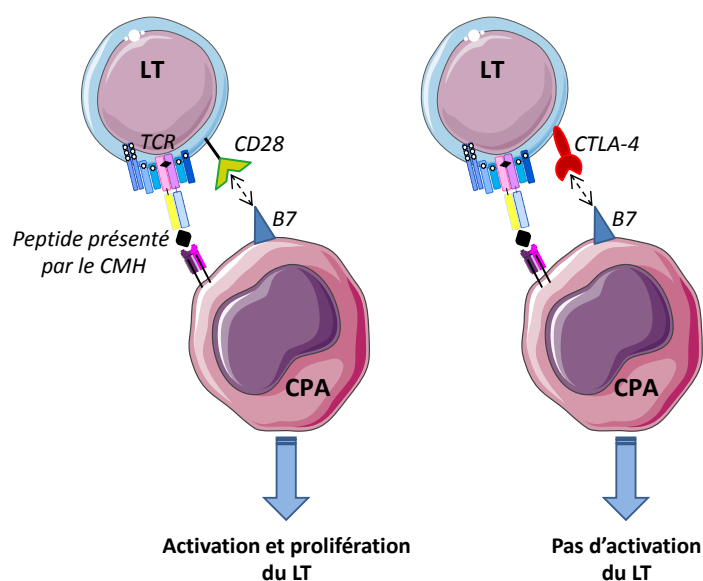


Figure 10 : Rôle de CTLA-4 dans l'inhibition des lymphocytes T.

L'interaction entre CD28 et le récepteur B7 conduit à la stimulation du LT alors que l'interaction CTLA-4 avec ce même récepteur B7 induit l'extinction de la réaction des LT.

La molécule CTLA-4 peut être exprimée par les lymphocytes T régulateurs (Tregs) ce qui leur permet de contrôler la maturation des cellules dendritiques ou d'inhiber les fonctions des cellules effectrices (Wing et al., 2008). L'utilisation de l'ipilimumab dans le traitement des cancers et notamment du mélanome métastatique va permettre de bloquer CTLA-4 et ainsi de lever le frein inhibiteur à l'activation des LT. Le traitement de patients avec cet anticorps a montré un allongement significatif de la durée de vie des patients atteints de mélanomes avancés (Hodi et al., 2010).

Le nivolumab approuvé par la Food and Drug Administration (FDA) en 2014, cible le récepteur PD-1 (*Programmed cell death protéin 1*). PD-1 est une protéine transmembranaire exprimée par les LT activés, les LB, les cellules NK et les monocytes. Ses ligands sont PDL-1 et PDL-2. PDL-1 est faiblement exprimé par les cellules non hématopoïétiques mais est constitutivement exprimé par les cellules immunitaires T, B et les cellules dendritiques. Le profil d'expression de PD-2 est plus restreint, il est exprimé principalement par les cellules dendritiques et les macrophages. La liaison de PD1 avec son ligand entraîne une inhibition de la prolifération des LT (**Figure 11**) (Freeman et al., 2000). Cette interaction joue un rôle important dans la tolérance et la protection des tissus vis-à-vis de l'auto-immunité. Le mélanome est souvent associé à une augmentation de l'expression de PDL-1 (Dong et al., 2002). De plus, l'activation de PD-1 inhibe la prolifération, la survie et les fonctions des LT CD8 (Blank et al., 2004). Cette activation induit également l'apoptose des TILs et la différenciation des T CD4 en Tregs (Marquez-Rodas et al., 2015). Deux essais de phase III comparant les effets de l'ipilimumab *versus* les inhibiteurs de PD-1 dans le mélanome ont montré que le blocage de PD-1 apportait encore plus de bénéfices aux patients que les inhibiteurs de CTLA-4 (Larkin et al., 2015; Robert et al., 2015).

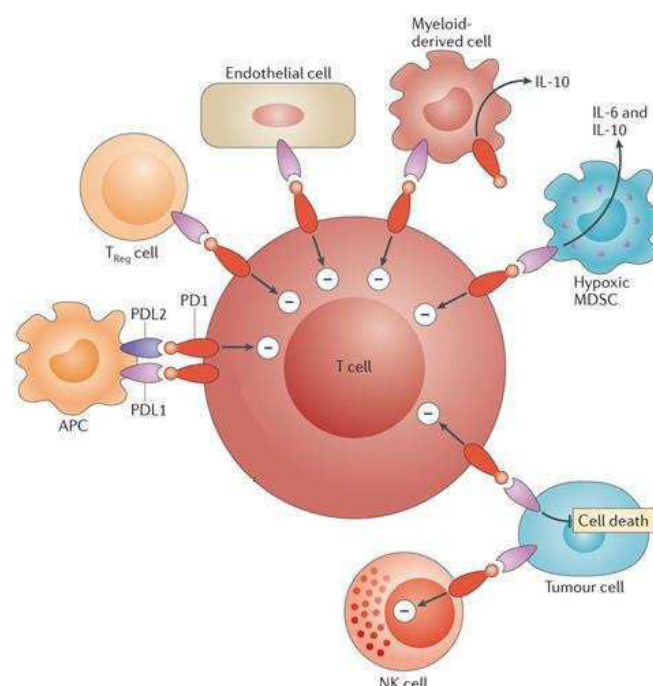


Figure 11 : Mécanisme d'action de PD-1, PDL-1, PDL-2.

La liaison de PD-1 avec son ligand entraîne une inhibition de la prolifération du LT, néfaste à la réponse anti-tumorale. D'après Nguyen and Ohashi, 2015.

Ainsi, la combinaison de ces inhibiteurs (anti-CTLA-4 et anti-PD-1) constitue un nouvel espoir dans le traitement des cancers et notamment du mélanome. Cette combinaison qui permet la stimulation des LT cytotoxiques, le blocage de molécules inhibitrices exprimées par les cellules tumorales, la levée de l'inhibition de l'activité des cellules NK et le blocage de certains facteurs solubles inhibiteurs est en essai de phase III pour le traitement de nombreux cancers et notamment le mélanome (Larkin et al., 2015).

2.1.5. Développement des BiTE®

Les anticorps BiTE® (Bispecific T-cell Engager) sont une approche d'immunothérapie en développement aux résultats prometteurs. Un anticorps BiTE® est constitué d'une seule chaîne polypeptidique comportant 2 domaines : le 1^{er} est le domaine de liaison (scFv) d'un anticorps monoclonal spécifique d'un TAA et le 2nd est le domaine de liaison d'un anticorps monoclonal spécifique de CD3ε (Figure 12) (Stieglmaier et al., 2015). Les 2 scFv sont reliées entre elles par un petit *linker* pour former une molécule d'environ 55kDa. Cette molécule va permettre de rapprocher le LT et la cellule tumorale indépendamment de l'affinité du TCR ou de la présentation du peptide par le CMH. Cela va alors aboutir à la formation d'une synapse immunologique. Par la suite, le LT sera capable de sécréter perforines et granzymes aboutissant à l'apoptose de la cellule cible. Des images vidéo de microscopie ont montré que les anticorps BiTE® étaient capables d'entraîner la lyse des cellules tumorales *via* les LT (Hoffmann et al., 2005).

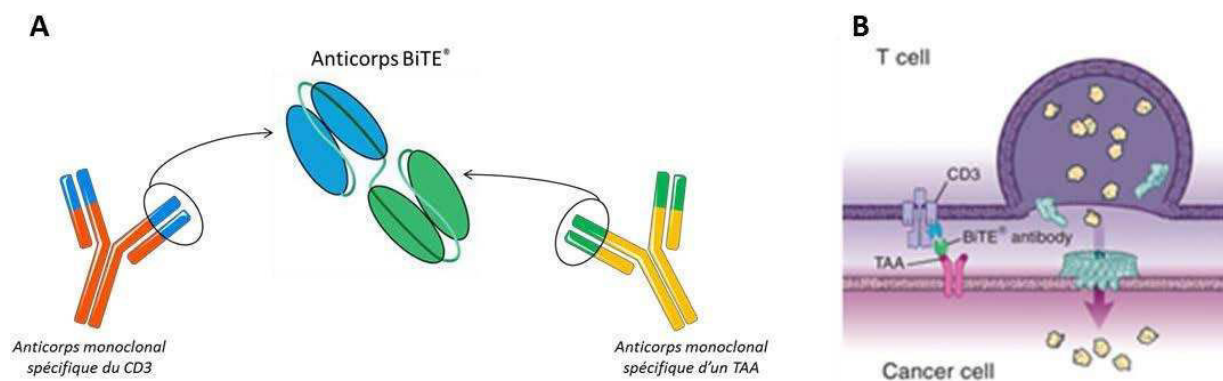


Figure 12 : Les anticorps BiTE® (A) et leur mode d'action (B).

Cette technologie permet de lier entre eux 2 domaines de liaison d'anticorps monoclonaux. D'après Stieglmaier et al., 2015.

Le 1^{er} anticorps BiTE® approuvé en clinique par la FDA aux États unis est le Blinatumomab en 2014. Cet anticorps bi-spécifique, commercialisé par la société Amgen, a été développé pour le traitement des leucémies. En effet, il est spécifique du CD19 et du CD3ε et va donc permettre le contact entre le LT et la cellule leucémique. Différentes études cliniques ont été menées jusqu'à aujourd'hui et ont permis de montrer son efficacité notamment dans les leucémies en rechute ou mal contrôlées par la chimiothérapie (Klinger et al., 2016). Ces études ont également permis de montrer que le

blinatumomab doit être injecté en intraveineux en continu *via* une pompe afin de contrecarrer sa faible demi-vie (2 à 3h) (Goebeler et al., 2016).

2.2. L'immunothérapie active

Le but de l'immunothérapie active est d'induire une réponse immunitaire durable spécifique de l'antigène cible. L'objectif est donc de stimuler le système immunitaire du patient *in vivo* par l'injection d'antigènes ou de cytokines afin de déclencher une réponse immunitaire pour éliminer la tumeur. À partir de biopsies de tumeurs, il est possible d'identifier des antigènes spécifiques (TAA) pour établir des vaccins. Par la suite, la réponse immunitaire peut être améliorée à l'aide de cytokines.

2.2.1. L'immunothérapie active non spécifique

C'est une stimulation du système immunitaire dans sa globalité (inné et adaptatif) afin de favoriser l'élimination des cellules cancéreuses. Elle utilise généralement des cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-2 ou l'IFN γ , qui ont été approuvées pour le traitement des cancers du rein, leucémies, lymphomes et mélanomes. Cependant, à cause de sa non-spécificité et de la nécessité, parfois, de les combiner, de nombreux effets secondaires sont répertoriés (œdèmes pulmonaires, hypotensions, syndromes inflammatoires...) (Kammula et al., 1998; Panelli et al., 2004). Afin de limiter les effets secondaires, l'immunothérapie basée sur l'utilisation de cytokines peut être combinée à la vaccination pour permettre d'optimiser une réponse immunitaire plus spécifique.

2.2.2. L'immunothérapie active spécifique

L'immunothérapie active spécifique est aussi appelée vaccination thérapeutique. Cette vaccination est à dissocier de la vaccination préventive, efficace dans le cas de cancers viro-induits (hépatite B, HPV) afin d'éliminer un agent pathogène responsable de la transformation maligne (Mellman et al., 2011).

L'objectif de la vaccination thérapeutique est de stimuler le système immunitaire d'un patient afin d'accroître la réponse anti-tumorale et donc l'élimination des cellules cancéreuses. En effet il existe chez les patients des LT CD4 et CD8 spécifiques de la tumeur. Il a d'ailleurs été montré que la présence de LT CD8 cytotoxiques au sein de la tumeur est un facteur associé à une survie prolongée (Galon et al., 2006; Zhang et al., 2003). Dans certains cas, l'action des LT CD4 et CD8 est insuffisante pour empêcher la progression tumorale. La vaccination permet d'amplifier la fréquence et la puissance de ces réponses en stimulant artificiellement les lymphocytes. Celle-ci peut se faire en utilisant des peptides, de l'ADN ou des fragments de tumeur par exemple, qui une fois reconnus par le système immunitaire permettront d'améliorer les réponses anti-tumorales existantes et peut être en induire de nouvelles.

Malgré des résultats encourageants sur des petites cohortes, ceux-ci n'ont pas pu être confirmés à plus large échelle (Mocellin et al., 2004). Cependant, les nouvelles connaissances plus approfondies sur les cellules dendritiques ont permis de développer de nouveaux vaccins plus rationnels et en cours de validation (Mellman et al., 2011).

Chapitre 2 : Modifications génétiques et reprogrammation des lymphocytes T

1. Transfert de gène

1.1. Les différentes techniques de transfert de gène en thérapie génique.

La thérapie génique consiste à exprimer, inactiver ou moduler l'expression d'un gène dans le but de traiter une maladie. Le but des essais de thérapie génique est souvent d'ajouter un gène à certaines cellules afin de compenser un gène manquant ou défectueux. Dans le cadre du cancer et du développement d'immunothérapie, la thérapie génique va permettre de modifier les cellules du système immunitaire afin de les rediriger contre les cellules cancéreuses.

Pour modifier génétiquement une cellule de façon transitoire ou stable, il existe différentes méthodes qui sont présentées dans le **Tableau I**. Les techniques de transfert de gène dites stables vont permettre une expression à long terme du transgène dans la cellule hôte (intégration dans le génome) contrairement aux techniques transitoires où la modification génique va se perdre au fur et à mesure des divisions cellulaires.

Tableau I : **Techniques de transfert de gène en thérapie génique**

Techniques de transfert de gène validées en clinique	
<i>Expression stable</i>	<i>Expression transitoire</i>
Rétrovirus	Transfection d'ARN
Lentivirus	
Transposons	
Edition de gène basée sur les nucléases à doigt de Zinc	
Technique de transfert de gène en développement	
<i>Expression stable</i>	<i>Expression transitoire</i>
TALEN	Transfection de protéine (dCas9)
CRISPR	

En général, le transfert de gène est effectué *in vitro* après stimulation des LT qui sont ensuite modifiés génétiquement puis expandus en culture jusqu'à obtention d'une quantité satisfaisante mais il peut parfois être réalisée *in vivo*.

1.2. Les vecteurs viraux

Plusieurs types de vecteurs sont aujourd'hui disponibles et sont regroupés en deux catégories : les vecteurs non viraux (acides nucléiques nus) et les vecteurs viraux. Le choix de l'un ou l'autre de ces vecteurs est basé sur différents critères qui concernent la taille du transgène, son expression mais aussi la cellule cible. Dans cette partie, nous nous intéresserons seulement aux vecteurs viraux et plus particulièrement aux γ -rétrovirus et aux lentivirus.

1.2.1. Généralités sur les γ -rétrovirus et les lentivirus

Les γ -rétrovirus et les lentivirus appartiennent à la famille des rétrovirus et sont utilisés depuis plus de 20 ans, en thérapie génique, comme vecteur pour transporter le gène d'intérêt vers la cellule hôte. Ils doivent répondre à de nombreux critères de sécurité, de gestion de leur dissémination et de leur réplication. Ces points, qui sont particulièrement sensibles dans le cas de l'utilisation des virus en thérapie génique et cellulaire, seront développés dans le chapitre IV.

Les γ -rétrovirus sont des virus enveloppés à ARN simple brin qui ne peuvent se multiplier qu'à l'intérieur des cellules qu'ils ont infectées. Ils utilisent la machinerie transcriptionnelle de la cellule hôte pour se répliquer et produire les protéines virales dont ils ont besoin. Ces vecteurs sont utilisés pour introduire un gène dans une cellule en division et ce sont les premiers à avoir été utilisés pour une application clinique (Rosenberg et al., 1990). Ces virus isolés notamment chez les rongeurs ont été modifiés et optimisés et c'est principalement la machinerie d'intégration de l'ADN de la cellule hôte qui est utilisée. La plupart des vecteurs γ -rétroviraux ont été construits à partir d'un rétrovirus de souris, non pathogène pour l'homme, le virus leucémogène murin (Murine Leukemia Virus, MLV). De nombreuses études de transfert de TCR utilisent également des vecteurs γ -rétroviraux de type MSCV (Mouse Stem Cell Virus) ou MPSV (Myeloproliferative Sarcoma Virus) (Merhavi-Shoham et al., 2012). Le génome de ces γ -rétrovirus contient 3 gènes indispensables à la multiplication du virus : *gag* pour les protéines de capsid, *pol* pour la reverse transcriptase, et *env* pour les protéines formant l'enveloppe virale permettant l'entrée du virus dans la cellule en reconnaissant des récepteurs spécifiques à sa surface (Kootstra and Verma, 2003). L'utilisation des γ -rétrovirus permet une intégration stable du transgène au sein du génome de la cellule hôte. Néanmoins, cette intégration a lieu uniquement dans les cellules en division et se fait au hasard, ce qui comporte un risque de mutagenèse insertionnelle (Figure 13).

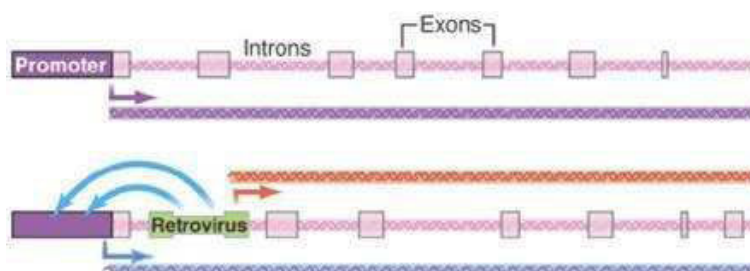


Figure 13 : **Activation de la transcription par mutagenèse insertionnelle** (Trono, 2003).

Le gène (exons + introns) est représenté avec son promoteur en rose. Le transcript issu de ce gène est représentée en violet. L'intégration d'un vecteur rétroviral à proximité du promoteur peut stimuler ce dernier (flèches bleues), entraînant une augmentation de la production du transcript (double ligne bleu-violet). Des transcrits aberrants peuvent également être obtenu à partir du promoteur contenu dans le vecteur lui-même (ligne orange).

Un autre moyen de transfert de gène est le recours aux lentivirus, une sous-classe des rétrovirus au génome plus complexe : en plus des gènes *gag*, *pol* et *env*, le génome d'un lentivirus possède également les gènes *rev* et *tat* nécessaires à la réplication virale (Oldham et al., 2015). Ils présentent plusieurs avantages majeurs. En effet, ils ont la capacité d'infecter des cellules qui ne sont pas en division. Ceci présente un réel avantage, notamment pour le transfert de gène dans des cellules comme les CPA ou les monocytes (Froelich et al., 2010). De plus, les lentivirus sont plus résistants aux mécanismes d'extinction du transgène par la cellule hôte et l'intégration dans le génome est plus sécurisée (Frecha et al., 2010). Les nouvelles générations de vecteurs lentiviraux possèdent un signal d'inactivation, conséquence de la délétion de la région U3 du LTR 3'. Leur utilisation permet de limiter les problèmes de mutagenèse insertionnelle car les lentivirus ont une faible propension à s'intégrer au niveau de sites d'initiation de la transcription, réduisant le risque de transactivation (Houghton et al., 2015). Par ailleurs, un travail a été réalisé par Cattoglio *et al.*, afin d'étudier les sites d'intégration récurrents des transgènes (Cattoglio et al., 2007). Pour ce faire, des cellules hématopoïétiques CD34+ ont été transduites soit par un γ -rétrovirus, soit par un lentivirus puis les sites d'intégration et la fréquence de mutagenèse insertionnelle ont été étudiés. Les auteurs de cette étude ont pu montrer que les transgènes issus de γ -rétrovirus s'intégraient, avec une fréquence plus importante que les transgènes issus de lentivirus, au niveau de proto-oncogènes ou de sites d'insertions associés au cancer ou encore au niveau de gènes contrôlant la prolifération cellulaire ce qui augmente la mutagenèse. Enfin, les lentivirus permettent le transfert de transgène d'une taille plus importante (jusqu'à 30kb contre 8 à 10kb pour le rétrovirus).

1.2.2. Production de particules rétrovirales

Les particules rétrovirales sont composées d'une capsidie qui renferme un acide nucléique (ADN ou ARN) sous forme compactée (**Figure 14**) et sont produites par des lignées cellulaires appelées lignées d'empaquetage. En effet, un vecteur viral de thérapie génique utilise les propriétés infectieuses du virus, c'est-à-dire sa capacité à introduire son matériel génétique dans une cellule tandis que les séquences responsables de la réplication sont remplacées par le transgène. Le virus est alors non répliatif.

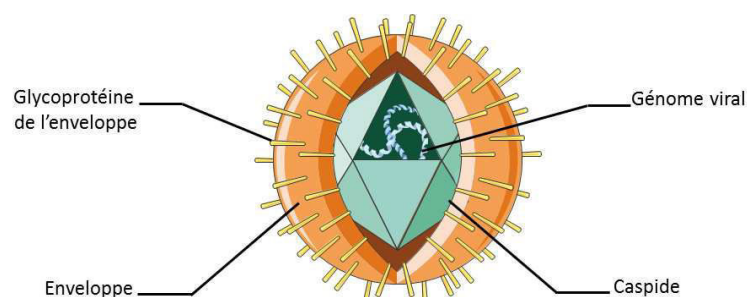


Figure 14 : **Structure d'une particule rétrovirale**

Une lignée d’empaquetage est une lignée qui a été génétiquement modifiée afin d’exprimer les protéines nécessaires à la production de particules rétrovirales : *gag*, *pol* et *env*. De nombreuses lignées cellulaires d’empaquetage ont été développées et sont utilisées pour la production de surnageant de grade clinique telles que PG13, Phoenix, PA317.

Après transfection d’une lignée d’empaquetage avec un vecteur rétroviral portant le transgène d’intérêt, celle-ci va être capable de produire dans le milieu de culture, des particules rétrovirales contenant l’ARN d’intérêt. Ce surnageant de culture, appelé surnageant rétroviral sera alors utilisé pour infecter les cellules cibles (**Figure 15**).

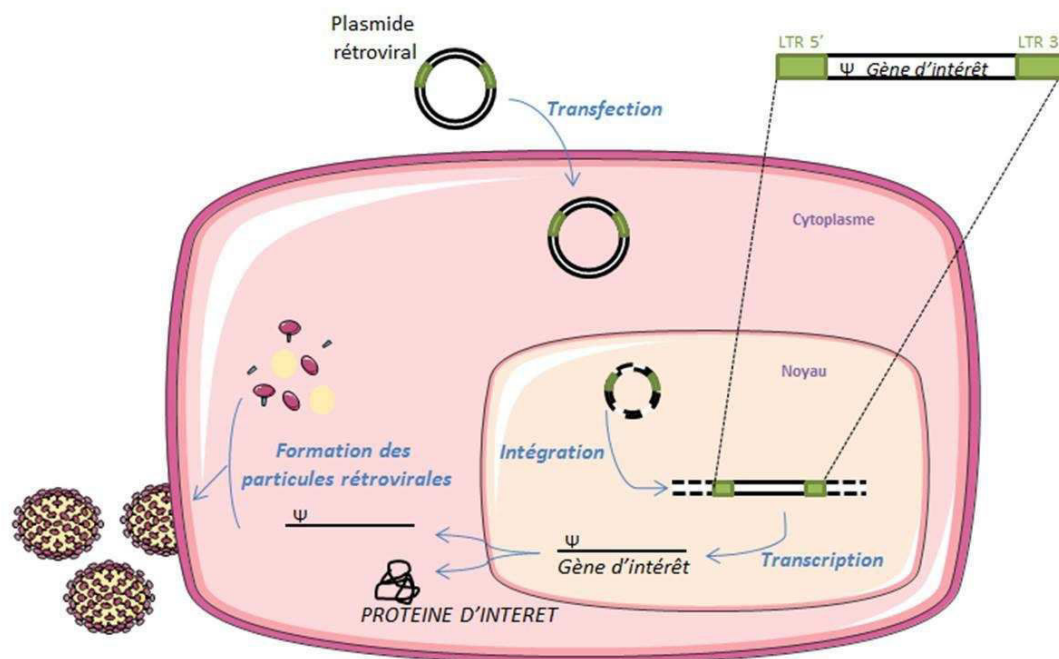


Figure 15 : Production des particules rétrovirales contenant le gène d’intérêt par la lignée d’empaquetage.

Post-transfection, la lignée d’empaquetage est capable de produire les particules rétrovirales pour le vecteur d’intérêt de façon transitoire pendant 24 à 72h. Les différentes récoltes de surnageant (toutes les 24h) sont le plus souvent « poolées » avant d’être centrifugées et filtrées afin d’éliminer les contaminants issus de la lignée d’empaquetage puis congelées jusqu’à leur utilisation. Le surnageant rétroviral est ensuite mis en contact avec les cellules à transduire. La transduction désigne l’entrée d’un vecteur viral et l’expression du transgène dans la cellule cible. Elle est basée sur la liaison entre des récepteurs présents à la surface des particules rétrovirales et des récepteurs des membranes des cellules hôtes, ce qui confère la spécificité d’espèce. Des lignées d’empaquetage stables pour un vecteur peuvent être établies par transfection ou transduction et sélection d’un clone cellulaire stable qui produit le meilleur surnageant. Le titre viral du surnageant permet de déterminer la multiplicité

d'infection (MOI), qui équivaut au rapport entre le nombre de particules infectieuses et le nombre de cellules soumises à l'infection.

Pour la production des particules lentivirales, le génome viral est divisé en 3 ou 4 plasmides qui sont co-transfectés dans la lignée productrice de particules : un plasmide d'empaquetage qui code les éléments nécessaires à la réplication (*gag*, *pol* et *rev*), un plasmide de transfert qui contient le transgène et un plasmide codant pour l'enveloppe (*env*) (Figure 16). L'enveloppe la plus couramment utilisée est l'enveloppe VSV-G (*Vesicular Stomatitis Virus-Glycoprotein*), elle permet au virus de couvrir un large tropisme par la liaison aux récepteurs des LDL (Finkelshtein et al., 2013). La liaison à ce type de récepteur va entraîner la fusion de la particule avec la cellule.

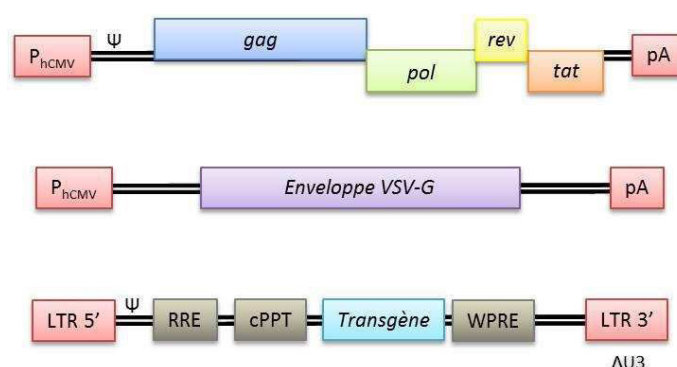


Figure 16 : **Plasmides de production des particules lentivirales pseudotypées VSV-G.**

La production des particules lentivirales nécessite la co-transfection transitoire de ces 3 plasmides. *Gag*, *pol* et *env* sont des gènes de structure, *RRE* permet d'assurer l'exportation de l'ARNm viral vers le cytoplasme, *cPPT* améliore le transport nucléaire de l'ADN, *WPRE* est élément de régulation post-transcriptionnelle qui permet d'augmenter l'expression du transgène porté par le vecteur et le titre de la production.

La séquence du gène d'intérêt est encadrée, en 5' et en 3', par 2 séquences non codantes appelées LTR (Long Terminal Repeat). Ces séquences sont essentielles pour l'encapsidation, la transcription inverse et l'intégration du transgène dans le génome de la cellule hôte. Le LTR 5' comprend le promoteur du gène et le LTR 3', les éléments de terminaison de la transcription. En aval, du LTR 5', il existe également un signal qui permet l'encapsidation du génome dans la particule rétrovirale (signal Ψ).

Ces types de vecteurs (γ -rétroviral et lentiviral) offrent l'avantage d'une intégration dans le génome de la cellule hôte permettant une expression stable à long terme du transgène.

1.2.3. Design/conception des vecteurs

Dans le contexte de la recherche en thérapie génique, le design des vecteurs est une étape importante et complexe. De plus, il est souvent nécessaire de faire exprimer à un organisme plusieurs gènes. Ainsi, différentes stratégies ont été développées : utilisation de promoteurs multiples, insertion de sites d'épissage entre les différents gènes et plus récemment, insertion de séquences IRES (Internal

Ribosome Entry Site) qui permettent le démarrage de la traduction ou insertion de site de clivage de type 2A.

Les sites IRES sont largement utilisés et permettent la traduction de plusieurs protéines à partir d'un seul ARN en servant de relais au promoteur. En effet, ils sont capables de recruter directement le ribosome au niveau de la séquence d'initiation de la traduction indépendamment de tout autre facteur. Grâce à leur structure, ils peuvent interagir directement avec le ribosome et les facteurs d'initiation de la traduction (**Figure 17**). L'utilisation des séquences IRES connaît tout de même des limites car ce sont des grosses séquences d'environ 500 nucléotides. Elles peuvent poser un problème notamment dans le cas des constructions déjà importantes où elles agrandissent encore la taille du vecteur. De plus, il a été montré que l'efficacité de traduction du gène placé derrière la séquence IRES est moins bonne que les autres (de Felipe et al., 2006; Szymczak and Vignali, 2005).

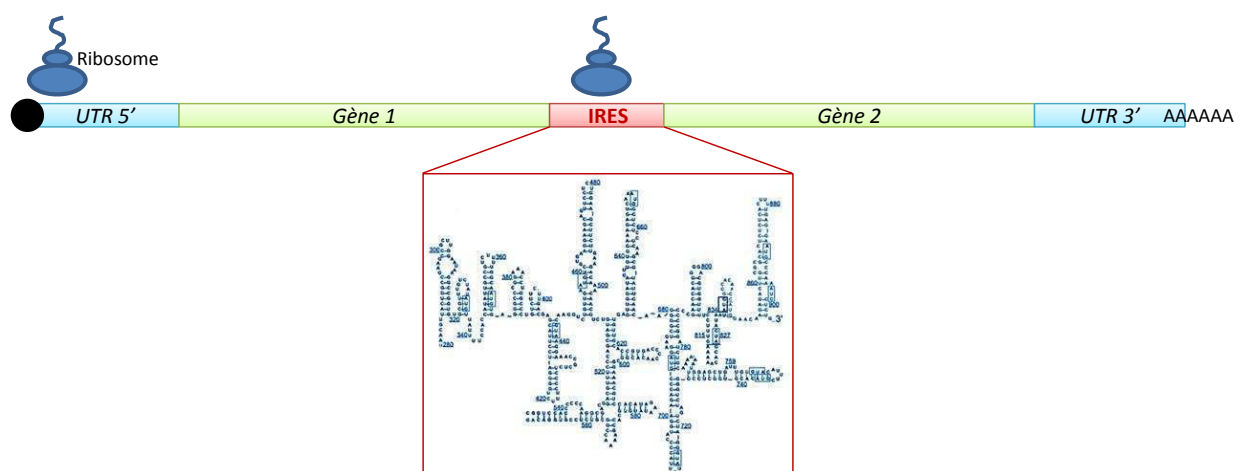


Figure 17 : Structure de l'IRES.

Le ribosome se fixe au niveau de la coiffe méthylée présente à l'extrémité 5' mais il est capable également d'interagir directement avec la séquence IRES à la structure bien spécifique.

Le développement des sites de clivage 2A a permis de contrecarrer les inconvénients des séquences IRES. Les sites d'auto-clivage 2A ont été identifiés pour la première fois par Ryan et collaborateurs chez un virus de type picornavirus. Il s'agit de peptides de 18 à 22 acides aminés. Des études récentes montrent que le ribosome saute la synthèse du peptide prolyl-glycyl-prolyl (PGP) présent en C-terminal du 2A conduisant ainsi au clivage entre le 2A et la protéine située en aval (de Felipe et al., 2010; Donnelly et al., 2001b). Ce système 2A présente également l'avantage d'une expression stoechiométrique des protéines présentes de part et d'autre du site de clivage. Aujourd'hui plusieurs séquences 2A identifiées chez le picornavirus (P2A, E2A, F2A) et le rotavirus (T2A) sont utilisées en recherche biomédicale (**Figure 18**). L'efficacité des différents 2A est controversée mais le site T2A semble être le plus efficace avec un clivage proche de 100% (Donnelly et al., 2001a; Szymczak et al., 2004).

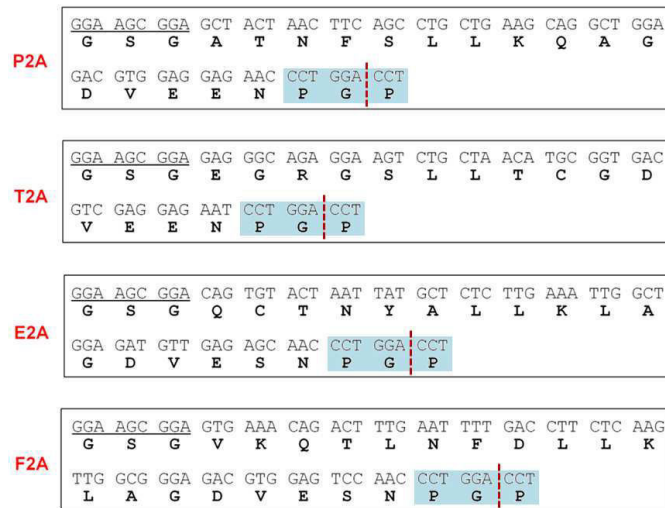


Figure 18 : Séquences nucléiques et peptidiques des différents 2A utilisés actuellement. Le site de clivage est matérialisé en bleu. D'après Kim et al., 2011.

1.3. Des nouveaux axes de recherche

1.3.1. Les nucléases à doigt de Zinc

Identifiées dans les années 80, les nucléases à doigts de Zinc permettent de corriger des mutations. Ce sont des protéines hybrides créées à partir de la fusion de gènes codant pour les protéines à doigts de Zinc avec celui codant pour la région catalytique de l'enzyme de restriction FokI, qui apporte l'activité enzymatique. Chaque doigt de Zinc permet une interaction avec l'ADN en reconnaissant une courte séquence spécifique (trois nucléotides). L'association de plusieurs domaines doigts de Zinc appropriés permet de cibler de manière unique une séquence d'intérêt (Maeder and Gersbach, 2016).

Les nucléases à doigt de Zinc ont été utilisées dans un essai clinique de phase I pour traiter le VIH (Tebas et al., 2014). Le système est introduit dans les lymphocytes T grâce à un vecteur adénoviral. La nucléase est dessinée pour introduire une mutation dans le gène codant pour le corécepteur CCR5, nécessaire pour l'entrée du virus du SIDA dans les cellules T (Figure 19). L'inactivation du récepteur CCR5 confère donc une résistance au virus. Les essais cliniques de phase II sont actuellement en cours.

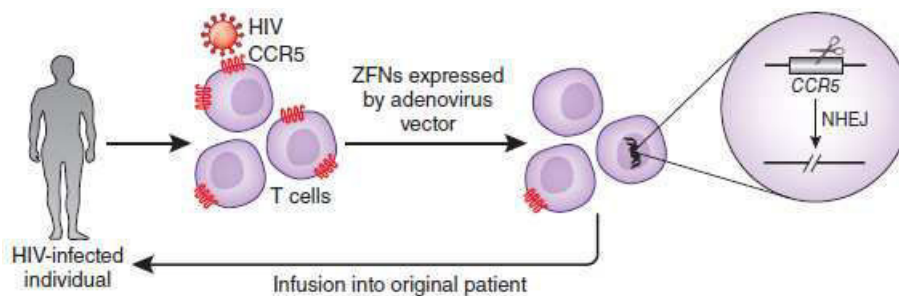


Figure 19 : Stratégie thérapeutique utilisant la nucléase à doigt de Zinc dans le cadre du VIH (Lombardo and Naldini, 2014).

1.3.2. Techniques TALEN et CRISPR

Les TALENs (Transcription Activator-Like Effector Nucleases) sont des « ciseaux moléculaires » qui permettent différentes modifications génétiques à un endroit précis et défini du génome. Ils ont été utilisés pour la première fois en 2010 (Christian et al., 2010). Ce système d'édition est dérivé des facteurs de transcription TALE identifiés tout d'abord chez la bactérie *Xanthomonas*. Ces protéines sont constituées de séquences répétées de 34 acides aminés qui se lient à un nucléotide cible unique en formant une hélice autour de l'ADN. Les TALENs sont des protéines chimériques constituées d'un domaine de liaison à l'ADN dérivé des TALE qui apporte la spécificité et d'un domaine endonucléasique qui vont permettre d'induire une cassure double brin de l'ADN en un site défini du génome. La dimérisation de l'enzyme FokI est nécessaire à l'activité endonucléasique des TALENs (**Figure 20**).

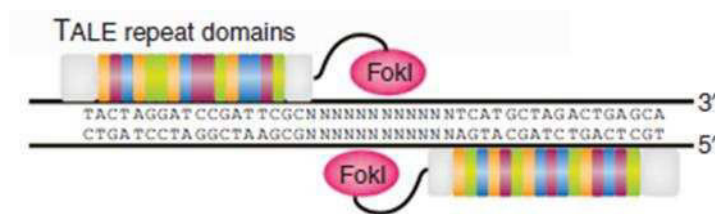


Figure 20 : L'édition du génome par le système TALEN (Maeder and Gersbach, 2016).

La technologie CRISPR/Cas9 (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat) est une technologie en plein essor qui est utilisée dans plus de 3000 laboratoires et fait déjà l'objet de plus de 900 publications. C'est la nouvelle génération d'outils pour la réparation du génome qui présente de nombreux avantages par rapport aux autres techniques d'éditions du génome : elle se compose d'une seule protéine Cas9, elle dépend d'un couple ARN/ADN et non protéine/ADN, cette technique peut également cibler l'ADN méthylé. La technologie CRISPR/Cas9 se compose donc de la nucléase Cas9 qui est guidée et activée par un ARN guide (ARNg) (Hsu et al., 2014). Cet ARNg est composé d'une séquence constante de 42 nucléotides et d'une vingtaine de nucléotides complémentaires de la séquence d'ADN cible. L'ARNg va se lier à l'ADN à proximité d'un motif appelé PAM et la Cas9 va pouvoir créer une cassure double brin (**Figure 21**). Cette cassure pourra alors être réparée par les systèmes de réparation de l'ADN (jonction des extrémités non homologues ou recombinaisons homologues).



Figure 21 : **La technologie CRISPR/Cas9** (Source : biotechn.asia).

La nucléase Cas 9 (en bleu) est guidée et activée par une séquence ARN guide. La nucléase CRISPR-Cas9 cible une séquence de 3 nucléotides appelée PAM (en jaune). Cas9 comprend deux domaines nucléasiques coupant chacun un des brins d'ADN.

2. Développement de stratégies d'immunothérapies adoptives innovantes

L'immunothérapie adoptive est une méthode de thérapie cellulaire utilisant des populations cellulaires spécifiques des tumeurs et existantes chez le patient qui sont amplifiées *ex vivo* puis ré-injectées. Cette approche de traitement personnalisé a montré des résultats prometteurs dans différents types de cancers comme nous le verrons dans la suite de ce chapitre. Le développement de ces stratégies repose sur le transfert adoptif de TILs ou de lymphocytes T génétiquement modifiés pour exprimer un récepteur transgénique aux antigènes.

2.1. Le transfert adoptif de lymphocytes T infiltrant la tumeur

La découverte de l'IL-2 en 1976 a permis l'expansion *ex vivo* et le maintien en culture de lymphocytes T. Il est décrit depuis longtemps que la présence d'un infiltrat lymphocytaire T dans les tumeurs primitives et les métastases est corrélée à un meilleur pronostic. La thérapie cellulaire par transfert adoptif de TIL consiste alors à administrer au patient un grand nombre de lymphocytes T actifs spécifiques de la tumeur et suffisamment activés. L'équipe de Rosenberg est une équipe de référence concernant les techniques d'isolement et de prolifération des TIL. Les TIL sont isolés à partir de biopsie de ganglions drainant la tumeur ou des tumeurs primaires. Ils sont découpés et dissociés puis mis en culture dans un milieu contenant de fortes concentrations d'IL-2 pendant environ 2 semaines. Les cellules présentant une réponse anti-cancer sont amplifiées pour être par la suite ré-injectées au patient (**Figure 22**).

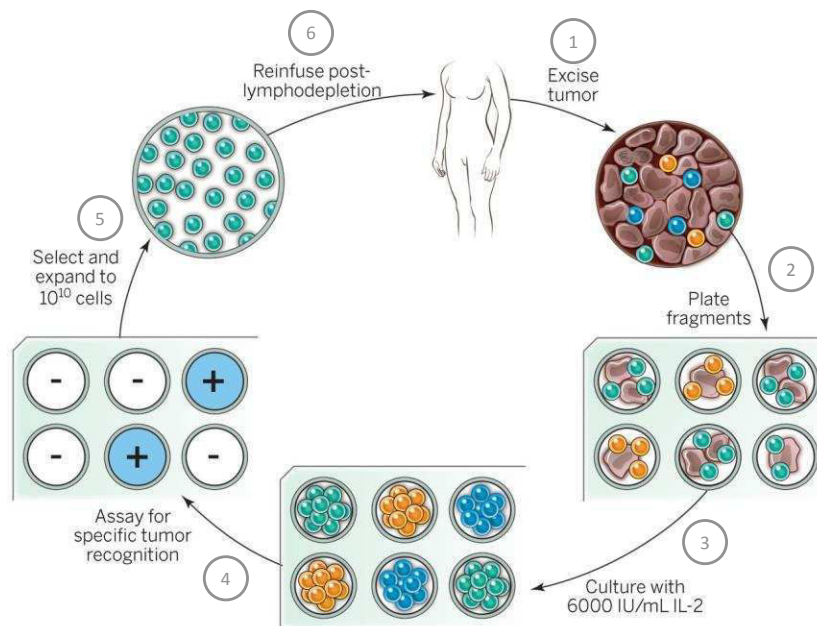


Figure 22 : Technique d'isolement et d'expansion des TILs.

Les TILs sont isolés à partir de biopsie de tumeurs ou de métastases qui sont tout d'abord broyées. Les TILs sont ensuite amplifiés grâce à de fortes concentrations d'IL-2. Après sélection des clones présentant les meilleures réponses anti-tumorales, ils peuvent être ré-injectés au patient (Rosenberg and Restifo, 2015).

Le développement du transfert adoptif de lymphocytes a débuté à la fin des années 1980 avec tout d'abord la démonstration que des lymphocytes infiltrant des mélanomes étaient capables de proliférer en présence d'IL-2, d'exprimer le CMH et de reconnaître leurs cibles (Muul et al., 1987). Le premier essai de traitement de patients souffrant de mélanome métastatique à l'aide de TIL a eu lieu en 1988 (Rosenberg et al., 1988). Un premier essai clinique de transfert adoptif de TIL montrant une impressionnante régression tumorale et des réponses a également été publié par l'équipe de Rosenberg dans le mélanome (Dudley et al., 2002). Treize patients ont reçu une lymphodéplétion non myéloablatrice (cyclophosphamide et fludarabine pendant 7 jours) avant l'injection de TIL autologues. Une réponse partielle a été observée chez 6 d'entre eux. Cette étude pionnière a permis de poser les fondements de cette thérapie avec notamment la caractérisation des cellules injectées et leur persistance *in-vivo*. Une corrélation a pu être établie entre la régression tumorale et la persistance des cellules injectées (Robbins et al., 2004). Plus récemment, 93 patients ont pu être traités par l'équipe de Rosenberg avec une réponse comprise entre 49 et 72% (Rosenberg et al., 2011).

2.2. TCR transgéniques

Chez l'adulte, la formation des LT début dans la moelle osseuse. À un stade de différenciation précoce, les pro-thymocytes gagnent le thymus où a lieu leur différenciation, leur maturation et l'acquisition de leur TCR (T-cell Receptor) qui leur donnera leur spécificité. Le TCR est un complexe transmembranaire composé de 2 chaînes polypeptidiques : TCR α et TCR β . Ces 2 chaînes contiennent une région N-

terminale variable et une région constante. Elles sont reliées entre elles par un pont disulfure. Le TCR est le récepteur qui va permettre à la cellule T de reconnaître l'antigène présenté par les CPA. Les antigènes reconnus sont présentés sous forme de peptides liés au Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH). Il est associé au CD3 qui joue un rôle dans la transduction du signal. Le complexe TCR/CD3 est également associé au CD4 ou au CD8, ces 2 molécules accessoires interagissant avec le complexe peptide/CMH de classe II ou de classe I respectivement pour renforcer le contact entre les cellules. L'activation des lymphocytes T est un processus complexe qui nécessite un signal d'initiation, un signal de co-stimulation et l'activation de récepteur aux cytokines (**Figure 23**).

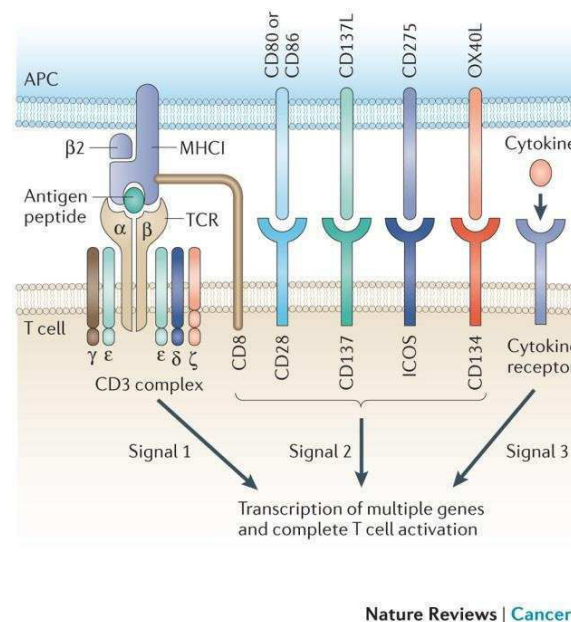


Figure 23 : Reconnaissance de l'antigène et signaux nécessaires à l'activation des lymphocytes T (Kershaw et al., 2013).

Cette interaction cellulaire a lieu au niveau de la synapse immunologique et implique de nombreuses molécules des LT et des CPA.

Les signaux biochimiques nécessaires au déclenchement de la réponse T ne sont activés que si plusieurs TCR et co-récepteurs sont agrégés. En effet, l'agrégation des TCR permet la phosphorylation des tyrosines du complexe CD3 (CD3 $\delta\epsilon$, CD3 $\gamma\epsilon$ et CD3 ζ). Le signal peut alors être transmis dans le noyau conduisant à l'activation des facteurs de transcription des gènes régulant la réponse T. La reconnaissance d'un antigène par un LT conduit à son activation et va permettre sa prolifération et l'acquisition d'un phénotype et de fonctions particulières aboutissant à l'élimination des cellules exprimant l'antigène reconnu (induction de l'apoptose, relargage de granules cytotoxiques).

Les LT reconnaissent des peptides antigéniques présentés par les molécules du CMH *via* leur TCR. Dans le cadre du traitement de cancers, le répertoire des LT reconnaissant les antigènes associés aux tumeurs est souvent faible et peu averse (Rosenberg, 2001). Il est alors, primordial d'être capable de rediriger la spécificité d'un LT contre un antigène connu et spécifique de la maladie. Une des stratégies

consiste à utiliser des récepteurs synthétiques comme les Récepteurs Chimériques à l'Antigène (CAR) ou les TCR transgéniques qui permettent de modifier la spécificité d'un LT dans le cas où le répertoire T du patient est insuffisant. Cette approche de TCR transgénique a été développée pour la première fois par l'équipe de Rosenberg.

Pour se faire, les chaînes α et β (parties hypervariables) d'un TCR spécifique d'un antigène tumoral doivent être identifiées et clonées dans un vecteur rétroviral ou lentiviral. Lors de cette étape, les séquences peuvent être optimisées afin d'augmenter l'avidité du TCR et par conséquent, la fonctionnalité des LT. La transduction de LT en système autologue permettra ensuite d'obtenir des LT spécifiques de la tumeur (**Figure 24**).

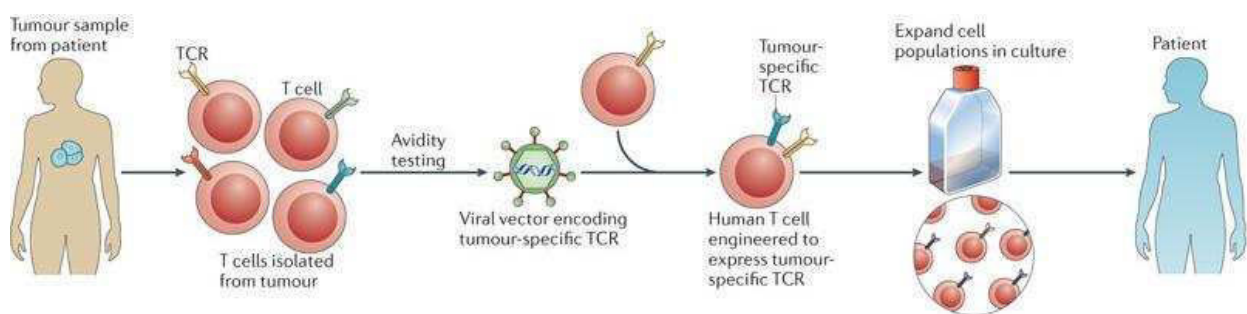


Figure 24 : Technique d'obtention de LT génétiquement modifiés avec un TCR (Restifo et al., 2012).

Les cellules du patient seront alors capables d'exprimer à la fois le TCR endogène et le TCR transgénique avec un risque d'appariement croisé : la chaîne α du TCR endogène peut être associée avec la chaîne β du TCR transgénique aboutissant à l'émergence de nouveaux clones T de spécificité inconnue provoquant un risque de réactions auto-immunes. Il est donc nécessaire d'optimiser les séquences utilisées (par l'intégration de cystéines par exemple) afin d'orienter la recombinaison souhaitée et ainsi limiter les risques.

Malgré certains inconvénients liés à la nécessité de compatibilité avec le CMH du patient et la perte d'expression du CMH observée dans de nombreux cancers, cette approche a montré son efficacité clinique, notamment dans le mélanome, le cancer colorectal et le sarcome synovial. Cette approche a été utilisée pour le ciblage des antigènes CEA (CarcinoEmbryonic Antigen), un antigène surexprimé dans les cancers épithéliaux et NY-ESO-1 dans le mélanome (Parkhurst et al., 2011; Robbins et al., 2011).

2.3. Ciblage de l'environnement tumoral : reprogrammation du microenvironnement tumoral

Plusieurs arguments montrent que la tumeur entretient une relation complexe avec son microenvironnement et par conséquent avec le système immunitaire (Chouaib, 2003). De ce fait, le microenvironnement constitue une cible pour l'immunothérapie. Le ciblage de l'environnement tumoral (cytokines et récepteurs) peut être utilisé pour contribuer à une meilleure activation des

cellules de l'immunité anti-tumorale. L'objectif est de favoriser certaines cytokines telles que TNF α , IL-2, IL-12, IL-15 au détriment d'autres facteurs immunosuppresseifs comme le TGF β (Merhavi-Shoham et al., 2012).

L'Interleukine-12 est une cytokine hétérodimérique p70 constituée des sous unités p35 et p40 reliées par un pont disulfure. Elle est principalement produite par les monocytes, les macrophages et les cellules dendritiques (Heufler et al., 1996; Hsieh et al., 1993). Le récepteur à l'IL-12 (IL-12R) est une protéine transmembranaire composé de 2 sous-unités : IL-12R- β 1 qui interagit préférentiellement avec IL-12p40 et IL-12R- β 2 avec IL-12p35 (Zundler and Neurath, 2015). L'IL-12R est exprimé de façon constitutive ou inductible à la surface de différentes cellules de l'immunité incluant les cellules NK, les LT et les LB (Pistoia et al., 2009). Les sous-unités β 1 et β 2 du récepteur à l'IL-12 sont respectivement associées aux kinases TYK2 et JAK2. Ainsi, l'IL-12p70 sécrétée lors de la réponse immunitaire va se fixer sur son récepteur et conduire à l'activation de la voie de signalisation JAK-STAT. Une cascade d'activation par phosphorylation et dimérisation conduit alors à la translocation nucléaire des facteurs de transcription de la famille STAT et particulièrement STAT4 qui vont agir sur la transcription de leurs gènes cibles (Trinchieri, 2003). Le facteur de transcription STAT4 a notamment été identifié comme un facteur de transcription activant la transcription du gène codant l'IFN γ (Xu et al., 1996). La production d'IL-12 stimule l'immunité innée et l'immunité adaptative (**Figure 25**). Elle augmente la production d'IFN γ par les cellules NK et les LT : elle stimule la prolifération et la cytotoxicité des NK, des LT CD8 *via* la production de perforines et granzymes et favorise la différenciation Th1 des LT CD4 (Trinchieri et al., 1992; Zeh et al., 1993). L'IL-12 permet également d'augmenter l'ADCC des cellules tumorales et induit la production d'IgG par les LB. Les propriétés de cette cytokine passent aussi par l'induction de cytokines anti-angiogéniques et la production de chimiokines (IP-10, MIG), la reprogrammation des MDSC et l'augmentation de la présentation par le CHM I (Del Vecchio et al., 2007; Lasek et al., 2014). Ainsi, par l'induction de ces mécanismes l'IL-12 présente des propriétés anti-tumorales puissantes.

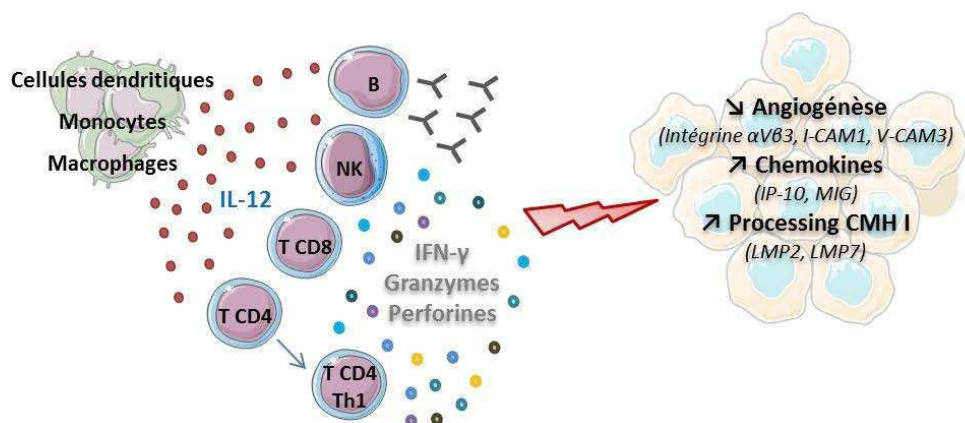


Figure 25 : Propriétés de l'interleukine-12 sur le système immunitaire.

Malgré ces propriétés thérapeutiques, l'utilisation d'IL-12 est limitée par sa toxicité au niveau des tissus hématopoïétiques, intestinaux, hépatiques et pulmonaires (van Herpen et al., 2005). De plus, il a été montré que l'IL-12 favorise l'épuisement des LT. Ce mécanisme passe notamment par l'induction de l'expression de TIM-3 qui inhibe la réponse Th1 et favorise la tolérance (Sabatos et al., 2003; Yang et al., 2012). Il a donc été nécessaire de mettre en place des stratégies afin de délivrer l'IL-12 au niveau de la tumeur et de façon contrôlée (Tugues et al., 2015). Le gène codant l'IL-12 a ainsi été placée sous la dépendance d'un promoteur conditionnel de type élément de réponse à NFAT (Zhang et al., 2011). Suite à la reconnaissance de l'antigène et l'activation du LT, il va y avoir activation du facteur de transcription NFAT qui va pouvoir se fixer au niveau du promoteur et activer la transcription de l'IL-12. Ainsi, la production d'IL-12 est contrôlée dans le temps et dans l'espace. Les modèles pré-cliniques développés montrent effectivement un contrôle des effets secondaires de l'IL-12 (**Figure 26**).

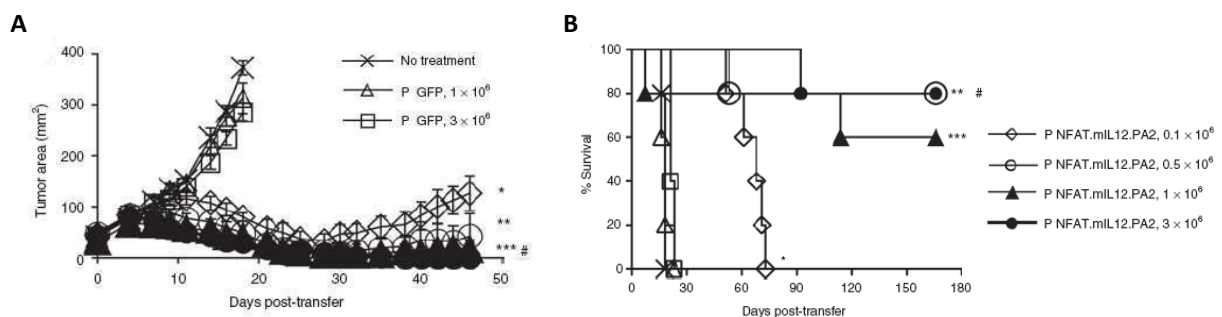


Figure 26 : Effet de l'interleukine-12 produite de façon spécifique et contrôlée (Zhang et al., 2011).
 Les lymphocytes T ont été génétiquement modifiés avec un TCRg dirigé contre pmel-1 et pour produire de l'IL-12 sous un promoteur conditionnel. A : régression de la tumeur et B : amélioration de la survie.

Grâce à ce système de sécrétion conditionnelle, une dose de 1.10^5 cellules T génétiquement modifiées est plus efficace que 1.10^6 cellules T ne produisant pas d'IL-12 dans un modèle murin. Cette approche prometteuse est actuellement évaluée dans un essai clinique de phase I dans le mélanome avancé (NCT01397708) et dans le gliome (NCT02026271). Une phase II est également en cours pour évaluer l'effet de l'IL-12 seule ou en combinaison à de la chimiothérapie dans le cancer du sein métastatique (NCT01703754).

3. Modifications génétiques des LT par les CAR

Un autre moyen de reprogrammer la spécificité d'un lymphocyte T existe : il s'agit des Récepteurs Chimériques à l'Antigène ou CAR. Ce sont des protéines chimériques composées du domaine de reconnaissance d'un anticorps fusionné à un ou plusieurs domaines de transduction du signal des récepteurs T (TCR). Les CAR présentent notamment l'avantage d'une reconnaissance indépendante du CMH.

3.1. La technologie CAR

3.1.1. Structure

Un CAR est un récepteur chimérique composé de 3 domaines (**Figure 27**) :

- un domaine extracellulaire assurant la spécificité du CAR : il s'agit du scFv (*single-chain variable fragment*) d'un anticorps monoclonal spécifique d'un antigène de tumeur.
- un domaine de signalisation intracellulaire issu d'un LT
- un domaine transmembranaire (*hinge* ou *spacer*) qui lie les 2 domaines précédents et joue un rôle dans la conformation et l'accessibilité du récepteur pour sa cible (Bridgeman et al., 2010)

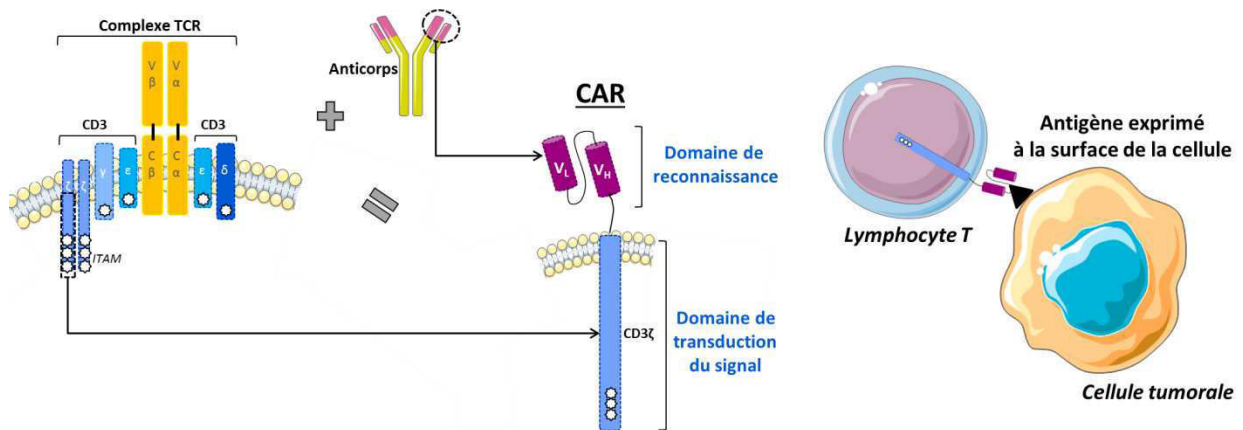


Figure 27 : Principe de construction d'un CAR.

Les domaines de liaison et de transduction du signal sont reliés entre eux par une région hinge qui peut être le domaine CH₂-CH₃ d'une IgG₁ et qui apporte de la flexibilité pour une meilleure activation du LT.

Cette stratégie permet la reconnaissance directe d'antigènes de tumeur exprimés à la surface des cellules indépendamment d'une présentation par le CMH. De plus, en utilisant le scFv d'un anticorps, les CAR peuvent être utilisés pour reconnaître un large panel de structures incluant des protéines et des structures non protéiques comme les antigènes carbohydrates (Mezzanzanica et al., 1998).

Les premiers CAR ont été développés à la fin des années 80 et correspondaient à la région variable d'une immunoglobuline monoclonale pour la portion extracellulaire et aux régions α et β d'un TCR pour la région intracellulaire (Becker et al., 1989; Goverman et al., 1990; Gross et al., 1989; Kuwana et al., 1987). Cependant, le premier « vrai » CAR a été développé en 1993. Cette construction appelée « T-body » était constitué d'un scFv fusionné à la chaîne CD3ζ (Eshhar et al., 1996; Eshhar et al., 1993). Cette première génération de CAR a permis de faire la preuve du concept malgré des effets cliniques limités (Hwu et al., 1995; Ramos and Dotti, 2011). En effet, les LT modifiés avec ce type de CAR présentent une faible expansion et une persistance limitée. Ces faiblesses sont le reflet d'un défaut d'activation des LT par les CARs en l'absence de molécules co-stimulatrices comme le CD80 ou le CD86. L'interaction avec ces molécules de co-stimulation fait partie des 3 signaux nécessaires à l'activation

complète d'un LT. Ainsi, les CARs de 2^{ème} et 3^{ème} génération incluant plusieurs domaines de co-stimulation ont été développés (Figure 28) (Ramos and Dotti, 2011; Sadelain et al., 2013).

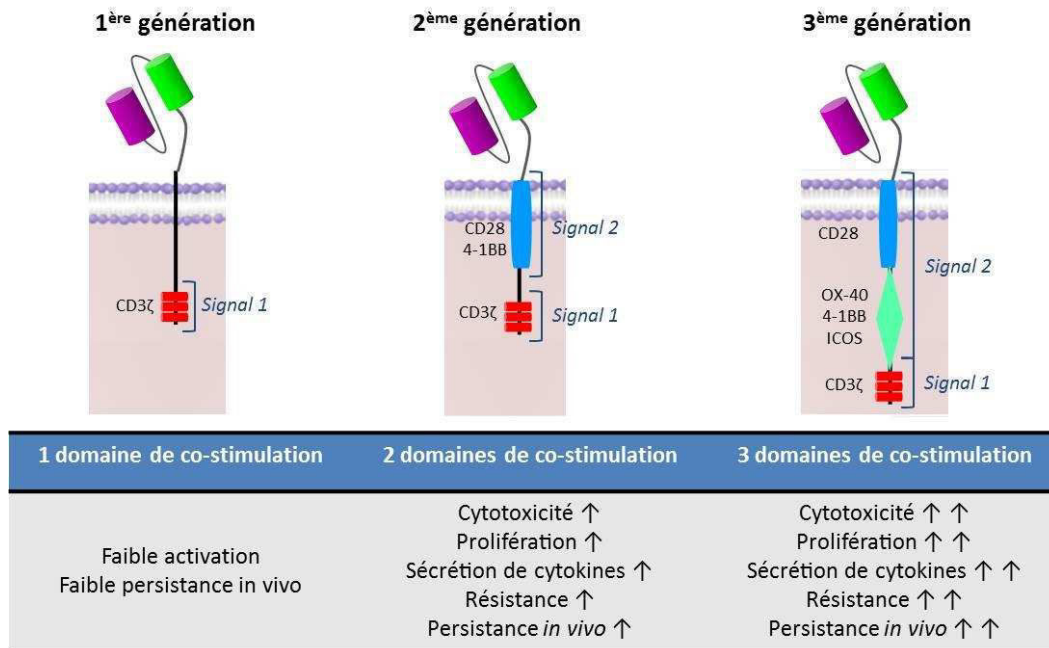


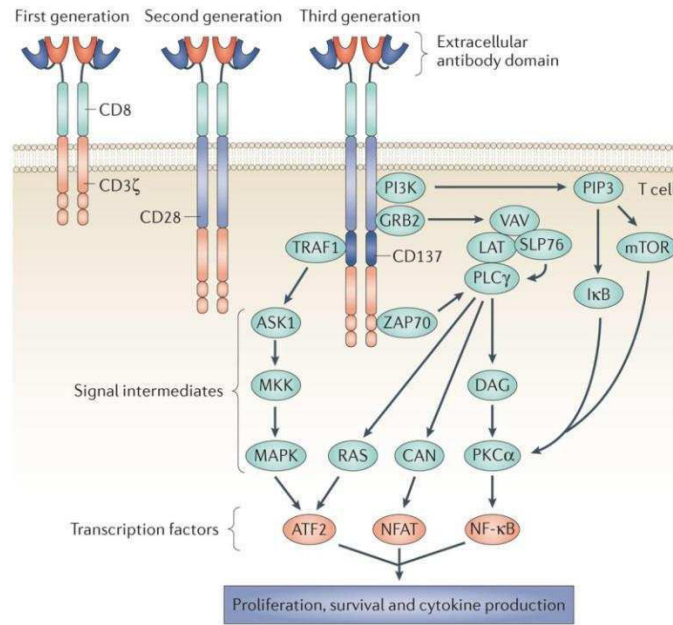
Figure 28 : Les différentes générations de CAR.

Le CD28 joue un rôle précoce dans l'expansion clonale des LT alors que 4.1BB (CD137) joue un rôle plus tardif dans le maintien de la réponse T. Les nouvelles générations de CAR s'appuient sur la synergie entre CD28 et 4.1BB pour prolonger l'activité des PI3K/Akt (Milone et al., 2009). Ces enzymes sont des médiateurs centraux pour la prolifération et la survie médiée par les cytokines.

Avec ces nouvelles générations de CAR, la reconnaissance de l'antigène permet de déclencher le signal 1 et le signal 2 ce qui permet de s'affranchir de la nécessité de liaison à des molécules de co-stimulation et évite l'anergie des LT.

3.1.2. Activation des CAR et transduction du signal

La reconnaissance de l'antigène par le LT CAR conduit à la dimérisation du récepteur. La transmission du signal est ensuite médiée par la phosphorylation de résidus tyrosine des séquences ITAM présentes dans la partie intracellulaire du CAR et au recrutement de molécules adaptatrices comme ZAP70. Cette cascade de phosphorylation et d'activation est à l'origine de signalisations conduisant à l'expression des gènes codant les protéines effectrices de la réponse T-cytotoxique (Figure 29).



Nature Reviews | Cancer

Figure 29 : **Cascade d'activation en conséquence de la reconnaissance de l'antigène et aboutissant aux fonctions effectrices du LT** (Kershaw et al., 2013).

Les CAR de 3^{ème} génération possédant 2 domaines de co-stimulation, tels que CD28 et 4.1BB, vont permettre une meilleure réponse du LT. En effet, ce type de CAR induit l'activation de 2 voies de signalisation : CD28 déclenche l'activité de la PI3K alors que 4.1BB va enclencher la voie de signalisation TRAF (Tumor necrosis family Receptor-Associated Factor) (Tamma et al., 2010).

L'activation du LT CAR+ par sa cible va se traduire par le relargage de molécules cytotoxiques (perforines, granzymes), l'expression de ligands pro-apoptotiques (Fas Ligand, TRAIL) et la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (IFN γ , TNF α). Les cellules tumorales pourront alors être éliminées soit directement par le LT, soit *via* le recrutement d'autres effecteurs de l'immunité dans le microenvironnement tumoral.

3.2. Production des LT CAR en clinique

La production de LT CAR pour la clinique doit répondre à des normes strictes de Bonnes Pratiques de Fabrication (BPF ou GMP *Good Manufacturing Process*) imposées par les communautés nationales et internationales. Un focus sur ces réglementations sera fait dans le chapitre VI. La production de LT génétiquement modifiés est donc réglementée et restreinte à des zones dédiées et contrôlées (salles blanches).

La génération de cellules génétiquement modifiées pour un patient nécessite 9 à 14 jours (Figure 30).

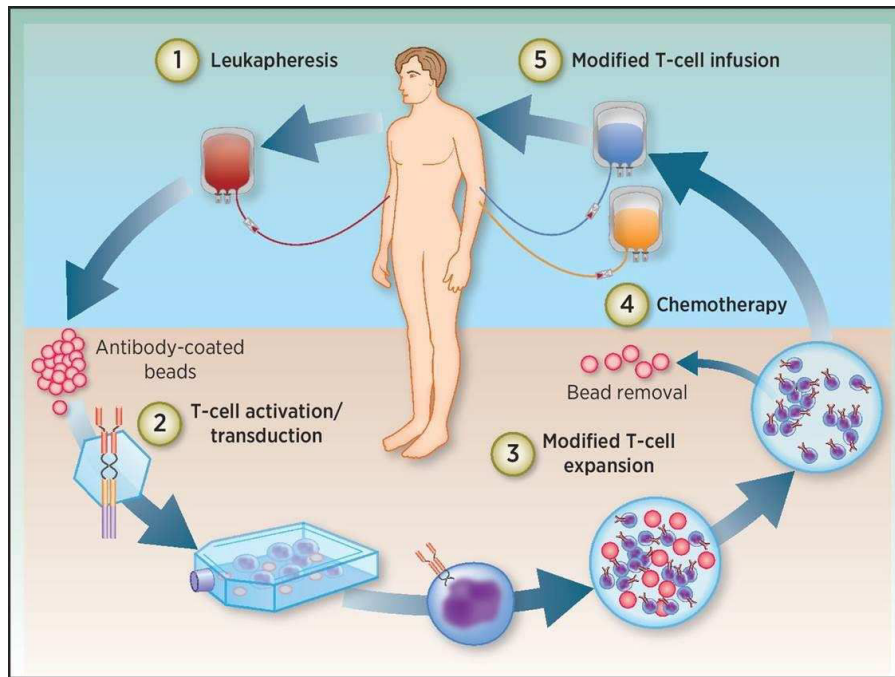


Figure 30 : Production de lymphocytes T génétiquement modifiés par un CAR pour une application clinique (Maus and June, 2016).

Les cellules mononucléées sont isolées à partir d'un prélèvement d'aphérèse du patient. Les LT sont alors stimulés par des agents permettant leur activation, leur division et leur prolifération en présence d'IL-2 pour assurer leur prolifération (Lamers et al., 2006). Différentes méthodes de stimulation sont possibles : certaines utilisent des PBMC irradiées (feeders) alors que les plus récentes utilisent une stimulation par des anticorps monoclonaux CD3 et CD28 qui peuvent ou non être coâtés sur des billes magnétiques (Hami et al., 2004; Riddell et al., 1992). En phase de prolifération, 2 jours après leur activation, les LT sont génétiquement modifiés. Un des moyens de modification des LT est la transduction rétrovirale. Dans ce cas, la poche de culture ou le CliniCell® sont préalablement coâtés avec de la rétronectine, un agent permettant d'améliorer la transduction. La rétronectine est une protéine recombinante qui va permettre de co-localiser les cellules et les particules rétrovirales conduisant à un transfert de gène efficace. Les cellules génétiquement modifiées peuvent ensuite être amplifiées en présence d'IL-2 jusqu'à obtention du nombre souhaité. Dans certains cas, le transgène contient, en plus de la séquence codant le CAR, un gène de sélection qui permettra un tri magnétique des cellules génétiquement modifiées.

3.3. Les antigènes ciblés

Une des caractéristiques des CAR est qu'ils reconnaissent leur cible de façon indépendante du CMH. Cela présente un réel avantage puisqu'un des mécanismes d'échappement des cellules tumorales est la diminution de l'expression du CMH. De plus, les CAR ont la capacité de cibler des antigènes non

protéiques ce qui permet de cibler un large répertoire d'antigènes ce qui est primordial dans le cadre de TAA qui sont fréquemment carbohydratés ou glycolipidiques. L'antigène idéal est exprimé uniquement sur les cellules tumorales afin de limiter la reconnaissance des tissus sains et les effets secondaires.

3.3.1. Applications dans les hémopathies

Les promesses attendues par les CAR ont été mises en évidence avec le succès des CAR anti-CD19 dans les LAL (Leucémie Aigüe Lymphoblastique), LLC (Leucémie Lymphoïde Chronique) et LNH (Lymphome Non-Hodgkiniens), où des rémissions complètes ont été induites chez plusieurs patients résistants à de nombreuses lignes de chimiothérapies (Brentjens et al., 2013; Davila et al., 2014; Grupp et al., 2013; Kochenderfer et al., 2015). La molécule CD19 est une cible intéressante pour le développement d'immunothérapie en onco-hématologie car elle est exprimée dans la plupart des pathologies B malignes et par les LB tout au long de leur différenciation mais pas par les cellules souches hématopoïétiques et les autres tissus (Nadler et al., 1983). Concernant son expression dans les tissus sains, elle est restreinte aux lymphocytes B.

Le premier essai clinique publié utilisait un CAR spécifique de CD19 de deuxième génération (CD28/CD3 ζ) dans le traitement de la LAL chez des patients adultes récidivants (Brentjens et al., 2013). Dans cet essai, les auteurs ont évalué 32 patients et ils ont pu démontrer un taux de réponse de 91% ! De nombreuses études cliniques utilisant des CAR ciblant les pathologies CD19 positives ont ensuite suivi et, bien que chaque essai possède ses critères de recrutement et conditionnement des patients mais aussi concernant la configuration du CAR, des résultats similaires ont été obtenus avec un pourcentage de réponse compris entre 70 et 100% selon les essais (**Tableau II**) (Sadelain, 2015).

Tableau II : Immunothérapies utilisant des CAR CD19 dans le traitement de la LAL.

Patients	Résultats (rémission complète)	Référence
5 adultes	100%	(Brentjens et al., 2013)
2 enfants	100%	(Grupp et al., 2013)
16 adultes	88%	(Davila et al., 2014)
20 enfants	70%	(Lee et al., 2015)
25 enfants	90%	(Maude et al., 2014)
5 adultes	100%	(Maude et al., 2014)

Actuellement, de nouvelles cibles des CAR sont en développement afin de cibler d'autres antigènes des hémopathies B. C'est le cas notamment de CD22 et CD20 qui ont un profil d'expression similaire à CD19. ROR-1 est un antigène qui serait préférentiellement exprimé à la surface des LB tumorigènes

notamment dans les LAL et les LLC (Zhang et al., 2012). Cependant, des études ont montrées une expression de ROR-1 dans les cellules du pancréas et du poumon (Al-Shawi et al., 2001; Hudecek et al., 2010). Bien que controversé, des CAR dirigés contre cet antigène sont actuellement en évaluation clinique (NCT02194374, NCT00881920). Enfin, les antigènes CD30 pour les lymphomes Hodgkiniens, BCMA et CD138 pour les maladies malignes du plasma ou encore CD33 et CD123 dans les pathologies myéloïdes apparaissent également comme des cibles potentielles pour le développement de CAR.

3.3.2. Applications dans les tumeurs solides

Initialement, les tumeurs solides ont été les premières cibles des CAR. Cependant, les résultats obtenus n'ont pas été aussi encourageants que ceux obtenus dans les cancers hématologiques. En effet, les CAR utilisés étaient des CAR de 1^{ère} génération ce qui limitait la persistance et l'activation des LT génétiquement modifiés. L'arrivée des CAR de 2 et 3^{ème} génération a permis de mettre en place de nombreuses études afin de développer l'utilisation des CAR dans les tumeurs solides (Figure 31).

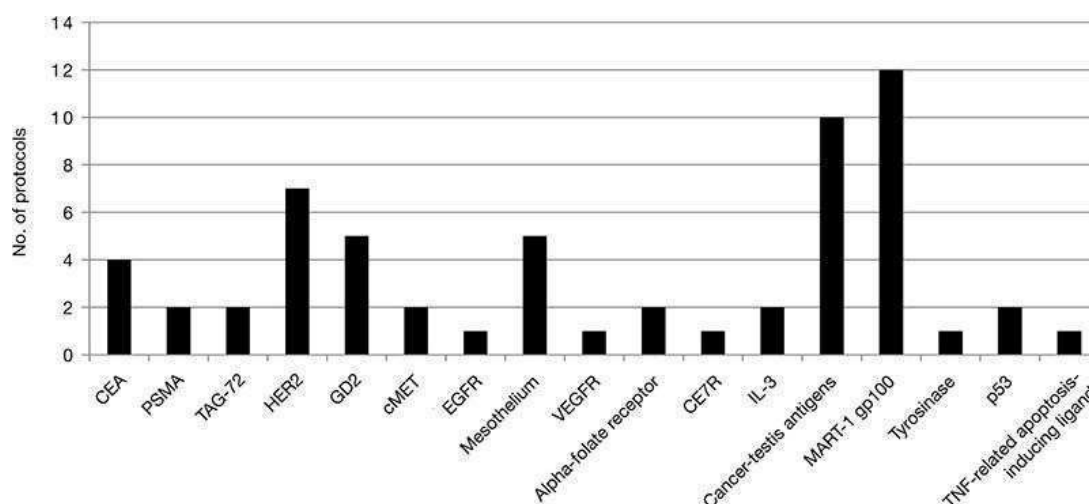


Figure 31 : Développement de protocoles cliniques utilisant des lymphocytes T génétiquement modifiés avec CAR ciblant un antigène de tumeur solide (Corrigan-Curay et al., 2014).

La première étape du développement de ce type de CAR a tout d'abord consisté à identifier les cibles potentielles puis à développer un modèle clinique pertinent. Contrairement aux pathologies hématologiques qui sont classées sur la base de l'expression des marqueurs de surface, les cancers solides sont habituellement caractérisés par des marqueurs histologiques, immuno-histologiques et anatomiques qui ne distinguent pas forcément les éléments membranaires des éléments intracellulaires.

Au cours de cette thèse, nous nous sommes particulièrement intéressés au ciblage de EGFRvIII (*Epithelial Growth Factor Receptor variant III*). C'est un antigène spécifique des tumeurs surexprimé dans différents cancers épithéliaux et qui n'est pas exprimé par les tissus sains (Heimberger et al.,

2005). EGFRvIII est exprimé dans 25 à 64% des glioblastomes (Gan et al., 2013). Le glioblastome est la tumeur du système nerveux central la plus fréquente et la plus agressive (grade IV). Elle a une incidence de 7,2 personnes atteintes pour 100 000 et la médiane de survie est estimée à moins de deux ans. Ce variant membranaire du récepteur de croissance à l'EGF a perdu les exons 2 à 7 ce qui entraîne la perte du domaine de liaison à l'EGF rendant le variant III constitutivement actif (Gan et al., 2013). Ces propriétés en font une cible intéressante et plusieurs CAR sont actuellement en développement (Johnson et al., 2015; Miao et al., 2014; Morgan et al., 2012; Sampson et al., 2014). Deux essais cliniques sont actuellement ouverts pour évaluer le ciblage de EGFRvIII par les CAR (NCT02209376 et NCT01454596) (Gill et al., 2015).

3.3.3. Les effets secondaires

L'utilisation des CAR n'est cependant pas sans risques : la majorité des cibles des CAR sont surexprimées par les cellules tumorales mais aussi, faiblement exprimées par les tissus sains. Les LT génétiquement modifiés pour exprimer un CAR sont donc aussi capables de reconnaître et de s'attaquer aux tissus sains : c'est l'effet « *on-target, off tumor toxicity* ». Les CAR-CD19 entraînent, par exemple, une aplasie des LB. Cet effet est connu des cliniciens et traitable mais ce n'est pas toujours le cas : l'utilisation de CAR-ErbB2 a entraîné la mort rapide d'une patiente suite à la reconnaissance de l'antigène au niveau des poumons et du cœur (Morgan et al., 2010).

D'autres effets indésirables graves imputables directement à l'activité cytotoxique des LT exprimant le CAR ont pu être identifiés : le syndrome de libération massive de cytokines (CRS, *Cytokine Release Syndrome*) et le syndrome de lyse tumorale (TLS, *Tumor Lysis Syndrome*).

Le CRS est la conséquence de la forte production de cytokines pro-inflammatoires par les LT hyper-activés provoquant un orage cytokinique qui peut entraîner la mort. La gravité du CRS semble en corrélation avec la charge tumorale et a aussi été corrélée à l'intensité de la réponse T anti-tumorale (Davila et al., 2014; Kochenderfer et al., 2012). La sévérité du CRS va de pair avec des taux sériques élevés d'IFN γ et d'IL-6. L'IL-6, le TNF α , l'IFN γ sont relargués par les cellules tumorales mourantes mais aussi par les macrophages recrutés lors de la lyse tumorale. En effet, un syndrome d'activation macrophagique est associé au CRS. L'utilisation du tocilizumab, un anti-IL-6R, peut permettre de remédier à ce syndrome (Davila et al., 2014; Grupp et al., 2013; Kochenderfer et al., 2015).

Le TLS est le relargage de métabolites lors de la lyse de cellules tumorales. Il se distingue du CRS en apparaissant plus tardivement.

Ainsi, le besoin d'associer des gènes suicides ou de développer des stratégies de contrôle de l'activation des CAR est réel au vue de la toxicité que peuvent entraîner l'utilisation de CAR et afin de pouvoir contrôler en temps réel l'action de ces cellules, et par conséquent augmenter la sécurité de

l'immunothérapie. Le besoin d'associer un « gène suicide » s'est imposé afin de déclencher la mort des LT génétiquement modifiés s'ils devaient entraîner un effet toxique grave pour le patient.

Chapitre 3 : Sécurisation des thérapies cellulaires

1. Développement des stratégies de sécurisation

1.1. L'allogreffe

1.1.1. Définition

La greffe allogénique de cellules souches hématopoïétiques (HSCT) également appelée allogreffe (allo-CSH) a acquis une place essentielle en onco-hématologie. Elle permet de guérir certaines hémopathies malignes ou non malignes de la moelle osseuse et du système immunitaire en remplaçant une moelle osseuse défaillante par des cellules viables et fonctionnelles. L'allogreffe a considérablement amélioré le pronostic des leucémies aiguës, lymphoïdes et myéloïdes, qui représentent actuellement environ 50% des indications. Les autres indications sont les hémopathies lymphoïdes et myéloïdes chroniques, mais aussi les aplasies médullaires et les déficits immunitaires combinés sévères. Près de 20000 allo-CSH sont réalisées chaque année dans le monde. Aujourd'hui, la greffe allogénique de cellules souches hématopoïétiques est une des approches d'immunothérapie adoptive la plus développée (Tsirigotis et al., 2014).

L'allogreffe nécessite un conditionnement du receveur à base de chimiothérapie associée ou non à de la radiothérapie afin de libérer des niches hématopoïétiques pour l'implantation du greffon, de détruire le système immunitaire du receveur pour prévenir le rejet et de détruire la maladie résiduelle dans le cadre d'hémopathies malignes. Le conditionnement myéloablatif requiert des doses ablatives de chimiothérapie et une irradiation corporelle totale afin d'éradiquer les cellules tumorales et d'induire une immunosuppression pour permettre la prise de greffe. Cependant, ce conditionnement induit une forte toxicité, c'est pourquoi le conditionnement non myéloablatif a été développé. Le conditionnement non myéloablatif est plus faible en intensité afin de réduire la toxicité et la durée de l'aplasie. Après conditionnement, les cellules souches hématopoïétiques du donneur sont injectées au patient par voie intraveineuse. Elles migreront par la suite de façon spontanée vers la moelle osseuse.

Les greffons de cellules souches hématopoïétiques allogéniques peuvent avoir différentes origines : la moelle osseuse, les cellules souches périphériques ou le sang placentaire. La moelle osseuse, première technique historiquement décrite, est prélevée par ponction directe au niveau de la crête iliaque. Un greffon hématopoïétique contient des cellules souches totipotentes mais aussi des cellules T immunocompétentes qui assurent l'effet « Graft *versus* Leukemia » (GvL) ou « Graft *versus* Tumor » (GvT) en reconnaissant et détruisant les cellules malignes résiduelles du receveur.

1.1.2. La GvHD

La maladie du greffon contre l'hôte (GvHD, *Graft versus Host Disease*) est une complication majeure de l'allogreffe. Dès 1955, Mitchison a mis en évidence le rôle du transfert adoptif de lymphocytes T dans le rejet de tumeurs allogreffées chez la souris (Mitchison, 1955). En effet, les cellules T immunocompétentes présentes dans le greffon hématopoïétique sont susceptibles de reconnaître l'hôte comme étranger et de déclencher la GvHD. Cette complication est observée dans 40 à 60% des cas post-allogreffe et est responsable de 10 à 50% de mortalité (Baker and Fraser, 2008; Pasquini et al., 2010).

C'est une réaction immunitaire médiée par les lymphocytes alloréactifs contre les organes et les tissus sains du receveur. L'apparition de la GvHD est un processus multi-étapes favorisé par le contexte inflammatoire dû au conditionnement pré-greffe et caractérisé par une activation des APC, une activation, prolifération et différenciation des LT allogéniques qui vont pouvoir migrer vers les tissus cibles de la GvHD (peau, intestin, foie) provoquant ainsi d'importants dommages (Ferrara et al., 2009).

D'un point de vue clinique, on distingue 2 formes de GvHD : la GvHD aiguë qui apparaît dans les 100 premiers jours et la GvHD chronique qui survient plus tardivement. Différents processus pathologiques sont impliqués dans ces deux formes de GvHD. En effet, la forme aiguë reflète un mécanisme inflammatoire exacerbé des cellules du donneur contre les tissus du receveur (peau, tractus gastro-intestinal, foie) alors que la forme chronique est caractérisée par des mécanismes auto-immuns.

1.2. Rationnel de la sécurisation des thérapies cellulaires

Les gènes suicides ont, dans un premier temps, été développés dans le but d'être introduits dans les cellules cancéreuses afin d'induire leur mort de façon ciblée en réponse à un traitement spécifique (Figure 32).

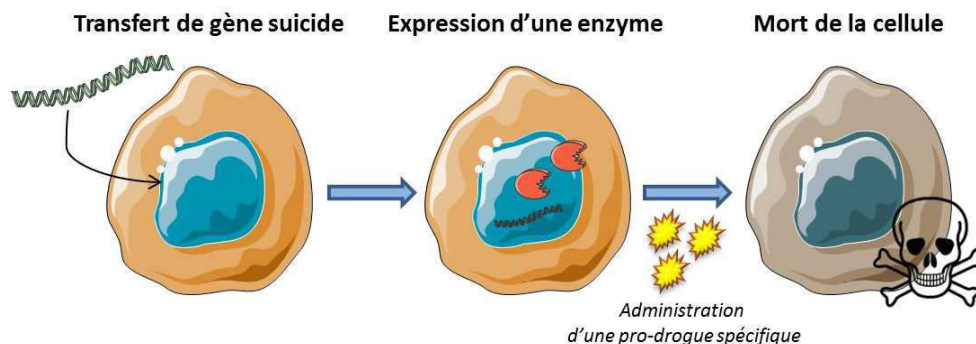


Figure 32 : Principe général d'un gène suicide.

Ce concept a par la suite été utilisé pour détruire des cellules après transfusion chez le patient. En effet, la thérapie génique n'est pas sans risque. Comme nous l'avons vu précédemment, les LT du donneur peuvent être responsables de la GvHD et l'administration de Cellules Génétiquement Modifiées (CGM) dans le cadre de thérapies adoptives utilisant des CAR ou des TCRtg peut également entraîner de graves complications (Copelan, 2006; Tey, 2014). Ainsi, l'introduction d'un gène suicide dans les LT d'un donneur dans le cadre d'une allogreffe permet de conserver les effets bénéfiques de ces LT allogéniques (GvL et GvT) mais également d'éliminer ces cellules dans le cadre d'effets délétères tels que la GvHD. La preuve de concept de l'utilisation d'un gène suicide exprimé par les LT dans le cadre de l'allogreffe a été faite pour la première fois en 1994 (Tiberghien et al., 1994).

Les stratégies de sécurisation peuvent être également utilisées dans le cadre des iPSc (induced Pluripotent Stem cells). L'utilisation et le développement des iPSc est une thérapie régénératrice prometteuse qui présente tout de même un risque de transformation oncogénique avec la formation de tératome. L'introduction d'un gène suicide dans les iPSc pourrait permettre de les éliminer. De plus, certains systèmes nécessitent que la cellule soit en division. Ceux-ci pourraient donc induire préférentiellement l'élimination des cellules du tératome dont l'activité mitotique est importante.

2. Développement de systèmes suicides

Le système suicide idéal doit permettre la déplétion d'une population de cellules génétiquement modifiées en cas de survenue d'effets indésirables. Il répond aux critères suivants : faible immunogénicité (transgènes d'origine humaine), déplétion rapide (engagement en quelques heures), sélection des CGM par expression d'un marqueur de surface non fonctionnel (permettant un tri immuno-magnétique pour limiter la durée de culture *ex-vivo*), drogue de susceptibilité spécifique (n'interférant pas avec d'autres traitement) et agissant de façon indépendante du cycle cellulaire (permettant de cibler les cellules quiescentes) (Bonini et al., 2007).

2.1. Des systèmes suicides en cours de développement

À ce jour, de nombreux systèmes suicides ont été développés utilisant des enzymes, des molécules pro-apoptotiques ou encore des protéines cibles d'anticorps monoclonaux. Plusieurs d'entre eux ont été validés en clinique.

2.1.1. Les systèmes utilisant des enzymes

Différents systèmes utilisant des couples enzymes/pro-drogues ont été développés pour l'induction conditionnelle de l'apoptose. Cette stratégie consiste à introduire un gène codant une enzyme exogène

capable de convertir une pro-drogue non toxique en un métabolite toxique. Plusieurs systèmes ont été identifiés. Ainsi, on peut citer le système utilisant la pro-drogue non toxique 5-fluorocytosine (5-FC) qui peut être convertie en 5-fluorouracile (5-FU) par une enzyme bactérienne ou de levure: la cytosine deaminase (YCD)(Longley et al., 2003). Il existe également le système utilisant le cytochrome P450 pour transformer le cyclophosphamide en un métabolite actif : le 4-hydroxycyclophosphamide qui après une série de réactions chimiques conduit à la formation d'acroléine qui se lie à l'ADN et entraîne la mort de la cellule lors de la division suivante (Wei et al., 1994). Cette propriété est intéressante car elle ne nécessite pas que la cellule soit en division au moment du traitement. On peut encore citer le système Thymidilate MonoPhosphatase Kinase/Zidovudine (TMPK/AZT) (Ostermann et al., 2000). Ces différents systèmes, après introduction dans les cellules cancéreuses, pourraient favoriser leur élimination en les rendant plus sensibles.

Plus récemment, un système utilisant la désoxycytidine kinase (dCK) a été développé. La dCK humaine phosphoryle les déoxynuléosides mais aussi leurs analogues utilisés comme agents antiviraux ou anticancéreux (Cytarabine, Gemcitabine). L'identification du mutant M36 de la dCK ouvre de nouvelles perspectives pour son utilisation en clinique. En effet, la mutation M36 augmente considérablement l'affinité de l'enzyme notamment pour la Gemcitabine (Coulibaly et al., 2015; Sabini et al., 2003). Ce système, en ciblant les cellules en division, pourrait être intéressant pour la sécurisation des iPSc.

2.1.2. Le système iFas

Le système iFas utilise la molécule pro-apoptotique Fas (CD95) fusionnée au domaine FKBP12 (Spencer et al., 1993). La protéine chimérique obtenue est alors inductible par un agent de dimérisation (CID, *Chemical Inducer of Dimerization*, AP1903). L'AP1903 est une molécule synthétique de la société Bellicum Pharmaceuticals sans effet sur les volontaires sains (Iulucci et al., 2001). L'AP1903 va permettre la dimérisation de Fas conduisant à son activation et au déclenchement de la cascade des caspases et de la mort cellulaire. L'équipe de Tim Clackson a montré que ce système est capable d'être exprimé de façon stable par les LT transduits permettant ainsi une bonne efficacité d'élimination des cellules (Thomis et al., 2001). Ce système a toutefois montré ses limites : en effet, la protéine Fas est la cible de nombreuses molécules anti-apoptotiques telles que Bcl-2 ou Bcl-XL souvent surexprimées lors de la transformation maligne (Straathof et al., 2005).

2.1.3. Le système CD20/Rituximab

Un système utilisant la molécule CD20 à la fois comme gène de sélection et comme gène suicide a été proposé (Introna et al., 2000; Serafini et al., 2004). L'expression de la molécule CD20 est restreinte à la membrane des lymphocytes B et non au LT. La transduction de LT par ce système va permettre une

sélection des CGM par tri immuno-magnétique ce qui présente l'avantage de réduire le temps de culture *ex-vivo* et de sélection qui est délétère pour la fonctionnalité des LT. La molécule CD20 est la cible de différents anticorps monoclonaux dont l'utilisation est validée en clinique dans les hémopathies B. C'est le cas du Rituximab qui est actif sur toutes les cellules exprimant CD20 même si celles-ci ne sont pas en division. La reconnaissance de la molécule CD20 par le Rituximab induit une cytotoxicité dépendante du complément, et donc une mort cellulaire rapide et efficace (Griffioen et al., 2009).

Cependant, bien que ce système paraisse séduisant, il a très peu été évalué en clinique. En effet, il présente tout de même quelques inconvénients. L'utilisation du Rituximab va permettre l'élimination des CGM mais aussi de tous les LB expriment la molécule CD20, ce qui va conduire à une immunodéficience accrue de l'hôte bien que les cliniciens soient en mesure de gérer l'aplasie B. La molécule CD20 est aussi une molécule peu stable qui peut s'internaliser rendant la cellule insensible au traitement. De plus, notre équipe a montré qu'il existe des épissages alternatifs du gène *cd20* qui pourraient être associés à une résistance au Rituximab (Gamonet et al., 2015; Henry et al., 2010).

2.1.4. Le système EGFR/Cetuximab

Sur le même modèle que le système CD20/Rituximab, le système EGFR/Cetuximab a été décrit en 2011 (Wang et al., 2011). Pour cela, une forme tronquée de la protéine humaine EGFR (Epidermal Growth Factor) a été développée : huEGFRt. EGFR est un récepteur aux facteurs de croissance à activité tyrosine kinase. Cette protéine est la cible de l'anticorps monoclonal Cetuximab validé pour son utilisation en clinique dans le traitement des cancers de la tête et du cou et les cancers colorectaux, (Li et al., 2005). La forme huEGFRt est dépourvue des zones de fixation aux ligands en N-terminal et du domaine de transduction du signal intracellulaire (**Figure 33**). En revanche, le domaine III reconnu par le Cetuximab a été conservé.

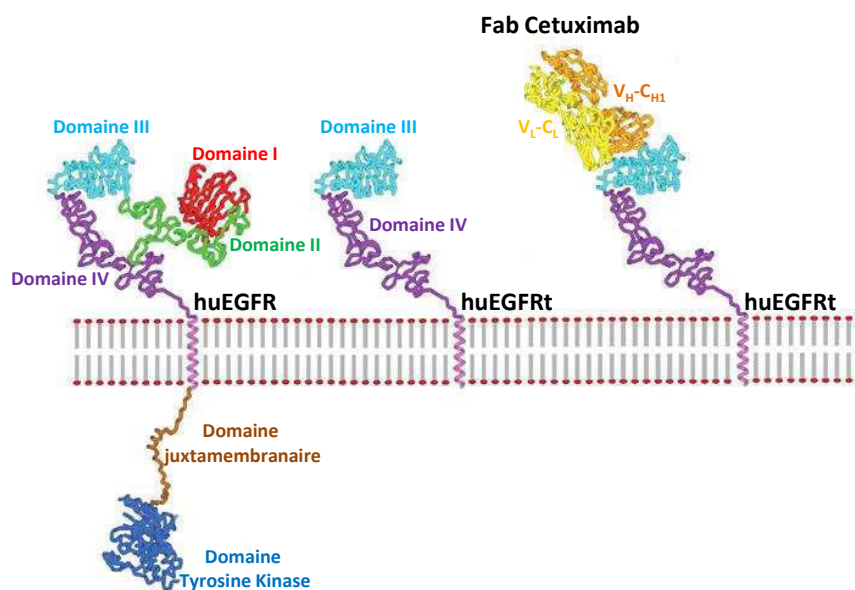


Figure 33 : Modélisation de la protéine humaine EGFR (huEGFR) en comparaison avec la protéine tronquée huEGFRt qui a conservé son domaine de liaison au Cetuximab. D'après Wang et al., 2011.

La protéine huEGFR n'est normalement pas exprimée par les cellules hématopoïétiques et particulièrement les LT. Après transduction, les LT qui expriment huEGFRt sont donc sélectionnés efficacement grâce à l'utilisation de Cetuximab-biotinylé et de billes immuno-magnétiques anti-biotine de grade GMP (Good Manufacturing Practice). De plus, ce marqueur huEGFRt permet un suivi *in vivo* des LT et bien évidemment leur élimination par traitement au Cetuximab. Le Cetuximab entraîne la mort des cellules *via* le mécanisme de cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps (ADCC).

Contrairement au système CD20/Rituximab, l'utilisation de ce système présente l'avantage de ne pas dépléter les LB. Des modèles pré-cliniques ont montré que le Cetuximab pouvait éliminer les CGM, cependant, il reste à évaluer l'immunogénicité liée à la modification de la partie extracellulaire pouvant découvrir des peptides potentiellement immunogènes. Différents essais cliniques visant à tester ce système pour sécuriser des constructions CAR sont actuellement en phase de recrutement de patients (NCT02051257, NCT02311621, NCT02146924, NCT02028455).

2.2. Le système HSV-tk/Ganciclovir

Le système de gène suicide utilisant la thymidine kinase du virus Herpès Simplex (HSV-tk) a été très largement utilisé dans les études cliniques (Greco et al., 2015). Grâce à ce système, les cellules génétiquement modifiées avec ce gène peuvent être éliminées spécifiquement par ajout de ganciclovir (GCV). Le GCV est un analogue de la thymidine dont la phosphorylation par l'enzyme HSV-tk produit un métabolite toxique pour la cellule (Figure 34). En effet, le ganciclovir tri-phosphate s'intègre à l'ADN et inhibe sa synthèse conduisant à la mort de la cellule (Springer and Niculescu-Duvaz, 2000).

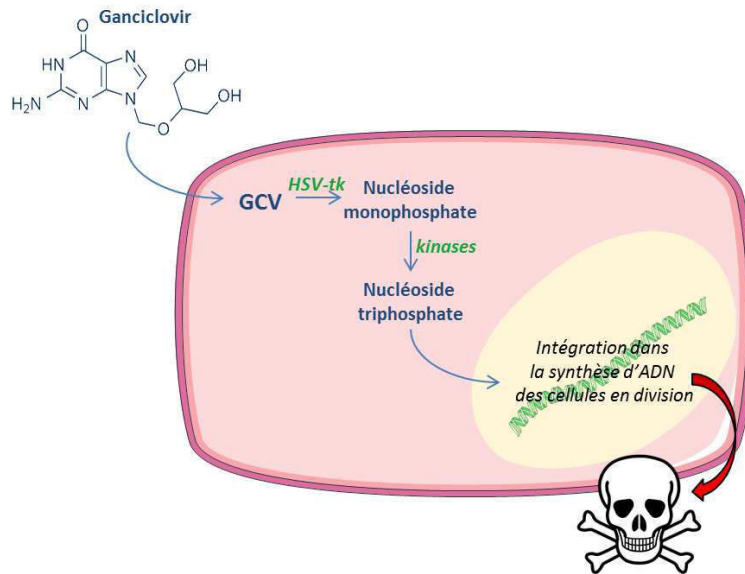


Figure 34 : Le système suicide HSV-tk

Ce système a été évalué dans de nombreuses études cliniques couvrant près de 150 patients après greffe de CSH dans un contexte allogénique ou haploidentique (Bonini et al., 1997; Burt et al., 2003; Ciceri et al., 2007; Ciceri et al., 2009; Fehse et al., 2004; Munshi et al., 1997; Tiberghien et al., 2001). Les résultats de ces études ont montré que la GvHD pouvait être efficacement traitée par cette méthode : seules les cellules génétiquement modifiées sont capables de convertir le GCV en son analogue toxique ; ce sont uniquement les cellules en prolifération qui sont sensibles au GCV ; l'injection de GCV permet l'élimination des LT transduits en division et un contrôle des signes de GvHD.

Cependant, ce système a montré ses limites. Tout d'abord, la réactivation du cytomégalovirus (CMV) qui apparaît lors de l'allogreffe, est traitée par GCV et dans ce cas, les CGM seront éliminées rapidement indépendamment du besoin de traiter la GvHD. Des LT peuvent également être résistants au traitement par GCV, ceci suite à l'apparition d'une forme épissée non fonctionnelle du gène *HSV-tk* (Garin et al., 2001). En effet, la caractérisation des événements moléculaires conduisant à cette résistance a révélé une délétion de 227 pb dans le gène *HSV-tk* due à la présence de sites cryptiques d'épissage. La forme épissée du gène *HSV-tk* a d'ailleurs pu être identifiée chez tous les patients immédiatement après l'injection et au cours du suivi post-transplantation des patients. Chalmers et al., ont proposé une correction de cet épissage par mutagenèse des sites donneurs et accepteurs afin d'empêcher cet épissage (Chalmers et al., 2001). Ainsi, la protéine HSV-tk n'est plus altérée et la sensibilité des cellules cibles au GCV est préservée. De plus, lorsque les patients ont retrouvé une immunocompétence après greffe, des réponses immunes contre les LT exprimant HSV-tk ont été observées (Mercier-Letondal et al., 2008; Sauce et al., 2002). Des altérations phénotypiques et fonctionnelles des CGM pourraient avoir des conséquences en clinique notamment au niveau de l'immunogénicité des cellules. Des réponses immunes contre les CGM ont été mises en évidence et la

protéine HSV-tk est la cible majeure de ces réponses (Mercier-Letondal et al., 2008). Ces réponses contribueraient à une diminution prématurée du nombre de CGM circulantes et par conséquent un effet GvL réduit. Enfin le GCV cible uniquement les cellules en cours de division, et l'élimination des CGM nécessite plusieurs jours (3 à 4 jours minimum).

2.3. Le système iCaspase-9/AP1903

2.3.1. Principe

Un système suicide basé sur l'expression d'une Caspase-9 inductible (iCaspase-9) a été développé par l'équipe du Pr Malcolm Brenner à Houston (Di Stasi et al., 2011; Tey et al., 2007). La Caspase-9 joue un rôle central dans l'activation de l'apoptose par la voie intrinsèque de la mitochondrie. Le système iCaspase-9/ Δ CD19 est composé de la molécule de Caspase-9 humaine dans laquelle le domaine d'activation CARD (Caspase Activator recruitment Domain) a été remplacé par un domaine FKBP12-F36V ce qui confère une sensibilité à l'agent de dimérisation CID ou AP1903 (**Figure 35**) (Clackson et al., 1998; Spencer et al., 1993). La mutation F36V permet d'augmenter la sensibilité à l'AP1903.

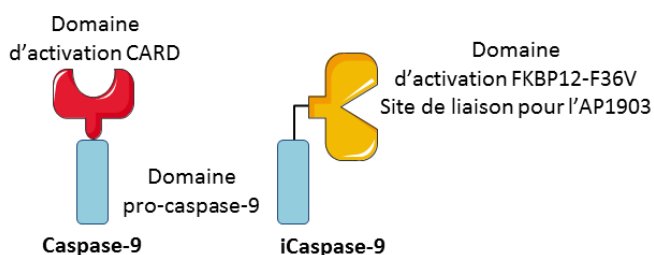


Figure 35 : **Comparaison de la Caspase-9 endogène avec la iCaspase-9.**

Ainsi, le traitement des CGM avec l'AP1903 va permettre la dimérisation de la iCaspase-9 entraînant l'activation de la cascade des caspases 3, 6 et 7 et aboutissant à l'apoptose. Ce système permet de s'affranchir de la modulation par les molécules anti-apoptotiques de type Bcl-2, Bcl-XL ce qui permet une mort cellulaire efficace déclenchée dans les 30 min suivant l'exposition à l'AP1903 (**Figure 36**).

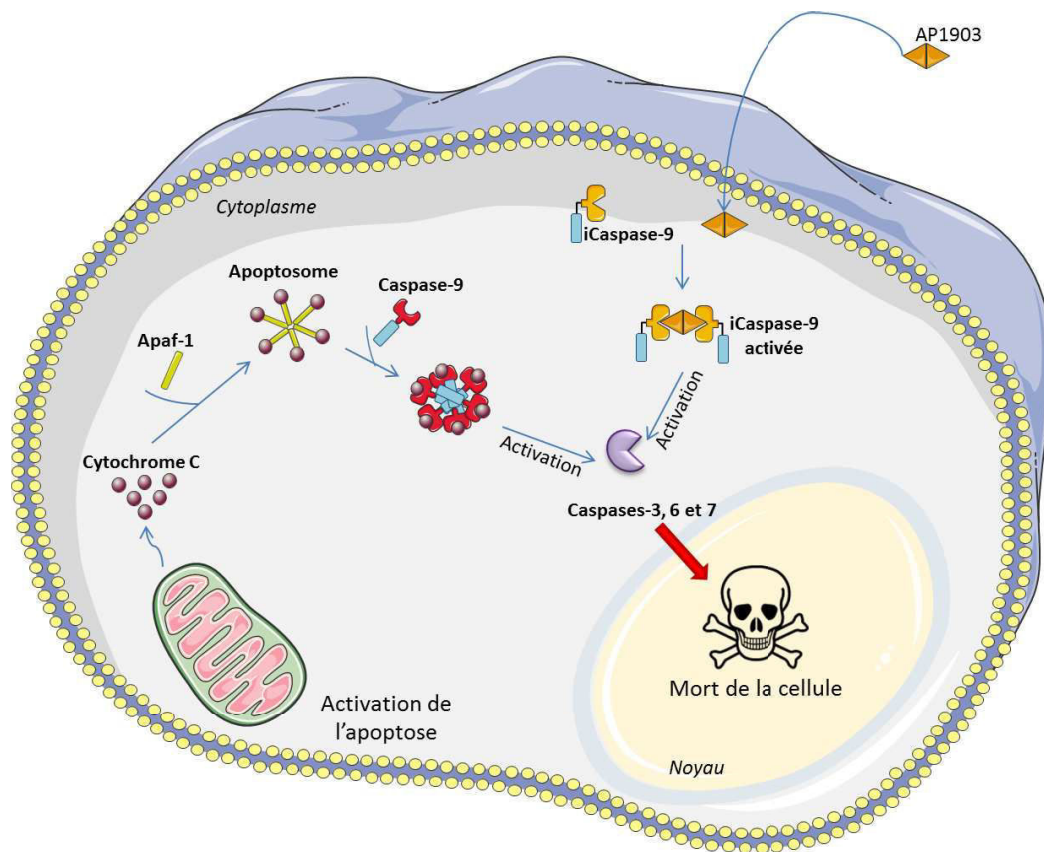


Figure 36 : **Rôles de la Caspase-9 endogène et de la iCaspase-9.**

La caspase-9 endogène intervient dans la voie d'activation mitochondriale de l'apoptose. L'activation de la iCaspase-9 s'affranchit de la voie mitochondriale et aboutit à l'activation directe des caspases effectrices 3, 6 et 7.

Dans ce système, le transgène iCasp9 est co-exprimé avec un gène codant la molécule CD19 tronquée dans sa partie intracytoplasmique (Δ CD19) ce qui permet une sélection immuno-magnétique des cellules transduites.

2.3.2. Utilisation en clinique

Le système suicide iCasp9/AP1903 et gène de sélection Δ CD19 ont été utilisés dans le cadre de l'étude clinique CASPALLO, une phase I qui a consisté à évaluer ce système suicide après transduction de LT allodéplétés après greffe de cellules souches haploidentiques (Di Stasi et al., 2011; Zhou et al., 2014). Des LT transduits avec cette construction ont été administrés à dix patients pédiatriques en rechute de leucémie suite à une greffe de CSH. Le transfert de T n'a pas montré de toxicité mais 4 patients ont développé une GvHD avec des signes cliniques au niveau de la peau et du foie. Ces patients ont reçu une dose unique d'AP1903 (0,4 mg/kg) qui a permis l'élimination de plus de 90% des CGM en 30 minutes, mettant ainsi rapidement fin à la GvHD (Figure 37).

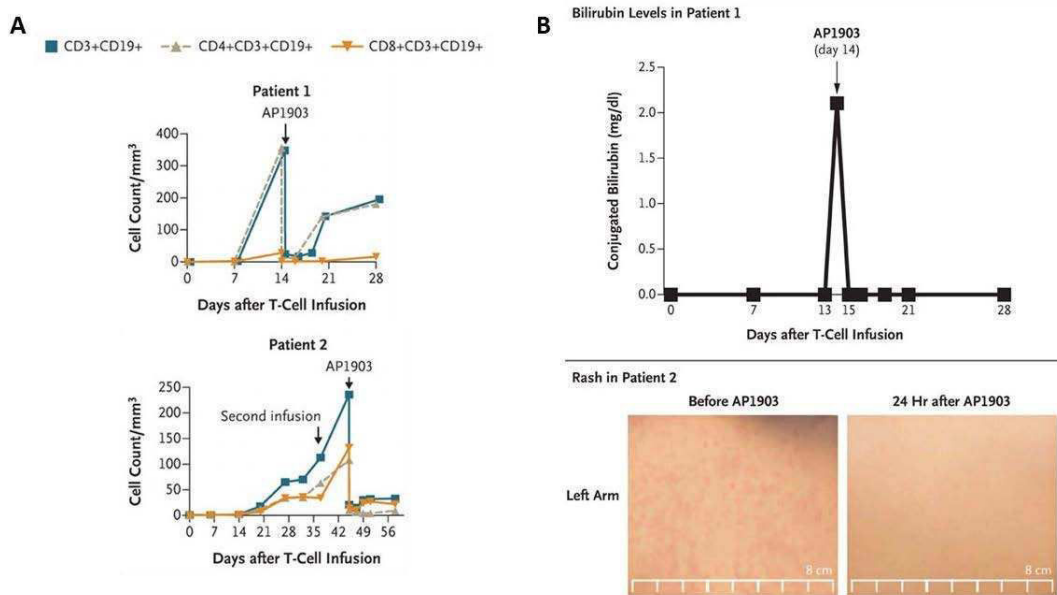


Figure 37 : *Suivi des patients ayant développés une GvHD et ayant été traités avec l'AP1903 dans l'essai CASPALLO.*

A : *suivi des cellules génétiquement modifiées (CD3/CD19+) par cytométrie en flux, B : disparition rapide des signes cliniques de la GvHD (Di Stasi et al., 2011).*

Le système iCaspase-9/ Δ CD19 devrait être prochainement évalué par notre équipe dans le cadre de l'étude clinique *Side by Side : Suicide T cell gene therapy by using a Chemical Inducer of Dimerization of iCaspase-9*. Cette étude sera présentée dans le chapitre suivant.

3. Contrôle spatio-temporel de l'activation des récepteurs chimériques

Des stratégies qui contrôlent la durée, le lieu et le moment de l'activité du récepteur type CAR ou TCRtg pourraient également contribuer à l'amélioration de la sécurité de la thérapie cellulaire. Ces systèmes permettent principalement de limiter les effets indésirables sur les tissus sains.

L'utilisation des techniques d'électroporation d'ARN pour modifier les LT permet, par exemple, de limiter la durée d'expression du transgène. En effet, l'ARN ne s'intégrant pas au génome, en cas de toxicité l'expression s'éteindra spontanément en quelques jours (Zhao et al., 2010).

Dans le but de contrôler l'activation des récepteurs de type CAR et pour limiter l'effet « on-target, off tumor toxicity », différentes stratégies ont été développées. La première stratégie « Logic-gated CARs » consiste à contrôler l'activation du CAR en le modifiant dans sa configuration. Il s'agit de séparer le récepteur en 2 parties. Chaque partie reconnaît un antigène différent mais les 2 parties prises de façon

indépendante ne sont pas suffisantes pour induire à elle seule l'activation du LT. Le LT est, dans ce cas, co-transduit avec un CAR qui permet une activation sub-optimale lors de la reconnaissance de l'antigène et un récepteur chimérique de co-stimulation qui reconnaît un second antigène (**Figure 38**).

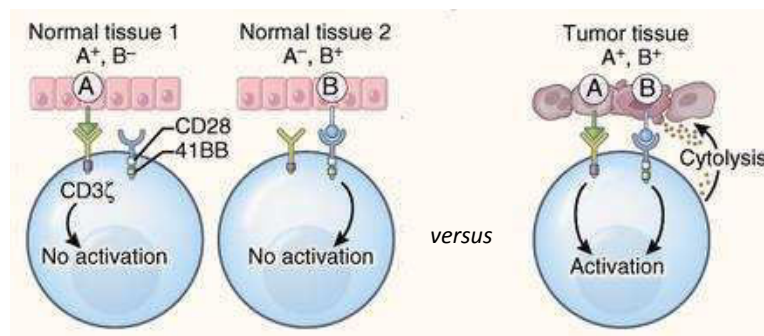


Figure 38 : La technique « Logic-gated CARs » consiste à dissocier les molécules de co-stimulation (Klebanoff et al., 2016)

Le LT doit reconnaître les 2 antigènes cibles pour s'activer complètement. Cette approche a été décrite dans un modèle murin de tumeur PSMA+, CD19+ ou PSMA/CD19 par l'équipe du Pr Sadelain (Kloss et al., 2013).

Une autre stratégie développée aussi par cette équipe consiste à combiner un CAR avec une molécule inhibitrice : les iCAR (inhibitory Chimeric Antigen Receptor) (Fedorov et al., 2013). Le CAR est spécifique d'un antigène tumoral alors que le iCAR est constitué d'un scFV spécifique d'un antigène du tissu sain fusionné au domaine de signalisation d'un récepteur inhibiteur tel que CTLA-4 ou PD-1. Ainsi, si le LT rencontre uniquement l'antigène tumoral, il va s'activer, proliférer et sécréter des cytokines aboutissant à la mort de la cellule cible. En revanche, si la cellule co-exprime l'antigène reconnu par le CAR et l'antigène reconnu par le iCAR, les 2 récepteurs vont alors s'activer. L'activation du domaine inhibiteur du iCAR va permettre de limiter la sécrétion de cytokines, la cytotoxicité et la prolifération du LT. Cette auto-régulation temporaire permet donc de limiter les effets indésirables (**Figure 39**).

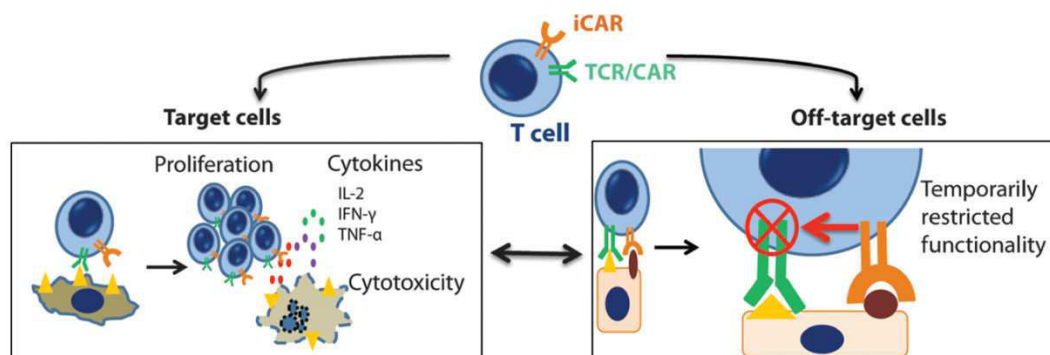


Figure 39 : La stratégie iCAR.

Le LT pourra être activé uniquement si seul son TCR ou son CAR reconnaît la cible. Si le iCAR lui aussi exprimé à la surface du LT est activé par reconnaissance de son antigène, cela inhibera l'activation du LT pour limiter les effets off-target (Fedorov et al., 2013).

Dans le but de limiter les effets indésirables contre les tissus sains, un système de CAR inductibles a également été développé (Wu et al., 2015). L'activation du CAR ne requiert alors par seulement la reconnaissance de l'antigène mais aussi une petite molécule synthétique qui va permettre de faire la jonction, par dimérisation, entre domaine de reconnaissance et domaine de transduction du signal (**Figure 40**). Cette stratégie est particulièrement intéressante pour contrôler le lieu d'activation du LT génétiquement modifié. En effet, la molécule synthétique peut être injectée de façon locale au niveau du tissu cible.

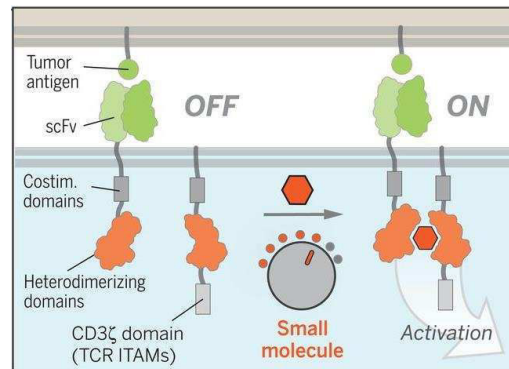


Figure 40 : **Contrôle de l'activation des CAR par un système inductible : ON-switch CAR** (Wu et al., 2015).

Enfin, les CAR masqués « Masked CAR » peuvent également permettre de contrôler la zone d'activation. Dans ce cas, le domaine de reconnaissance de l'antigène est masqué par un substrat peptidique ce qui bloque l'activation du LT (Desnoyers et al., 2013). Au niveau du tissu cible riche en protéases comme le microenvironnement tumoral, ces enzymes pourront cliver le peptide et ainsi découvrir le domaine de reconnaissance du CAR (**Figure 41**).

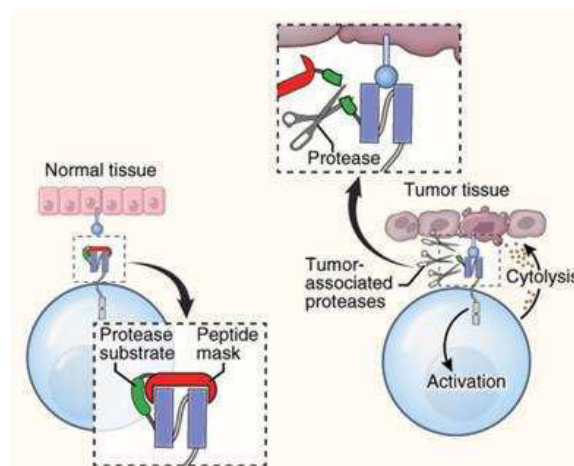


Figure 41 : **Les CAR peuvent être des récepteurs « masqués » ce qui rend la reconnaissance de l'antigène impossible.**

Des protéases pourront cliver le peptide qui masque et empêche la reconnaissance de la cible. D'après Klebanoff et al., 2016.

Bien que séduisant, ces différents systèmes de contrôle de l'activation des CAR pour limiter les effets néfastes sur les tissus sains n'ont pour le moment pas été évalués chez l'homme.

Chapitre 4 : Aspects réglementaires des Médicaments de Thérapie Innovante

En France, c'est l'Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de santé (ANSM) qui est chargée de la gestion et de l'évaluation des recherches biomédicales. L'ANSM a été créé en 2011 pour remplacer l'Agence Française de Sécurité Sanitaire du médicament et des Produits de Santé (Afssaps). Ces actions débouchent sur la prise de décisions de police sanitaire pour le compte de l'Etat français et notamment l'autorisation d'essais cliniques.

1. Les essais cliniques et leurs réglementations

Un essai clinique est une recherche biomédicale organisée et pratiquée sur l'Homme en vue du développement des connaissances biologiques ou médicales.

1.1. Différentes phases

Le développement d'un médicament s'articule en plusieurs phases (**Figure 42**).

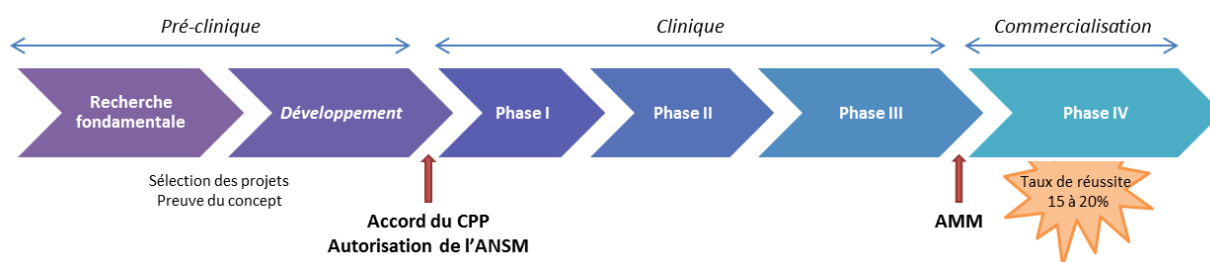


Figure 42 : Les différentes étapes du développement d'un médicament.

Pour débiter un essai clinique, le promoteur, c'est-à-dire la personne qui prend l'initiative de l'essai, doit tout d'abord obtenir un avis favorable du Comité de Protection des Personnes (CPP). Si le CPP ne donne pas un avis favorable, l'essai ne peut pas avoir lieu. En effet, le CPP s'assure de la protection des participants à la recherche biomédicale et de la pertinence de la recherche. Il vérifie également que l'évaluation du rapport bénéfice/risque est satisfaisant. Le promoteur soumet également un dossier de demande d'autorisation d'essai clinique (AEC) à l'ANSM. Ce dossier permet à l'ANSM d'évaluer la sécurité et la qualité des produits utilisés au cours de la recherche avant de se prononcer. Elle vérifie également les lieux de la réalisation de l'essai clinique.

Une fois ces autorisations accordées l'essai clinique peut alors débiter. Un essai clinique se déroule en 4 phases :

- La phase I a pour but d'évaluer la tolérance et la dose sur des volontaires sains. Elle est effectuée sur un petit groupe de participants

- La phase II évalue l'intérêt thérapeutique et les propriétés pharmacodynamiques de la molécule chez l'homme. On distingue la phase IIA qui inclue un petit nombre de sujets sains de la phase IIB qui a lieu sur un petit groupe de patients atteints de la maladie ciblée. Elle permet de valider le démarrage d'essais à grande échelle
- La phase III évalue également l'intérêt thérapeutique et l'absence de nocivité mais sur un grand nombre de malades. Cette phase aboutie à l'Autorisation de Mise sur le Marché (AMM)
- La phase IV se déroule après la mise sur le marché. Elle a pour objectif de repérer d'éventuels effets indésirables rares non détectés durant les phases précédentes (pharmacovigilance) et de préciser les conditions d'utilisation.

L'investigateur de l'essai clinique a en charge la direction et la surveillance de la réalisation de l'essai clinique. Pendant toute la durée de l'essai, il est tenu d'informer l'ANSM des effets indésirables graves et inattendus pouvant être liés au médicament testé, de tout fait lié à la recherche et qui pourrait remettre en cause la sécurité des personnes se prêtant à la recherche. En cas de survenue de problèmes graves, l'ANSM est en mesure de prendre la décision qui lui semble la plus adaptée : suspension voire même interdiction de l'essai si nécessaire.

1.2. Nouvelles réglementations européennes en vigueur

De nombreux produits de thérapies cellulaires et géniques sont actuellement en cours de développement en France et en Europe. En effet, la thérapie génique, la thérapie cellulaire, l'ingénierie tissulaire constituent de nouvelles avancées dans le traitement de maladies telles que le cancer. Ces "candidats médicaments " entrent dans un cadre réglementaire complexe des Médicaments de Thérapie Innovante (MTI) régit par le règlement européen n°1394/2007.

1.2.1. Qu'est-ce qu'un MTI ?

Le règlement CE n°1394/2007 crée la catégorie des Médicaments de Thérapie Innovante afin de permettre une bonne protection de la santé des patients mais aussi de fournir un cadre légal et harmonisé à l'échelle de l'Union Européenne. Cela doit aussi permettre de favoriser la compétitivité européenne.

Ces textes européens définissent aujourd'hui 4 types de MTI :

- Les **médicaments de thérapie génique** sont des médicaments biologiques dont la substance active contient ou est constitué par un acide nucléique recombinant et dont l'effet dépend directement de la séquence d'acide nucléique ou de son expression. Il est administré à un patient en vue de réguler, de remplacer, d'ajouter ou de supprimer une séquence génétique. Dans cette catégorie, on peut citer

l'exemple des cellules souches hématopoïétiques pour le traitement du déficit immunitaire congénital lié à l'X (Cavazzana-Calvo et al., 2000).

- Les **médicaments de thérapie cellulaire somatique** contiennent ou sont constitués de cellules ou de tissus qui ont fait l'objet d'une manipulation substantielle afin de modifier leurs caractéristiques biologiques, leurs fonctions physiologiques ou leurs propriétés structurelles par rapport à l'usage clinique prévu. Cela peut aussi être des cellules ou tissus qui ne sont pas destinés à être utilisés pour les mêmes fonctions essentielles chez le receveur et le donneur. C'est le cas de la production de cellules souches mésenchymateuses pour l'onco-hématologie (Le Blanc et al., 2007).

- Les **médicaments issus de l'ingénierie cellulaire et tissulaire** sont des produits qui contiennent des cellules ou des tissus issus de l'ingénierie cellulaire ou tissulaire qui présentent des propriétés permettant de régénérer, réparer ou remplacer le tissu humain. Par exemple, la production de kératinocytes pour le traitement des grands brûlés ou des ulcères chez les patients diabétiques est un médicament issu de l'ingénierie cellulaire.

- Les **médicaments combinés de thérapie innovante** intègrent dans leur composition un ou plusieurs dispositifs médicaux et des cellules ou tissus qui ont une action essentielle.

Il existe également des Médicaments de Thérapie Innovante Préparés Ponctuellement (MTI-PP). Ils sont définis par le règlement n°1394/2007 et repris dans la loi du 22/03/2011 comme des médicaments préparés en France, de façon ponctuelle, selon des normes de qualité spécifiques et utilisés en France, dans un hôpital, sous la responsabilité d'un médecin sur prescription médicale. Un MTI-PP est spécialement conçu à l'intention d'un malade déterminé.

1.2.2. Mise en place de la réglementation

Le cadre réglementaire des thérapies cellulaires et géniques a connu un tournant majeur en 2011 avec la mise en application du règlement européen n°1394/2007. La France a traduit ce texte au travers de 3 lois : la loi du 22 mars 2011, le décret de 2012 et le décret de 2013.

2. Production de CGM pour les essais cliniques

2.1. Les normes de fabrication et la classification des locaux

Les BPF sont établies en Europe par l'Agence Européenne du Médicament (EMA) et transposées par l'ANSM en France. Aux États-Unis, ces règles sont établies par la FDA. Ce sont des directives qui doivent garantir la sécurité et le respect de normes de qualité du produit (efficacité, pureté, stérilité, traçabilité). Dès la phase I, des tests de sécurité tels que le contrôle de la stérilité, la recherche de mycoplasmes et d'endotoxines sont requis pour permettre la délivrance du médicament.

Concernant le vecteur rétroviral utilisé, les fabricants doivent fournir la description complète du vecteur incluant sa carte et son séquençage. Le surnageant rétroviral est produit dans des conditions environnementales strictes où un contrôle des particules est effectué en continu. Un contrôle microbiologique est effectué avant, pendant et après la production du lot. Cette production répond à la norme NF EN ISO 14-644. La qualification du surnageant produit est ensuite réalisée selon les recommandations de la pharmacopée européenne.

La norme NF EN 14 644 est la norme internationale de référence qui permet de classer les zones de production contrôlées en fonction du nombre de particules présentes dans l'air. Elle définit le nombre maximal de particules admises par taille et par classe de particule. En complément de ces classes d'empoussièrement, des classes de bio-contamination ont été définies par le secteur pharmaceutique :

- Les zones de classe A sont les zones où sont réalisées les opérations à haut risque. Ce sont les postes à flux laminaires et les isolateurs, où sont préparées en général les produits injectables,
- Les zones de classe B sont des zones à atmosphère contrôlée dans l'environnement immédiat de la zone de travail classée A,
- Les zones de classe C et D sont des zones à atmosphère contrôlée destinées aux étapes les moins critiques.

Ainsi, pour reprendre l'exemple du surnageant rétroviral, celui-ci doit être produit selon les normes A dans B, c'est-à-dire, sous une hotte à flux laminaire placée dans une salle de type B.

2.2. Développement clinique de cellules génétiquement modifiées

Comme nous l'avons vu, la production de CGM pour exprimer un gène suicide ou un CAR comporte des étapes clés qui sont : l'activation des LT, leur transduction et leur expansion, le tri éventuel des cellules ayant intégré le transgène et la cryoconservation des cellules en attendant le transfert au patient.

Différents systèmes de culture ont donc été développés afin de réaliser ces étapes à grande échelle et selon les réglementations (Kaiser et al., 2015). En effet, les flacons de culture et les systèmes ouverts ne sont pas compatibles avec la production clinique. Plusieurs sociétés comme GE Healthcare, Miltenyi, Terumo BCT ou encore Biosafe commercialisent des automates spécifiques permettant la réalisation de ces différentes étapes de production en système clos (**Figure 43**).

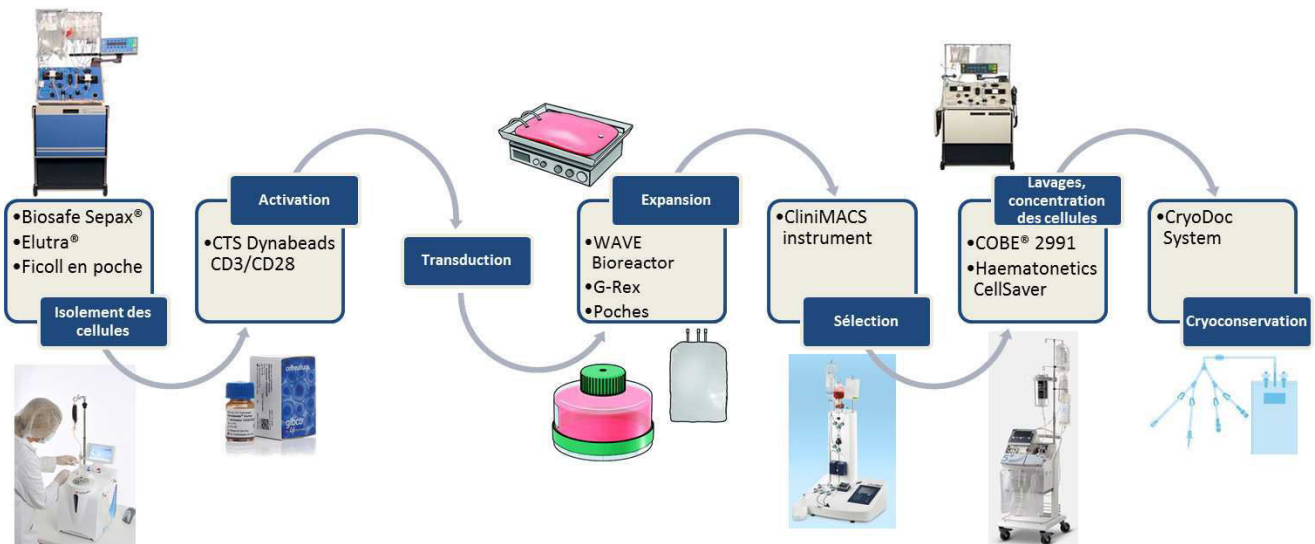


Figure 43 : *Différents systèmes permettant la production de cellules génétiquement modifiées en système clos.*

3. Place de l'EFS

3.1. Présentation

L'Établissement Français du Sang (EFS) est placé sous la tutelle du ministre chargé de la santé et rassemble près de 10 000 collaborateurs qui assurent les activités de transfusion sanguine dans toute la France. Avec notamment les banques de sang placentaire, l'EFS est un acteur majeur de l'ingénierie cellulaire en France en mettant à disposition des Centres Hospitaliers Universitaires plus de la moitié des plateformes de thérapie cellulaire en France. Un réseau de cinq plateformes innovantes (Atlantic Bio GMP (ABG) à Nantes, Besançon, Grenoble, prochainement Créteil et Toulouse) dédiées aux essais cliniques permettra à l'EFS d'assurer la production pour les essais de phases I et II au niveau national et international. Des équipes de recherche associées à ces plateformes permettent de faire le lien entre la recherche et la production clinique.

3.2. L'EFS Bourgogne/Franche-Comté

L'EFS Bourgogne/Franche-Comté (EFS B/FC) a inauguré le 24 novembre 2015 à Besançon sa plateforme de production de MTI dirigée par le Dr Fabienne Pouthier. C'est la 3^{ème} plateforme de production de MTI à ouvrir après celles de Nantes et de Grenoble. Devenu établissement pharmaceutique, l'EFS B/FC peut donc maintenant produire des MTI dans ses 2 salles blanches de classe A dans B indépendantes l'une de l'autre. Ainsi, par son organisation, la plateforme de Besançon est en mesure d'assurer la production simultanée de 2 médicaments.

L'UMR1098, l'équipe de recherche associée à l'EFS B/FC, travaille à la compréhension des mécanismes immunitaires et leurs dérèglements qui pourraient expliquer la survenue de maladies graves. Les travaux de cette équipe ont pour objectif d'amener au développement de plusieurs MTI (Figure 44).

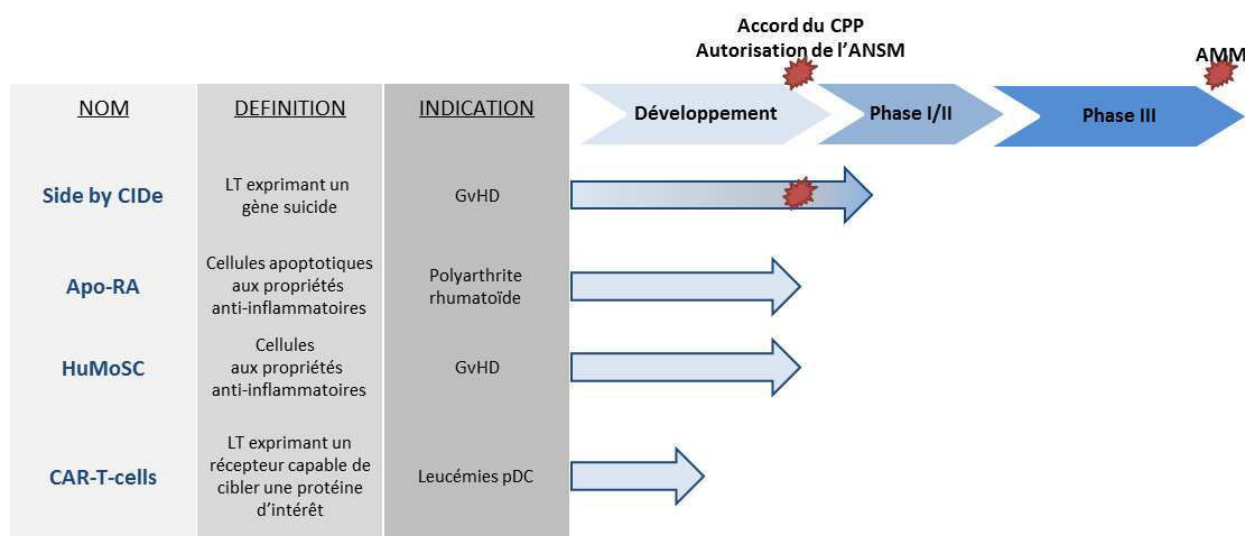


Figure 44 : Développements de MTI menés à l'EFS Bourgogne/Franche-Comté.

En mars 2016, l'ANSM a donné son accord pour le lancement de l'essai clinique *Side by CIDE*. Le protocole *Side by CIDE* est une étude de phase I/II qui porte sur l'utilisation de lymphocytes T génétiquement modifiés, exprimant le gène inductible de la *caspase 9 humaine* (iCasp9) et le gène de sélection $\Delta CD19$ dans la greffe hématopoïétique allogénique. Le promoteur de cet essai est le Centre Hospitalier Régional Universitaire (CHRU) Jean Minjot de Besançon et l'investigateur est le Pr Eric Deconinck du service d'hématologie du CHRU. L'objectif principal de cette étude est d'évaluer la fréquence de survenue, la sévérité et la réponse à un traitement par l'AP1903 de la GVHD aigüe après administration de lymphocytes T exprimant iCasp-9 en même temps qu'un greffon médullaire T & B-déplété. Ce protocole va inclure 12 patients adultes candidats à une allogreffe avec un risque de GVHD élevé après consentement écrit du donneur et du receveur. L'inclusion du premier patient est prévue pour l'automne 2016.

OBJECTIFS DE LA THESE

La thérapie cellulaire est basée sur l'administration de cellules immunocompétentes dans le but d'induire une réponse thérapeutique. Le transfert de gène est un moyen d'optimiser et de sécuriser la thérapie cellulaire. Récemment, plusieurs essais cliniques d'immunothérapie ont montré l'efficacité de lymphocytes T reprogrammés pour le traitement des cancers. De plus, le transfert de gène « suicide » permet de sécuriser les effecteurs immunitaires utilisés en thérapie cellulaire. Cependant, les capacités des cellules pourraient encore être améliorées par l'expression de cytokines et de récepteurs aux chimiokines.

Dans ce contexte et dans le cadre d'un contrat CIFRE à l'Établissement Français du Sang, l'objectif de ce projet de thèse est le développement et la caractérisation d'outils innovants de thérapie génique. Ce travail demande le développement de différentes constructions géniques sécurisées pour la reprogrammation des lymphocytes T et leur persistance *in vivo* pour être par la suite, mis à la disposition de la recherche clinique afin de promouvoir de nouvelles stratégies de thérapie cellulaire anti-tumorale. Nous nous sommes particulièrement intéressés à la reprogrammation des LT pour exprimer un CAR et à la modulation du microenvironnement tumoral par la sécrétion conditionnelle d'IL-12 dans un contexte de thérapie cellulaire sécurisée par la iCasp9.

MATERIELS ET METHODES

1. Matériels

1.1. Les cellules

1.1.1. Les lignées cellulaires d'emballage

Les différentes lignées d'emballage utilisées au cours de ce travail de thèse sont présentées dans le tableau ci-dessous (Tableau III).

Tableau III : *Caractéristiques des lignées cellulaires d'emballage.*

Lignée cellulaire	Origine	Type de croissance	Enveloppe	Tropisme
PG13	NIH 3T3 (murine)	Adhérente	GALV	Ecotropique
GP+E-86	NIH 3T3 (murine)	Adhérente	MULV	Ecotropique
PT67	NIH 3T3 (murine)	Adhérente	10A1	Dualtropique
AmphoPack 293	HEK293 (humaine)	Adhérente	4070A	Amphotropique

1.1.2. Les lignées cellulaires de glioblastome

Les lignées U87 et U87 EGFRvIII sont des lignées dérivées de glioblastome qui nous ont été gracieusement fournies par le Dr Frank Furnari (Cellular and Molecular Medicine, La Jolla, Californie USA). La lignée U87 n'exprime pas la protéine EGFRvIII alors que la lignée U87 EGFRvIII a été génétiquement modifiée pour l'exprimer fortement.

1.1.3. Les lignées cellulaires T

Les lignées cellulaires Jurkat et CEM sont des lignées de lymphocytes T cultivées en suspension. La lignée Jurkat a été isolée chez un patient de 14 ans atteint d'une leucémie aigüe (Schneider et al., 1977). La lignée CEM a été isolée à partir du sang d'une patiente de 4 ans atteinte d'une leucémie lymphoblastique aigüe.

1.1.4. Obtention de lymphocytes T primaires

Les PBMC (*Peripheral Blood Mononuclear Cell*) utilisés sont isolés par gradient de densité sur Ficoll-Hyperpaque (CMSMSL01-0U, Eurobio, France), à partir de sang total issu de kit de cytophérèse de donneurs de sang de l'Établissement Français du Sang Bourgogne/Franche-Comté ayant tous consenti à ce que leur prélèvement soit utilisé à des fins de recherche. Les PBMC sont activés à l'aide de billes CD3 et CD28 (Dynabeads® CD3/CD28 CTSTM, 40203D, Life Technologies, France) avec un ratio Billes / PBMC = 1/1 et de l'IL-2 à 500 UI/mL (Proleukine, Novartis, Suisse) et mis en culture à 1.10^6 cellules/mL.

1.1.5. Isolement des cellules NK

Les cellules NK ont été purifiées à partir de PBL (*Peripheral blood lymphocytes*) en suivant le protocole « EasySep™ Human NK Cell Enrichment Kit » (#19055, StemCell, Canada). Les PBL ont été obtenus après mise en adhérence de PBMC pendant 1h30 à 37°C. Les PBL ont été incubés avec un cocktail d'anticorps spécifiques couplés à du dextran permettant une sélection de l'ensemble des cellules en dehors des NK, selon les recommandations du fournisseur. Puis les PBL ont été incubés avec des billes magnétiques liées au dextran, à température ambiante, avant d'être insérés dans l'aimant. Les billes magnétiques, attirées par l'aimant, ont retenu les cellules marquées par le cocktail d'anticorps *via* le dextran et la fraction purifiée en cellules NK non marquées a été récupérée. La pureté a été évaluée pour chaque tri par marquage membranaire CD3 et CD56 avant d'être analysée par cytométrie en flux. La pureté du tri a été validée lorsqu'elle était supérieure à 95%.

1.2. Les vecteurs

Les différents vecteurs rétroviraux utilisés sont construits sur le même modèle et contiennent chacun une cassette suicide assurée par le gène la *caspase-9 inducible* et un gène de sélection et de suivi des cellules : Δ CD19 ou Δ CD34 (Figure 45).

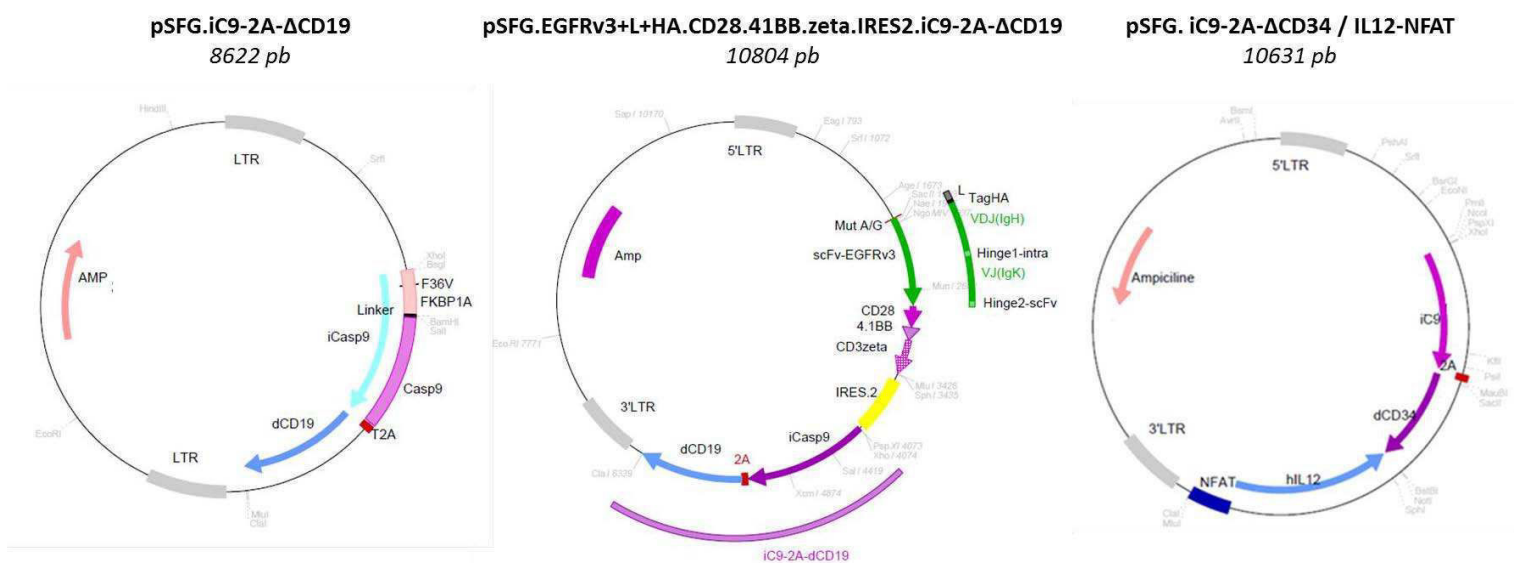


Figure 45 : Cartes de restriction des vecteurs utilisés.

1.3. Cytométrie en flux

Les marquages de cytométrie en flux ont été réalisés à l'aide d'anticorps présentés dans le tableau suivant (Tableau IV) selon les recommandations des fournisseurs.

Tableau IV : *Listes des anticorps utilisés.*

Anticorps	Référence	Fournisseur
CD3 VioBlue	130-094-363	Miltenyi Biotec
CD19 APC	130-091-248	Miltenyi Biotec
CD4 V450	56081	BD Horizon
CD56 PE	555516	BD Pharmingen
CD34 VioBlue	130-095-393	Miltenyi Biotec
IFN γ APC	554702	BD Pharmingen
IFN γ PE	3132535	Sony
Streptavidine PE	130-106-789	Miltenyi Biotec

Les marquages intracytoplasmiques ont été réalisés à l'aide du kit BD Cytofix/Cytoperm™ (#554722, BD Biosciences, USA) selon les recommandations du fournisseur. Brièvement, après le marquage membranaire, les cellules sont fixées et perméabilisées par ajout de la solution BD Cytofix/Cytoperm et incubation 20 min à +4°C. Les cellules sont ensuite lavées 2 fois en BD Perm/Wash avant de procéder au marquage intracytoplasmique.

La mort cellulaire a été étudiée par marquage Annexin-V/7-AAD (PN IM3614, Beckman Coulter, USA) selon les recommandations du fournisseur.

L'acquisition a été faite avec le cytomètre de flux BD FACS CANTO II (BD Biosciences, USA) et les résultats analysés avec le logiciel DIVA v7 (BD Biosciences, USA).

2. Techniques de culture cellulaire

2.1. Culture cellulaire

Les cellules sont cultivées dans un incubateur à 37°C saturé en vapeur d'eau avec 5% de CO₂ et 95% d'air.

Les lignées cellulaires d'emballages (GP86, PG13, Ampho293, PT67) sont des lignées adhérentes cultivées au pH physiologique en milieu complet constitué de DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, CM1DME68-01, Eurobio, France) additionné de 10% de sérum de veau foetal (SVF, réf : 10270-106, GIBCO, USA) décomplémenté, d'un cocktail d'antibiotiques (Pénicilline 100 U/mL et Streptomycine 100 μ g/mL, réf : 15140-122, GIBCO, USA). Tous les deux jours (lundi, mercredi et vendredi), les cellules sont observées au microscope optique à fond clair à l'objectif x20 pour suivre leur croissance. Si les cellules ne recouvrent pas la totalité de la flasque de culture, elles sont dites non-confluentes et leur milieu est remplacé par du milieu neuf. Si les cellules recouvrent toute la flasque, elles sont confluentes. Elles sont alors lavées avec 3 mL de tampon PBS pour éliminer les traces de

sérum qui empêcheraient l'action de la trypsine. Ensuite, les cellules sont décollées de la paroi de la flasque avec 2 mL de trypsine / EDTA 0,03%. L'EDTA est un chélateur des ions divalents comme l'ion magnésium Mg^{2+} , cofacteur des DNases ; ainsi, la présence d'EDTA empêche l'hydrolyse de l'ADN. La trypsine est une enzyme qui lyse les liaisons intercellulaires. Après quelques minutes d'incubation dans la trypsine à 37°C, l'enzyme est inactivée par ajout de milieu complet. Enfin, les cellules sont dissociées et un dixième des cellules est remis en culture dans de nouvelles flasques.

Les lignées cellulaires T sont des lignées en suspension cultivées dans du milieu RPMI (Roswell Park Memorial Institute) 1640 1X (réf : 72400-021, GIBCO, USA) contenant 10% de sérum de veau fœtal (SVF) (réf : 10270-106, GIBCO, USA) et 1% de pénicilline-streptomycine (réf : 15140-122, GIBCO, USA).

2.2. Établissement d'une lignée d'emballage PG13

2.2.1. Transfection transitoire des GP86

La transfection transitoire est une technique qui permet d'introduire une séquence d'ADN choisie dans des cellules eucaryotes afin d'étudier ses propriétés promotrices ou l'impact de son expression sur la population cellulaire.

À J0, les cellules GP86 ont étéensemencées à raison de 380 000 cellules/puits en plaque 6 puits en milieu DMEM 10% SVF 1% PS. Après 8h d'incubation à 37°C, les cellules ont été observées au microscope inversé pour vérifier leur adhérence et la confluence qui doit être comprise entre 50 et 80%. Les cellules présentant ces conditions ont alors été transfectées. Dans un premier temps, une solution de transfection a été préparée contenant 4 µg de plasmide, 400 µL de DMEM, 4,5 µL de PLUS REAGENT (#15338-100, Life Technologies, France). Cette solution a été incubée 5 min à température ambiante. 5 µL de lipofectamine (#15338-100, Life Technologies, France) ont été ajoutés puis incubés 30 min à température ambiante. 600 µL de DMEM 5% SVF ont été additionnés à la solution. Les cellules ont été lavées avec du PBS 1X puis la solution de transfection a été déposée avec précaution sur le tapis cellulaire. Après 15h d'incubation à 37°C, la solution de transfection a été remplacée par du milieu frais (DMEM 10% SVF 1% PS).

Le surnageant de culture contenant les particules rétrovirales et nécessaire à la transduction de la lignée PG13 a été récolté à J3, J4 et J5 post transfection. L'efficacité de transfection a été déterminée par marquage membranaire et cytométrie en flux à J5.

2.2.2. Transduction des PG13

Une plaque 6 puits a été coatée avec de la Rétronectine (#T100B, Takara, Japon) à 1,2 µg/cm² puis incubée une nuit à +4°C. Le lendemain, la Rétronectine a été incubée avec 2 mL de PBS HSA 2% pendant

30 min à température ambiante. Puis, une spin-transduction a été effectuée : du surnageant de culture de GP86 transfectées contenant les particules rétrovirales a été déposé sur la Rétronectine et une centrifugation de 1h30 à 2000 g et 10°C a été réalisée. Enfin, 400 000 cellules PG13 ont étéensemencées dans chaque puits et la plaque a été incubée à 37°C.

2.3. Transduction de PBMC

À J2 post activation, une spin transduction a été effectuée : le surnageant des PG13 a été récolté, centrifugé à 600 g pendant 5 min, puis déposé sur une plaque 6 puits coatée avec de la rétronectine. La plaque a été centrifugée 1h30 à 2000 g à 10 °C. Après numération des lymphocytes T activés à J0, 3 à 4.10^6 de cellules ont étéensemencées dans les puits. Les cellules ont été incubées 2 jours à 37°C puis diluées à $0,25.10^6$ cellules/mL. L'efficacité de transduction est évaluée par cytométrie en flux à l'aide des anticorps anti-CD3^{VioBlue} et anti-CD19^{APC} à partir de J6.

2.4. Tests de cytotoxicité par co-culture

Les lymphocytes T génétiquement modifiés pour exprimer le CAR EGFRvIII ont été mis en co-culture avec les cellules cibles U87 ou U87 EGFRvIII avec un rapport effecteur/cible de 10/1. La co-culture a été réalisée pendant 24h en plaque 96 puits à raison de 100 000 lymphocytes par puits. Pour les 12 dernières heures de co-culture, du Golgi Plug (#555029, BD Biosciences, USA) a été ajouté à la co-culture. Le Golgi Plug contient de la Brefeldin A, un inhibiteur de transport des protéines qui va entraîner une accumulation des cytokines dans le Golgi permettant ainsi leurs détections par marquage intracytoplasmique et cytométrie en flux. La sécrétion d'IFN γ a ensuite pu être évaluée par cytométrie en flux.

3. Techniques de préparation et d'analyse des acides nucléiques

3.1. Électrophorèse sur gel d'agarose

Les fragments d'ADN sont chargés négativement. Placés dans un champ électrique, ils vont donc se déplacer vers l'anode, mais leurs charges respectives étant à peu près équivalentes, c'est donc leur masse moléculaire qui va régler leur vitesse de déplacement à travers les mailles du gel. Plus les fragments sont petits, plus ils vont migrer rapidement et donc loin dans le gel.

La migration des échantillons d'ADN est effectuée à 100 V pendant 25 minutes dans des gels d'agarose 1% ou 2% en tampon TBE 1X (Tris Borate EDTA, #ET020-A, Euromedex, France) additionné de GelRed (#DY1740, Interchim, France). L'ADN présent dans le gel est ensuite révélé au transilluminateur UV et l'image acquise avec le logiciel Perfect Image.

3.2. Extraction d'ADN plasmidique

3.2.1. Miniprep

Cette technique permet d'extraire une petite quantité (100 ng à 5 µg) d'ADN sous forme plasmide à partir de 3 mL de culture bactérienne. L'extraction est réalisée selon le protocole indiqué par le fournisseur (Plasmid DNA purification, NucleoSpin® Plasmid, Macherey Nagel, Düren, Allemagne)

3.2.2. Maxiprep

Cette technique permet la purification de plasmides à partir de 400 mL de culture bactérienne. L'extraction est réalisée selon le protocole indiqué par le fournisseur (Endotoxin-free plasmid DNA purification, NucleoBond® Xtra Maxi EF, Macherey Nagel, Düren, Allemagne) et permet d'obtenir de l'ADN plasmidique d'une pureté satisfaisante dépourvu d'ARN pouvant être utilisé pour des expériences de clonage, séquençage et transfection.

3.3. Digestion par des endonucléases de restriction

Les vecteurs utilisés au cours de ce travail ont été contrôlés et qualifiés par restriction enzymatique. La digestion est réalisée pendant 2 heures au bain marie à 37°C avec 1 unité d'enzyme par µg d'ADN en présence d'un dixième du volume final d'un tampon 10X dont la force ionique est optimale pour l'activité enzymatique.

3.4. Transformation des bactéries compétentes

La transformation des bactéries *E. coli* compétentes (souche JM105 et TOP-10, Life Technologies, France) est effectuée en mettant en contact l'ADN avec 50 µL de bactéries compétentes pendant au minimum 30 minutes sur glace puis en réalisant un choc thermique à 42°C pendant 90 secondes. Les bactéries sont à nouveau conservées pendant 2 minutes sur glace puis remises en culture dans 3 mL de milieu LB (Luria Bertani) pendant 2 heures à 37°C dans un agitateur rotatif. Les bactéries (50 µL et 200 µL) sont étalées sur un milieu sélectif gélosé constitué de LB et d'ampicilline (0,1 mg/mL) puis sont incubées une nuit à 37°C.

3.5. Extraction des acides nucléiques

3.5.1. Extraction d'ADN

L'extraction d'ADN a été réalisée selon la technique « Salting Out ». À partir d'un culot de $3 \cdot 10^6$ cellules, ont été ajoutés 375 µL de Tampon TES d'extraction, 15 µL de Sodium Dodécyl Sulfate (SDS) 20% et 20 µL de protéinase K à 10 mg/mL (#P2308, Sigma, USA). Puis, le mélange a été incubé une nuit à température ambiante sur agitateur rotatif. 140 µL de NaCl 6M ont été additionnés au mélange qui a

été agité vigoureusement jusqu'à obtenir un aspect laiteux. Après, une centrifugation de 10 min à 15000 g, 1 mL d'éthanol pur froid a été ajouté au surnageant. Le mélange a été agité par retournement jusqu'à apparition d'une méduse d'ADN puis une centrifugation à 15000 g pendant 10 min a été réalisée. Le culot a été rincé par centrifugation à 15000 g pendant 5 min avec 1 mL d'éthanol à 70% puis séché à température ambiante pour éliminer complètement l'éthanol. Ensuite, il a été repris dans 40 µL de tampon d'éluion (TE) 10.1 et pH = 8. L'ADN a été solubilisé en le laissant une journée à température ambiante puis 30 min à 55°C. L'ADN extrait a été quantifié par spectrophotométrie (NanoDrop 1000 Spectrophotometer, Thermo Scientific, USA).

3.5.2. Extraction d'ARN

L'ARN a été extrait à l'aide du kit RNeasy Minikit (#74106, QIAGEN, Pays-Bas). Après avoir réalisé un culot de $3 \cdot 10^6$ cellules, celui-ci a été repris dans 350 µL de tampon RLT contenant 1% de β -mercaptoéthanol. Un volume équivalent d'éthanol à 70% a été ajouté et l'ensemble a été déposé sur une mini-colonne. Une centrifugation de 15 sec à 11000 g a été réalisée et le filtrat a été éliminé. Ensuite, 350 µL de Tampon RW1 ont été déposés sur la colonne et une centrifugation de 15 sec à 11000g a été effectuée. Un mélange de 10 µL de DNase I + 70 µL de tampon RDD a été déposé sur la colonne et une incubation de 15 min à température ambiante a été réalisée. 350 µL de tampon RW1 ont été déposés sur la colonne puis une centrifugation de 15 sec à 11000g a été réalisée. Puis, 500 µL de tampon RPE ont été additionnés sur la colonne avant une centrifugation de 15 sec à 10000g. À nouveau, 500 µL de tampon RPE ont été ajoutés dans la colonne mais avec une centrifugation de 2 min à 10000g. Enfin, 40 µL d'eau distillée RNase-free ont été déposés sur la colonne puis une centrifugation d'1 min à 10600g a été réalisée. L'ARN obtenu a été congelé à -80°C jusqu'à utilisation.

3.6. Transcription inverse (RT-PCR)

Les échantillons contenant l'ARN ont été incubés 5 min à 65°C puis placés dans la glace jusqu'à utilisation. Avec le kit High Capacity RNA to cDNA (ref : 4387406, Applied Biosystem, USA), un mix a été réalisé avec pour 1 échantillon : 1X de 2X RTB Buffer, 1X de 20X Enzyme Mix et 9 µL d'échantillon ARN dans un volume final de 20 µL. Puis les échantillons ont été amplifiés selon le programme suivant : 60 min à 37°C puis 5 min à 95°C. La synthèse d'ADNc a ensuite été vérifiée par PCR (recherche du gène *HPRT* pour les lignées murines et *cRaf* pour les lignées humaines).

3.7. PCR qualitative

La PCR a été réalisée avec le kit My Taq DNA polymérase (#BIO-21105, BIOLINE, Angleterre). À 500 ng d'ADN ou 2 µL d'ADN complémentaire (ADNc) ont été ajoutés 50 µM d'amorces sens et antisens, 1X de tampon MyTaq (contenant le $MgCl_2$ et les dNTP (désoxyribonucléoside Tri-Phosphate)), 1,25 U de Taq

polymérase à 5U/μL dans un volume final de 50 μL. Un témoin négatif a été fait en remplaçant l'ADN ou l'ADNc par de l'eau. Le matériel génétique a été amplifié selon le programme suivant : une étape de pré-dénaturation de 5 min à 95°C suivie d'une dénaturation de 45 sec à 94°C, une hybridation d'1 min à 55°C, une élongation d'1 min à 72°C pendant 40 cycles et d'une élongation finale de 5 min à 72°C dans un thermocycleur PEL 2700 (Perkin Elmer, USA).

3.8. Purification des produits de PCR

Après électrophorèse sur gel d'agarose, les produits de PCR ont été purifiés à l'aide du kit NucleoSpin Gel and PCR clean up (Macherey Nagel, Düren, Allemagne) selon les recommandations du fournisseur.

3.9. Étude de la méthylation du promoteur LTR

L'ADN des lignées à étudier a été extrait puis converti au bisulfite à l'aide du kit MethylEdge Bisulfite Conversion System (N1301, Promega, USA) selon les recommandations du fournisseur permettant une conversion des cytosines non-méthylées en uraciles. Une PCR a ensuite été réalisée afin d'amplifier le promoteur LTR du transgène d'intérêt. La PCR a été réalisée à l'aide du kit Multiplex PCR (réf : 1026951, QIAGEN, Pays-Bas). Les amorces utilisées (5LTRbi-Fw 5'-AAGGATTTGAAATGATTTTGTG-3'; 5LTRbi-Rv 5'-CTAAACAATCRAACAAACACAA-3') ont été choisies grâce au logiciel Methyl primer express v1.0 (Life Technologies, France) et permettent de cibler 16 îlots CpG sur les 20 que contient le promoteur LTR.

Le matériel génétique a été amplifié selon le programme suivant : une étape de pré-dénaturation de 5 min à 95°C suivie d'une dénaturation de 45 sec à 94°C, une hybridation d'1 min à 55°C, une élongation d'1 min à 72°C pendant 40 cycles et d'une élongation finale de 5 min à 72°C. L'électrophorèse a été réalisée à 100 V sur gel d'agarose 2% additionné de GelRed (réf : DY1740, Interchim, France) dans du tampon TBE (Tris Borate EDTA) 1X (à partir de TBE 10X (réf : ET020-A, Euromedex, France) à diluer dans de l'eau) puis le gel a été révélé au transilluminateur UV et l'image acquise avec le logiciel Perfect Image. Les produits de PCR ont alors été purifiés et clonés dans le vecteur pCR2.1 TOPO (TOPO TA Cloning kit, Life Technologies, France). L'ADN plasmidique a été extrait par miniprep (Plasmid DNA purification, NucleoSpin® Plasmid, Macherey Nagel, Düren, Allemagne) et séquencé par la méthode Sanger (ABI 3130 Genetic Analyser, Applied Biosystem, France). L'analyse du statut de méthylation a été réalisée par le logiciel BISMA (Rohde et al., 2010).

4. Techniques de préparation et d'analyse des protéines

4.1. Dosage de la production de cytokines par ELISA

Les surnageants de co-culture ont été conservés à -80°C jusqu'à la réalisation du dosage des cytokines par technique ELISA. Les concentrations d'IFNγ et d'IL-12 ont été déterminées grâce aux kits Human IL-

12 ELISA Set et Human IFN γ ELISA Set (#851.550 #851.560, Diaclone, Besançon, France) selon le protocole fourni. Brièvement, des anticorps de capture anti-IFN γ et anti-IL-12 ont été coatés pendant une nuit à +4°C dans une plaque 96 puits (#055266, Dutscher, France). Une solution de blocage (PBS 5% BSA) a été ajoutée pendant 2h à température ambiante, puis les surnageants de culture ont été dilués et incubés en duplicat pendant 2h à température ambiante. Une dose-réponse d'IFN γ et d'IL-12 de concentrations connues a été effectuée en parallèle pour l'établissement d'une gamme étalon. Un anticorps de détection anti-IFN γ ou anti-IL-12 biotinylé a ensuite été ajouté et la plaque a été incubée 2h à température ambiante. De la streptavidine couplée à l'enzyme Horseradish Peroxidase (HRP) a alors été ajoutée pendant 30min. Le substrat de l'enzyme, 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB), a enfin été incubé pendant 15 minutes à température ambiante puis la réaction a été arrêtée par ajout d'H $_2$ SO $_4$ 1M. Trois lavages en PBS 0,1% Tween 20 sont effectués entre chaque étape. L'absorbance à 450nm a été lue immédiatement au lecteur de plaque (Sunrise, TECAN, Suisse) et les concentrations d'IFN γ et d'IL-12 dans les surnageants de culture ont été déterminées à l'aide de la gamme étalon.

4.2. Extraction de protéines

L'extraction des protéines a été effectuée à partir d'un culot sec de 5.10⁶ cellules. Dans un premier temps, une solution de broyage a été préparée avec 1X de « complète 10X » contenant les anti-protéases (#04697159001, Roche, Suisse), 1 mM d'EDTA, 1mM de fluorure de sodium, 1mM d'orthovanadate de sodium, 1 mM de dithitréitol, dans un volume final d'1mL en PBS 1X. Puis, 150 μ L de cette solution ont été ajoutés par échantillon avant une sonification de 3x10 sec à 30 % de puissance sur glace.

4.3. Dosage des protéines

Les échantillons protéiques ont ensuite été dosés avec le kit Micro BCA Protein Assay Reagent (réf : 23235, Pierce, USA). Une gamme étalon de Sérum Albumine Bovine (BSA) a été réalisée. La solution de dosage a été préparée comme suit : Réactif A et B = volume total (= 1mL x nombre d'échantillons) / 2 et Réactif C = 0,04 x (volume total / 2). Après dilution des échantillons au 1/500^{ème} puis ajout de la solution de dosage, une incubation d'1 heure à 60°C a été effectuée. Les échantillons ont ensuite été lus au spectrophotomètre à 562 nm. Enfin, tous les échantillons protéiques ont été ajustés à 1 μ g/ μ L avec du LaemmLi 1X (à partir de LaemmLi 4X dilué dans de l'eau (#167-0747, Biorad, USA)) puis dénaturés 5 min à 95°C.

4.4. Western Blotting

Vingt microgrammes de chaque échantillon ont été déposés sur un gel dénaturant 12% d'acrylamide (1X de tampon « séparenting », 12% d'acrylamide, 0,1% de SDS, 10 μ L de Temed (#T065, Sigma, USA),

0,05% de persulfate d'ammonium). La migration a eu lieu dans du tampon de migration 1X (Tris 25mM, glycine 192 mM, SDS 0,1%) à 100 V pendant 30 min puis 200 V pendant 1 heure. Les protéines ont été ensuite transférées sur une membrane de Polyvinylidène difluorure (PVDF) dans du tampon de transfert (Tris 25 mM, glycine 192 mM, méthanol 12%) pendant 2 h à 100 V. Puis, la membrane a été lavée dans du TBS (Tris Buffer Salin) 1X et bloquée dans une solution de lait 6% en TBS-Tween 0,1% pendant 1h30 sous agitation. La membrane a été incubée une nuit à + 4°C sous agitation douce avec l'anticorps primaire (**Tableau V**) dans une solution de lait 6% diluée au quart en TBS 1X. Ensuite, la membrane a été lavée 3 fois 5 min en TBS-Tween 0,1% puis incubée sous agitation douce à l'abri de la lumière avec l'anticorps secondaire conjugué à la HRP (**Tableau V**) pendant 1h20 dans une solution de lait 6% diluée au demi en TBS 1X. Puis, la membrane a été lavée 4 fois 10 min en TBS-Tween 0,1% et une fois 5 min en TBS 1X avant d'être incubée 5 min avec le réactif de chimiluminescence (réf : 12015196001, Roche, Suisse). Enfin, le signal a été révélé avec la caméra CCD Vilber-Lourmat et l'image acquise avec le logiciel « ChemiCapt 3000 ».

Tableau V : Liste des anticorps primaires et secondaires utilisés.

Anticorps	Taille	Référence	Fournisseur	Dilution
Anti-Caspase 3	35, 19, 17 kDa	#9662	Cell Signaling	1/1000
Anti-Caspase 8	57, 43, 18 kDa	#4790	Cell Signaling	1/1000
Anti-Caspase 9	47, 37, 35 kDa	#9502	Cell Signaling	1/1000
Anti-Caspase 10	63-66 kDa	#9752	Cell Signaling	1/1000
Anti-HA tag	NA	#3724	Cell Signaling	1/1000
Anti-CD3ζ	16 kDa	551033	BD Pharmingen	1/1000
Anti-Actine	43 kDa	Clone AC15, #A5441	Sigma-Aldrich	1/10 ⁶
Anti-Flotilline-2	45 kDa	Sc28320	Santa Cruz	1/1000
Anti-GAPDH	35 kDa	G9545	Sigma-Aldrich	1/20000
Anti-Tubuline	55 kDa	T8203	Sigma-Aldrich	1/50000
Anti-Lamine B1	70 kDa	Ab16048	Abcam	1/10 ⁶
HRP goat anti-rabbit IgG	NA	#111-035-144	Jackson	1/24000
HRP sheep anti-mouse IgG	NA	#515-035-062	Jackson	1/6000

4.5. Fractionnement sub cellulaire

Pour mettre en évidence la présence du CAR EGFRv3 à la membrane des PG13 CAR EGFRv3, un fractionnement cellulaire et un Western Blot (WB) ont été réalisés (**Figure 46**). Les fractionnements cellulaires ont été réalisés à partir d'un culot sec frais contenant au moins 30 millions de cellules. Dix volumes du tampon hypotonique (HEPES à 5mM pH 7,9 (Sigma), MgCl₂ à 1,5 mM (Euromedex), KCl (Sigma) à 10 mM, Antiprotéase 1X (Roche), ortho-vanadate à 1 mM (sigma), NaF à 1 mM (Prolabo

normapur) et DTT à 1 mM) ont été ajoutés aux culots de cellules. Après 15 min d'incubation, les cellules ont été passées 30 fois au Dounce. Les lysats ont été centrifugés à 650g pendant 10 min à 4°C pour séparer les noyaux et les débris cellulaires du cytoplasme. Le culot de noyaux a été repris dans du tampon de lavage de noyaux (0,5% NP40, HEPES à 10mM pH 7,9, MgCl₂ à 1,5 mM, KCl à 10 mM, NaCl à 150 mM, Antiprotéase 1X, ortho-vanadate à 1 mM, NaF à 1 mM et DTT à 1 mM). La suspension de noyaux a été centrifugée à 650 g pendant 5 min à 4°C puis le surnageant a été éliminé. Cette étape est reproduite une seconde fois. Les culots ont été repris dans un tampon S1 contenant du sucrose à 0,250 M et du MgCl₂ à 10 mM. Le culot de noyaux repris dans le tampon S1 a été déposé sur le tampon S3 (0,88 M de sucrose (Sigma) et 0,5 mM de MgCl₂). Cette étape est un gradient de sucrose qui permet de purifier la fraction nucléaire. Le gradient a été centrifugé à 2 800 g pendant 10 min à 4°C. Le culot contenant les noyaux purs a été conservé à -20°C.

Lors de la première centrifugation (650g pendant 10 min à 4°C), le surnageant a été conservé puis du sucrose 2 M (1/7^{ème} du volume du surnageant) a été ajouté. Ensuite 2 centrifugations à 1 200 g pendant 5 min à 4°C ont été réalisées et entre chaque centrifugation, le culot a été éliminé. Une troisième centrifugation à 7 000 g pendant 10 min à 4°C a été effectuée pour séparer le cytosol et les membranes des mitochondries. Dans ce protocole, les mitochondries n'ont pas été utilisées donc le culot a été éliminé. De l'EDTA à 500 mM (Euromedex) a été ajouté au 1/100 du volume de surnageant qui a ensuite été centrifugé à 100 000 g pendant 1 h à 4°C dans une ultracentrifugeuse. Après cette étape, le culot obtenu a été lavé 2 fois avec du tampon de lavage des membranes (HEPES à 10 mM pH 7.9, MgCl₂ à 1.5 mM, KCl à 10 mM, NaCl à 150 mM, antiprotéase C10X, ortho-vanadate de sodium à 100 mM, NaF à 500 mM et DTT à 1M) et une centrifugation à 20 000 g 5min.

Les fractions membranaires et les noyaux ont été dilués dans du L1X et L2X pour être soniqués. Les fractions membranaires et les noyaux ont été soniqués 1 min à 25%. Puis ils ont été incubés 5 min à 95°C.

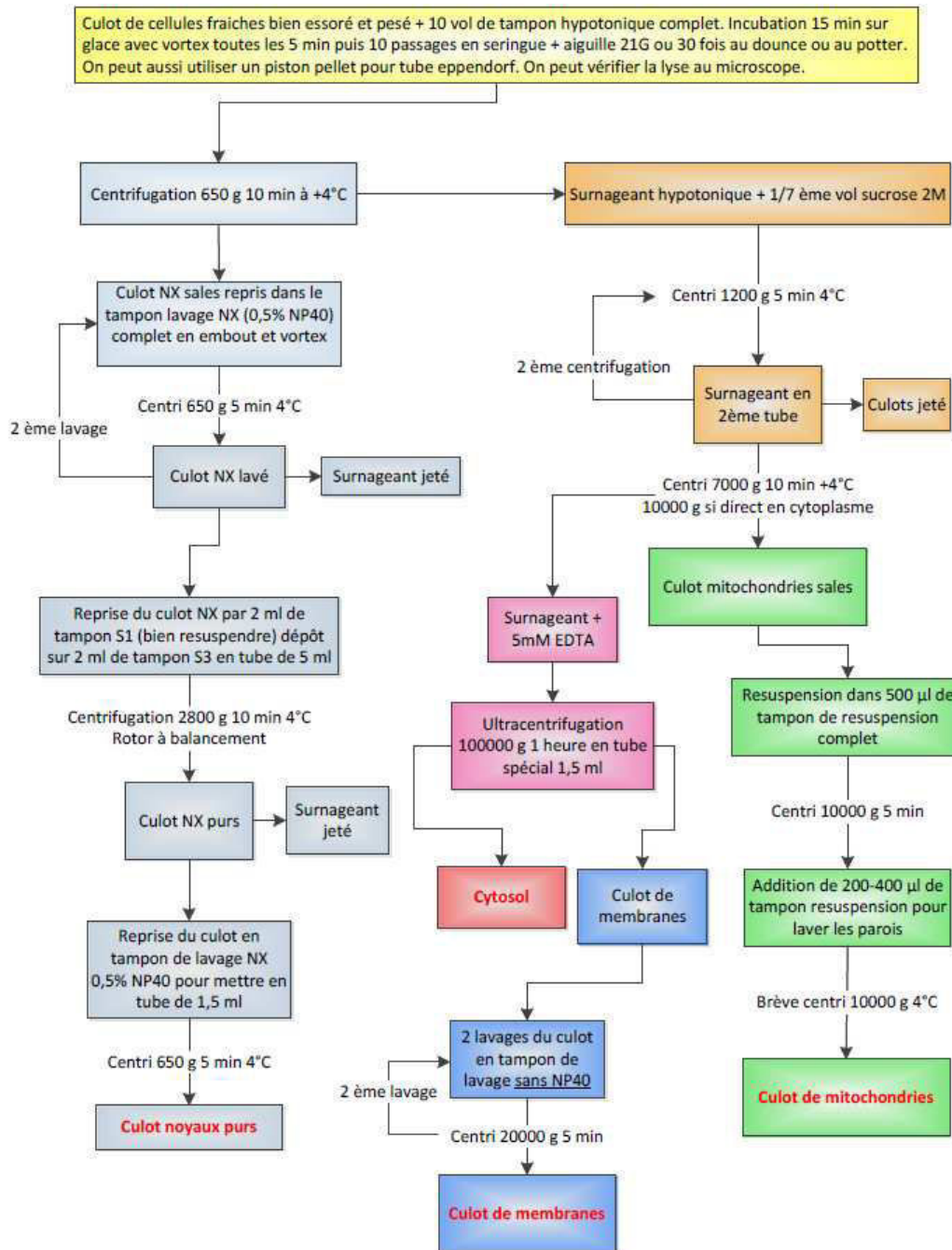


Figure 46 : Principe du fractionnement cellulaire.
NX = noyaux

RESULTATS

Résultat I

Editorial

Improving the safety of cell therapy products by suicide gene transfer

Elodie Bôle-Richard, Marina Deschamps, Christophe Ferrand, and Eric Robinet

Frontiers in Pharmacology, 2016



Editorial: Improving the safety of cell therapy products by suicide gene transfer

Elodie Bole-Richard^{1,2}, Marina Deschamps^{1,2}, Christophe Ferrand^{1,2} and Eric Robinet^{3,4*}

¹ Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale UMR 1098, Etablissement Français du Sang Bourgogne/Franche-Comté, Besançon, France, ² SFR FRD 4234 Ingénierie et Biologie Cellulaire et Tissulaire, Université de Franche-Comté, Besançon, France, ³ Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale UMR 1110, Institut de Recherche sur les Maladies Virales et Hépatiques, Strasbourg, France, ⁴ Institut Hospitalo-Universitaire de Strasbourg, Strasbourg, France

Keywords: suicide gene therapy, adoptive immunotherapy, adoptive cell therapy, inducible caspase 9, herpes simplex virus thymidine kinase

OPEN ACCESS

Edited and reviewed by:

Salvatore Salomone,
University of Catania, Italy

*Correspondence:

Eric Robinet,
eric.robinet@ihu-strasbourg.eu

Specialty section:

This article was submitted to
*Experimental Pharmacology and Drug
Discovery*,
a section of the journal
Frontiers in Pharmacology

Received: 29 July 2015

Accepted: 03 August 2015

Published: 25 August 2015

Citation:

Bole-Richard E, Deschamps M,
Ferrand C and Robinet E (2015)
Editorial: Improving the safety of cell
therapy products by suicide gene
transfer. *Front. Pharmacol.* 6:174.
doi: 10.3389/fphar.2015.00174

With the clinical demonstration of the efficacy of immune checkpoints inhibitors, immunotherapy has been considered in 2013 to be the major breakthrough for cancer therapy (Couzin-Frankel, 2013). Cell therapy and adoptive cell therapy (ACT), a method based on administration of immunocompetent cells in order to induce a therapeutic response in patients with solid cancer, hematologic malignancies, or immune diseases, have been widely and successfully tested in clinic for the past few years (Rosenberg and Restifo, 2015). Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) is the most potent and consolidated ACT approach for the immunotherapy of hematologic malignancies (Tsirigotis et al., 2014). Alternative ACT approaches rely on the selection, expansion and possibly gene modification of autologous or allogeneic immune cells, such as regulatory or effector T cells, NK cells, or dendritic cells. Chimeric antigen receptor (CAR)-T cells transfer is a very promising therapy. CARs are antigen-binding domains linked to T-cell signaling domains, allowing for a specific recognition of cell surface antigens independently of the Major Histocompatibility Complex. Many clinical trials have demonstrated the efficiency of genetically modified T cells (GMCs) to treat cancers, including CAR-T cells. However, severe side effects of allogeneic HSCT or ACT, including the induction of graft-vs.-host disease (GvHD) or on target, off tumor effects limit the use of ACT, prompting researches to improve the safety of cell therapy products.

Suicide gene therapy was initially developed with the aim of introducing in cancer cells a gene whose activation by a prodrug would provide a toxic effect toward target cells and surrounding cancer cells, an approach beyond the scope of this Research Topic. The proof-of-concept of the transfer of a suicide gene (encoding the Herpes Simplex virus thymidine kinase, HSV-tk), not directly in cancer cells but into donor T cells, prior allogeneic HSCT, in order to control their alloreactivity was first described in 1994 (Tiberghien et al., 1994). Since then, clinical trials have demonstrated the feasibility of this approach. Several suicide systems have been developed to secure cell therapy and anti-tumor immunotherapy approaches in order to avoid adverse events. In this context, the aim of this Research Topic in *Frontiers* is to provide a state of the art of available tools to secure cell therapy products.

Jones et al. (2014) present different suicide gene families and summarize clinical results obtained to date. Suicide genes are classified according to the mechanism of action developed: mAb-mediated, such as CD20 antibody, metabolic with HSV-tk and dimerization-induced with inducible Caspase-9 (iCasp9). HSV-tk has been clinically validated in allogeneic HSCT in order to kill T cells in case of GvHD, by administration of its prodrug, ganciclovir (GCV). Briefly, GCV treatment

resulted in significant reduction in the number of circulating GMCs with no acute toxicity. Some disadvantages appeared such as elimination of GMCs in several days, an immunogenicity of non-human transgene, a possible interference of GCV as antiviral in case of Cytomegalovirus (CMV) reactivation. So, alternative suicide genes have been proposed in order to decrease immunogenicity and to accelerate GMC elimination. Brenner and collaborators developed the iCasp9 suicide gene. Its prodrug, AP1903, a synthetic and non-toxic ligand, leads to iCasp9 dimerization and triggering of apoptotic pathway (Tey et al., 2007). This system allows rapid and specific GMCs' elimination and is currently tested in clinical trials. To date, the iCasp9 remains one of the most promising suicide gene secure systems. Another interesting suicide gene is the human CD20, a B-cell membrane marker that can be used both as a selection marker, allowing for the immunomagnetic sorting of transduced cells and as a suicide gene, through the *in vivo* depletion of CD20-positive cells with CD20 monoclonal antibodies, such as Rituximab. Respective pros and cons of each approach are presented by Jones et al.

The first suicide gene historically clinically used for ACT was the HSV-tk gene (Bonini et al., 1998; Tiberghien et al., 2001). The group of Bordignon and Bonini, in Milano, has the greatest clinical experience of HSV-tk GMCs infusion. Their major contribution in the field of suicide gene therapy after allogeneic HSCT is presented by Greco et al. (2015). The Milano group developed Herpes Simplex Virus thymidine Kinase (HSV-tk) suicide gene, strategy, and application and demonstrated (i) the possibility to control T-cell alloreactivity after allogeneic HSCT by infusion of ganciclovir (GCV), (ii) the ability of GMCs to provide an anti-leukemic effect and (iii) their ability to improve post-transplant immune cell reconstitution, while preserving their protective functions toward viral and bacterial infections. Their clinical trials involved several European teams, including the one of Weissinger et al. who, in their paper (Weissinger et al., 2015), present the long term follow up of patients after transfusion of HSV-TK transduced T-cells in the context of allogeneic HSCT. Clinical trials have been done between 2002 and 2007. Patients who developed a GvHD have been successfully treated with GCV and they did not observe non-functional HSV-tk gene. Today, some patients are still alive but no HSV-tk expression was detected in these patients. These studies demonstrated safety, efficacy and feasibility of using HSV-tk GMCs. Although major contributions have been provided by clinical trials using HSV-tk-engineered T cells, a major issue

remaining to be solved is related to the monitoring of GMCs in patients. In this article, Eissenberg et al. (2014) suggest to use HSV-tk for monitoring functions in order to localize GMCs. Using ^{18}F -9-(4-fluoro-3-hydroxymethylbutyl) guanine (^{18}F HFBG), it is possible to follow and monitor GMCs with PET/CT scans in order to know if cells reach their target.

Given the limitations of the HSV-tk/GCV system, a second generation of suicide gene has recently emerged, whose leader is the iCaps9. As noticed by Gargett and Brown, CAR therapy shows promising results due to partial or complete remissions observed upon infusion of CD19 CAR T-cells to patients with B-cell malignancies or after GD2 specific T-cell administration to patients with neuroblastoma (Gargett and Brown, 2014). Over 83 clinical trials using CAR T cells have been registered (www.clinicaltrials.gov). However, many serious adverse events such as cytokine storm and death can occur and have been reported. These problems are independent of the number of co-stimulatory domains and some of them are already known with chemotherapy and targeted therapies. However, today, it is necessary to improve the safety of cellular therapy products in general and particularly of CAR T cells. As presented by Gargett and Brown, the iCasp9 approach is a highly promising approach offered for securing CAR T cells. The association of CAR gene transfer with suicide gene transfer into T cells is currently reaching clinical application, but a similar approach on NK cells is still in preclinical development. To finish, Glienke and collaborators investigated CAR therapy in NK cells and the necessity to use suicide switches (Glienke et al., 2015). A lot of cancer antigens are targeted by CAR T cells in clinical trials. However, authors highlight the use of genetically modified NK cells with CAR, due to advantages of NK cells. Today, only two clinical studies are evaluating CAR-expressing NK cells. In this paper, they also noticed the importance to use suicide gene in order to secure NK-cell therapies.

As a conclusion, use of suicide system to secure new cell therapies, especially for those using gene-modified cells, is an important approach in order to improve cell therapy safety and decrease adverse effects. This Research Topic shows that many improvements have been obtained during suicide gene development and that this technology has reached a maturity that should allow now considering more systematically its use when developing innovative cell therapies, including not only ACT, but also induced pluripotent stem cells- or mesenchymal stem cell based therapies.

References

- Bonini, C., Ciceri, F., Marktel, S., and Bordignon, C. (1998). Suicide-gene-transduced T-cells for the regulation of the graft-versus-leukemia effect. *Vox Sang.* 74(Suppl. 2), 341–343.
- Couzin-Frankel, J. (2013). Breakthrough of the year 2013. Cancer immunotherapy. *Science* 342, 1432–1433. doi: 10.1126/science.342.6165.1432
- Eissenberg, L. G., Rettig, M., Dehdashti, F., Piwnicka-Worms, D., and DiPersio, J. F. (2014). Suicide genes: monitoring cells in patients with a safety switch. *Front. Pharmacol.* 5:241. doi: 10.3389/fphar.2014.00241
- Gargett, T., and Brown, M. P. (2014). The inducible caspase-9 suicide gene system as a “safety switch” to limit on-target, off-tumor toxicities of chimeric antigen receptor T cells. *Front. Pharmacol.* 5:235. doi: 10.3389/fphar.2014.00235
- Glienke, W., Esser, R., Priesner, C., Suerth, J. D., Schambach, A., Wels, W. S., et al. (2015). Advantages and applications of CAR-expressing natural killer cells. *Front. Pharmacol.* 6:21. doi: 10.3389/fphar.2015.00021
- Greco, R., Oliveira, G., Stanghellini, M. T., Vago, L., Bondanza, A., Peccatori, J., et al. (2015). Improving the safety of cell therapy with the TK-suicide gene. *Front. Pharmacol.* 6:95. doi: 10.3389/fphar.2015.00095
- Jones, B. S., Lamb, L. S., Goldman, F., and Di Stasi, A. (2014). Improving the safety of cell therapy products by suicide gene transfer. *Front. Pharmacol.* 5:254. doi: 10.3389/fphar.2014.00254

- Rosenberg, S. A., and Restifo, N. P. (2015). Adoptive cell transfer as personalized immunotherapy for human cancer. *Science* 348, 62–68. doi: 10.1126/science.aaa4967
- Tey, S. K., Dotti, G., Rooney, C. M., Heslop, H. E., and Brenner, M. K. (2007). Inducible caspase 9 suicide gene to improve the safety of alodepleted T cells after haploidentical stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* 13, 913–924. doi: 10.1016/j.bbmt.2007.04.005
- Tiberghien, P., Ferrand, C., Lioure, B., Milpied, N., Angonin, R., Deconinck, E., et al. (2001). Administration of herpes simplex-thymidine kinase-expressing donor T cells with a T-cell-depleted allogeneic marrow graft. *Blood* 97, 63–72. doi: 10.1182/blood.V97.1.63
- Tiberghien, P., Reynolds, C. W., Keller, J., Spence, S., Deschaseaux, M., Certoux, J. M., et al. (1994). Ganciclovir treatment of herpes simplex thymidine kinase-transduced primary T lymphocytes: an approach for specific *in vivo* donor T-cell depletion after bone marrow transplantation? *Blood* 84, 1333–1341.
- Tsirigotis, P., Shimoni, A., and Nagler, A. (2014). The expanding horizon of immunotherapy in the treatment of malignant disorders: allogeneic hematopoietic stem cell transplantation and beyond. *Ann. Med.* 46, 384–396. doi: 10.3109/07853890.2014.918463
- Weissingner, E. M., Borchers, S., Silvani, A., Provasi, E., Radrizzani, M., Beckmann, I. K., et al. (2015). Long term follow up of patients after allogeneic stem cell transplantation and transfusion of HSV-TK transduced T-cells. *Front. Pharmacol.* 6:76. doi: 10.3389/fphar.2015.00076

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2015 Bole-Richard, Deschamps, Ferrand and Robinet. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Résultat II

Article

Exposure to hypomethylating agent, 5-Azacytidine, may improve iCasp9 suicide gene therapy for treating GvHD in allografts

Elodie Bôle-Richard, Clémentine Gamonet, Jean-Marie Certoux, Idir Idirene, Fabrice Larosa, Eric Deconinck, Anne-Marie Mosseley, Pierre Tiberghien, Christophe Borg, Christophe Ferrand and Marina Deschamps

Gene Therapy, 2016

La modulation de l'alloréactivité post-allogreffe de moelle osseuse utilisant des lymphocytes T génétiquement modifiés (GMTC) exprimant un système suicide permet de limiter les effets indésirables de la GvHD tout en conservant les effets bénéfiques de la GvL. Plus généralement, ces systèmes permettent de sécuriser les approches de thérapie cellulaire et d'immunothérapie anti-tumorale. Dans un essai clinique de greffe haplo-identique (CASPALLO, NCT00710892), l'utilisation du gène caspase 9 inducible (iCasp9) et le traitement par un agent dimérisant (CID, Chemical Inducer of Dimerization : AP1903, Bellicum Pharmaceuticals) a permis l'élimination de plus 90% des GMTC en 30 minutes conduisant à une diminution significative des signes de GvHD chez 4 patients (Di Stasi et al., 2011). Néanmoins, il a été montré la persistance d'un faible nombre de GMTC post-traitement par CID.

Nous nous sommes intéressés à cette population de GMTC persistante après exposition au CID, afin de caractériser la perte de sensibilité de ces cellules et proposer un moyen d'amélioration de la réponse. Au laboratoire, nous avons généré par transduction rétrovirale avec un surnageant de grade clinique différentes lignées cellulaires T iCasp9/ Δ CD19+ (Jurkat et CEM). Nous avons confirmé qu'un faible pourcentage de cellules persiste après traitement au CID. L'exposition répétée à des doses croissantes de CID (0,1nM à 10nM) nous a permis de générer des lignées GMTC faibles répondeurs (GMTC_{LR}).

Nous avons montré, par cytométrie en flux et par Western blot, que comparativement aux lignées fortes répondantes (GMTC_{HR}), les GMTC_{LR} présentent une plus faible expression membranaire de Δ CD19 et intracellulaire de iCasp9. En thérapie génique, il a été montré que la cellule hôte peut contrôler l'activité transcriptionnelle des transgènes par des mécanismes d'extinction des promoteurs. Concernant les variations des niveaux d'expression des transgènes, nous avons émis l'hypothèse d'une hyper-méthylation du promoteur LTR dans les lignées GMTC_{LR}. Le statut de méthylation a été étudié par séquençage Sanger de l'ADN extrait des populations GMTC_{HR} et GMTC_{LR} après conversion au bisulfite. L'analyse avec le logiciel BISMA, a montré que le statut de méthylation est plus important dans les GMTC_{LR}, que l'on considère les séquences présentant au moins un îlot CpG méthylé ou les îlots CpG méthylés.

Le traitement des GMTC_{LR} par un agent hypo-méthylant, 5-azacytidine, permettrait de réduire la méthylation du promoteur dans le but d'induire une augmentation de l'expression des transgènes et de ce fait de restaurer la sensibilité au CID. Nous avons montré qu'une exposition au 5-aza (1 μ M), durant 4 jours, réduisait le taux de méthylation de 2,06 fois et de 2,49 fois si l'on considère respectivement le nombre de séquences ou le nombre d'îlots CpG analysés. Ce traitement reste sans effet sur le statut de méthylation du promoteur LTR des GMTC_{HR} et donc sur la sensibilité au CID. Ces résultats montrent une hyper-méthylation des LTR dans les GMTC_{LR} et une absence de toxicité du traitement sur les cellules. De manière intéressante, nous avons montré que le traitement par 5-aza augmente l'expression de Δ CD19 membranaire (cytométrie de flux) et de la protéine intracellulaire iCasp9 (western Blot). Sur le plan

fonctionnel, l'augmentation des niveaux d'expression après déméthylation des LTR des GMTC_{LR} suffit à restaurer leur sensibilité à l'AP1903 de 24,6 fois (1,8% à 43,8%) et reste sans effet sur les GMTC_{HR}.

En conclusion, ces travaux ont montré que la méthylation du promoteur LTR d'une partie des GMTC iCasp9/ Δ CD19 est à l'origine d'une faible expression des transgènes et donc d'une diminution de la capacité de réponse au CID. Le traitement par un agent hypo-méthylant (5-aza) permet de restaurer la sensibilité des GMTC_{LR} au CID et donc d'optimiser la fonctionnalité du système suicide iCasp9/AP1903.

ORIGINAL ARTICLE

Exposure to hypomethylating agent, 5-azacytidine, may improve iCasp9 suicide gene therapy for treating GvHD in allografts

E Bôle-Richard¹, C Gamonet¹, J-M Certoux¹, I Idirene¹, F Larosa^{1,2}, E Deconinck^{1,2}, A-M Mosseley³, P Tiberghien¹, C Borg¹, C Ferrand¹ and M Deschamps¹

Anti-tumor cellular immunotherapies that implement a suicide gene system can limit potential undesirable effects. In a haplo-identical bone marrow transplant clinical trial, over 90% of iCaspase-9-expressing cells were eradicated after AP1903 exposure, and signs of graft-versus-host disease disappeared. Nevertheless, low numbers of genetically modified T cells survived this treatment. We studied genetically modified cell lines (GMCL) that carried a dual iCaspase-9/ Δ CD19 DNA construct (Δ CD19 = truncated CD19). With AP1903 exposure, a low percentage of cells ($1.47 \pm 0.67\%$; $n = 5$ replications) persisted *in vitro*. Repeated exposures to increasing AP1903 doses generated low (GMCL_{LR}) and high AP1903-responders (GMCL_{HR}), which expressed different levels of surface Δ CD19 and intracellular iCaspase-9. Compared with GMCL_{HR}, GMCL_{LR} exhibited higher methylation of 5'-long-terminal repeat (LTR) promoters, both in the number of sequences with at least one methylated CpG (16 vs 51.5%, respectively) and in the number of CpG islands (1.2 vs 8.9%, respectively). Four days of 5-azacytidine exposure reduced methylation and increased Δ CD19 and iCaspase-9 expression. Interestingly, LTR demethylation restored GMCL_{LR} sensitivity to AP1903 by 24.3-fold (1.8 vs 43.8%) without affecting GMCL_{HR}. We showed that 5'-LTR-methylation inhibited transgene expression and caused AP1903 hypo-responsiveness. Treating with a hypomethylating agent restored AP1903 sensitivity. This approach can be applied in further clinical trials to improve iCaspase-9 response if low response is detected.

Gene Therapy advance online publication, 12 May 2016; doi:10.1038/gt.2016.39

INTRODUCTION

Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) remains one of the most efficient therapeutic tools for treating some hematological disorders.¹ Graft-versus-host disease (GvHD) remains a major source of morbidity and mortality after HSCT. GvHD results when mature immunocompetent donor T cells present in the graft recognize alloantigens expressed by the recipient. Depleting the T cells in a graft efficiently prevents GvHD, but it impairs desirable activities, such as graft-versus-leukemia (GvL), anti-viral immune response and graft rejection control. Alternatively, a conditional *in vivo* T-cell depletion, performed at the time of GvHD, can bypass these complications. This approach efficiently preserves beneficial (that is, GvL) and suppresses deleterious (that is, GvHD) graft effects.^{2,3}

Many approaches for modulating alloreactivity have been evaluated in several clinical trials in the context of allo-HSCT. One approach is to transfer a 'suicide gene' to cells, which sensitizes cells to a prodrug. The prodrug is not toxic to unmodified cells. Currently, several suicide gene systems are available.^{4,5} Two of the most promising suicide gene systems, which have been validated in both pre-clinical models and clinical trials, are the Herpes Simplex virus-thymidine kinase/ganciclovir (HS-TK/GCV) system^{6–9} and the chimeric, inducible caspase-9/AP1903 (iCasp9/AP1903) system.^{10–12}

We and others have identified obstacles that limit *in vitro* production of genetically modified T cells (GMTCs).^{13–19} Some limitations have also been pointed out in the HS-TK/GCV/Neo

system. For example, it takes 5–7 days to eliminate GMTCs; some non-human transgenes are immunogenic;^{20,21} GCV may interfere with expression, in cases of CMV reactivation; the G418 selection displays toxicity; and the response may be incomplete, because only dividing GMTCs are affected or because the HS-TK gene may undergo alternative splicing.^{22,23} These drawbacks may be circumvented with the iCasp9/ Δ CD19/AP1903 system.^{24–26} This system is based on human-derived transgenes, which reduce immunogenicity; it is designed to eliminate GMTCs rapidly (within a few hours), including non-dividing cells; and it utilizes a non-toxic, synthetic chemical inductor of dimerization (CID), known as AP1903. This prodrug does not preclude the use of ganciclovir as a CMV prophylactic or treatment. The iCasp9-mediated suicide system has been widely applied in cell therapy approaches, including HSCT,¹² induced pluripotent stem cell safeguarding,²⁷ chimeric antigen receptor T-cell redirection^{28,29} or mesenchymal stromal cell transfers.³⁰ However, the most convincing demonstration of the power of this suicide tool was its use in T-cell allodepletion in a clinical trial, in the context of haplo-identical transplantation.¹⁰ In that study, T cells modified with iCasp9 induced GvHD, but within 30 min after AP1903 administration the major portion of cytotoxic donor cells (>90%) were eliminated, and concomitantly, the GvHD was eradicated. However, a small proportion of donor CD19⁺/CD3⁺ GMTCs remained in the peripheral blood of patients after treatment with AP1903, and these cells remained detectable for 9 months after infusion. When these GMTCs were recovered from blood samples

¹Laboratoire de Thérapeutique Immuno-Moléculaire et cellulaire des cancers, INSERM UMR1098, Etablissement Français du Sang Bourgogne Franche-Comté, Université de Franche-Comté, SFR FED4234, Besançon, France; ²CHU Jean Minjot, Hematology Department, Besançon, France and ³Bellicum pharmaceuticals, Houston, TX, USA. Correspondence: Dr M Deschamps, Laboratoire de Thérapeutique Immuno-Moléculaire et cellulaire des cancers, INSERM UMR1098, Etablissement Français du Sang Bourgogne Franche-Comté, Université de Franche-Comté, SFR FED4234, 8, rue du Docteur Jean-François-Xavier Girod, Besançon 25020, France.

E-mail: marina.deschamps@efs.sante.fr

Received 2 November 2015; revised 26 March 2016; accepted 7 April 2016; accepted article preview online 25 April 2016

with fluorescence-activated cell sorting, it was shown that, *in vitro*, these residual cells were sensitive to a second dose of AP1903. Moreover, *in vitro* reactivation of GMTCs with OKT3 and an anti-CD28 antibody, 22 days post-transduction, increased transgene expression, which led to restored sensitivity, and the killing efficiency improved.¹² Nevertheless, this method would be risky in patients since infusion of an anti-CD28 mAb (TGN1412) into six healthy volunteers in a phase I clinical trial caused a cytokine release storm, followed by severe adverse effects, which limited the use of this approach.³¹

Another way to increase transgene expression is to inhibit DNA methylation.³² 5-azacytidine (5-aza) is a fully compatible candidate, because it is known to trap DNA methyl transferase 1,³³ and it is well-tolerated after HSCT.³⁴ Moreover, it can preserve the GvL effect by upregulating the expression of tumor antigens in malignant cells, and it mitigates GvHD by expanding the number of regulatory T cells.^{33,35}

The aim of this work was to characterize cells that were genetically modified to express iCasp9, but exhibited low-AP1903 responses. We investigated the mechanism underlying this incomplete apoptosis sensitivity and we tested 5-aza solutions to improve the responses to AP1903 treatment. Our results might provide a basis for future clinic trials to test 5-aza associated with AP1903 as an improved suicide gene therapy for controlling allogeneic HSCT.

RESULTS

AP1903 exposure led to incomplete eradication of iCasp9/ Δ CD19⁺ GMTC

We examined specimens from four healthy donors that participated in a pre-clinical study, performed in the context of a future clinical trial (Side by Side). We prepared peripheral blood mononuclear cell (PBMC) samples to study the response to the

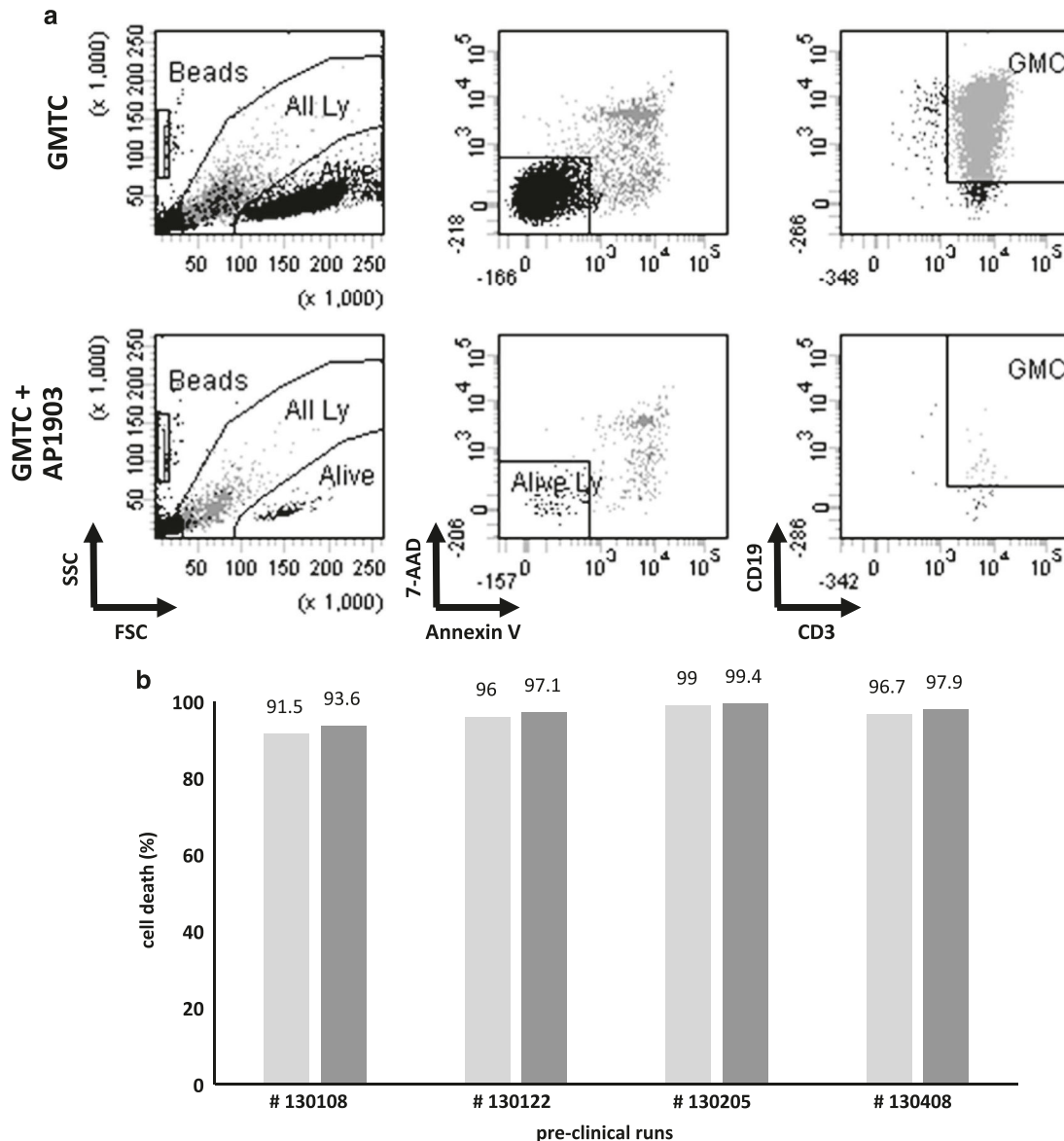


Figure 1. Exposure to AP1903 led to incomplete eradication of iCaspase-9/ Δ CD19⁺ genetically modified T cells. **(a)** Dot plots show characteristics of GMTCs before (top row) and after (bottom row) treatment with AP1903. FSC/SSC and CD3/CD19 were used to characterize cells and cell phenotype. Annexin V/7-AAD staining was used to study cell death induced by AP1903 treatment. Alive, viable cell fraction; All ly, all lymphocytes. **(b)** Histogram shows percentage of cell death in four patient samples from a pre-clinical trial. Killing efficiency was normalized to that observed in control cells (untreated cells); light gray bars, final product; dark gray bars, isolated CD19⁺ GMTCs.

AP1903 compound. PBMCs were transduced with a retroviral construct that conferred iCasp9/ Δ CD19 expression. The mean transduction efficiency, analyzed with CD3/CD19 staining and flow cytometry, was $36.3 \pm 4.8\%$ ($n=4$). Four days after transduction, we submitted the transduced cell product to CD19 immunomagnetic cell sorting. The percentage of CD3⁺/CD19⁺ cells in the final sorted product was $94.9 \pm 1.9\%$ ($n=4$, data not shown).

To assess killing efficiency, we used Trucount tubes, which provided clear discrimination between dead cells and cell debris; this assay provided an accurate estimation of the % Cell death (Figure 1a). One day after AP1903 exposure, the mean killing efficiency observed for the four pre-clinical samples was $95.8 \pm 3.1\%$ for the final product (immunomagnetic cell-sorted fraction) and $97.0 \pm 2.5\%$, for the isolated fraction of CD3⁺/CD19⁺ GMTCs (immunomagnetic cell-sorted fraction gated on CD3⁺/CD19⁺ cells) (Figure 1b). Thus, a mean of $3 \pm 2.5\%$ of CD3⁺/CD19⁺ GMTCs remained alive after AP1903 exposure.

In vitro repeated AP1903 exposure of iCasp9/ Δ CD19⁺ transduced T-cell lines led to low-responder cells

We generated AP1903-resistant cell lines by repeatedly exposing cells to increasing doses of AP1903, from 0.1 to 10 nM (clinical dose). As shown in Figure 2a, first, we found that CEM and Jurkat T-cell lines had different sensitivities to AP1903. With exposure to the first (and lowest) AP1903 dose, we noticed that 21% of CEM and 43% of Jurkat cells were sensitive to AP1903, and underwent apoptosis.

Second, we found that, interestingly, after successive exposures to AP1903, in the presence of the highest dose (10 nM), 99% of both cell lines remained alive (Figure 2b). This population of AP1903-resistant cells was used in this study. Thus, these data highlighted two cell populations with different AP1903 response levels, which we called high- and low-responder cells (GMTC_{HR} and GMTC_{LR}, respectively).

Low-AP1903 response was directly linked to the iCaspase-9 pathway

To determine whether the low response to AP1903 was directly linked to the iCaspase-9 pathway, we induced apoptosis by irradiating cells (70 Gy). A killing efficiency analysis demonstrated that the two cell lines were not different in their sensitivity to irradiation (Figure 3a). Moreover, western blot analyses indicated that a caspase cascade was activated by irradiation in the CEM cell lines. We detected caspase-9 and -3 cleavage fragments in GMCL_{HR}

treated with either AP1903 or irradiation. In contrast, we detected high levels of cleaved-caspase-9 and -3 in GMCL_{LR} only after irradiation (Figure 3b). The cell surface expression levels of cell-death receptors, Fas and TRAIL (DR4 and DR5), were not different between GMCL_{HR} and GMCL_{LR} (Supplementary Data S1). These results indicated that the low response of GMCL_{LR} to AP1903 exposure was directly linked to the iCasp9 pathway. The same results were obtained with Jurkat GMCLs (data not shown).

GMCLs with a low-AP1903 response displayed the lowest Δ CD19 and iCaspase-9 expression

We first analyzed Δ CD19 expression on the cell surfaces of the GMCL_{HR} and GMCL_{LR} with flow cytometry. We showed that Δ CD19 expression was higher in GMCL_{HR} compared with GMCL_{LR}; for CEM cell lines, the ratios of fluorescence intensity (RFIs) were 147.7 ± 30 vs 45.1 ± 7.6 ($n=2$), respectively, and for Jurkat cell lines RFIs were 6.8 ± 0.1 vs 2.7 ± 0.3 ($n=3$), respectively (Figure 4a). Moreover, the fold changes in RFI between GMCL_{HR} and GMCL_{LR} were similar for CEM and Jurkat cell lines (3.3-fold and 2.5-fold, respectively).

The pSFG.iCasp9- Δ CD19 retroviral vector was based on the viral 2A system, which provided stoichiometric expression of the iCaspase-9 and Δ CD19 proteins. The 2A-like sequence used in the construct is derived from *Thosea Asigna* insect virus. It is one of the most efficiency 2A-like system allowing >99% cleavage between a glycine and terminal proline residue.^{12,36} Based on our previous results, we hypothesized that GMCL_{LR} would express low levels of iCaspase-9. This hypothesis was confirmed in western blots, which showed that the pro-iCaspase-9 signal (47 kDa) was always higher in the GMCL_{HR} than in the GMCL_{LR}. The 82 kDa polyprotein iCasp9-2A- Δ CD19 has never been detected by western blot. Interestingly, treating with AP1903 led to full proteolytic processing of pro-iCaspase-9 to iCaspase-9 -cleaved forms (30–36 kDa) in the GMCL_{HR}, but not in the GMCL_{LR} (Figure 4b). Due to the multicistronic system (viral 2A peptide), Δ CD19 expression levels corresponded to iCaspase-9 expression levels; therefore, Δ CD19 expression reflected the sensitivity to AP1903-induced apoptosis.

To confirm the direct links between Δ CD19 cell surface expression, intracellular iCaspase-9 production and sensitivity to AP1903, we performed cell-sorting to identify three different Δ CD19-positive GMCL fractions, according to CD19 fluorescence intensity (Figure 4c). These CEM GMCL fractions showed increasing killing efficiencies of 54.8%, 61.6.0% and 85.3%, respectively, that corresponded to low (RFI = 2.3 ± 0.28), medium (RFI = 4.3 ± 0.28) and high (RFI = 6.3 ± 1.98) Δ CD19 expression (Figure 4d). Plotting the

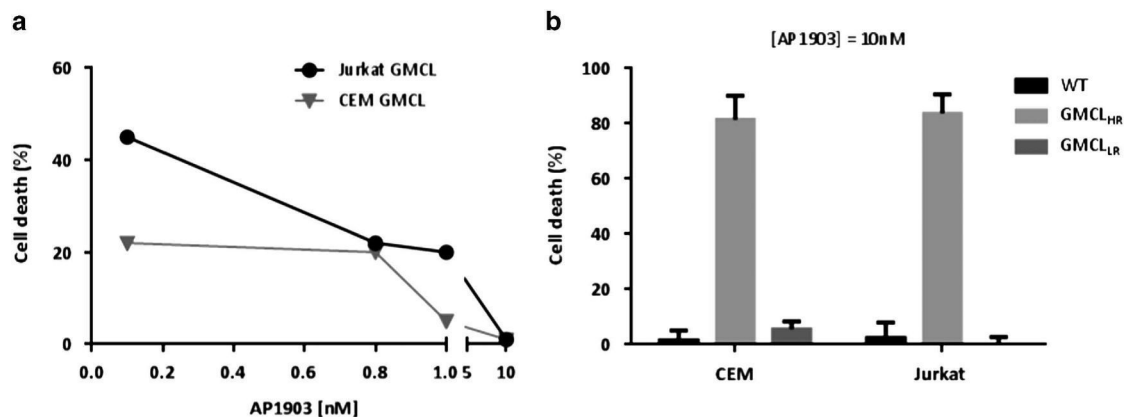


Figure 2. Genetically modified T-cell lines with low response to AP1903 were generated *in vitro* after repeated exposure to AP1903. Two different T-cell lines, CEM (triangles) and Jurkat (circles) were genetically modified (GMCLs) to express the suicide gene iCaspase-9 and the cell surface marker CD19. GMCLs were exposed to increasing doses of AP1903. (a) Kinetics of cell death after 24-h AP1903 exposure. Every 10 days, cells that survived the prior AP1903 exposure were again exposed to an increased dose of AP1903. The percentage of cells killed was determined with trypan blue staining. (b) Cell death evaluated in T-cell lines with annexin-V-7-AAD staining revealed two populations of cells with low (GMTC_{LR}) and high (GMTC_{HR}) responses to AP1903 ($n=3$ for each T-cell lines).

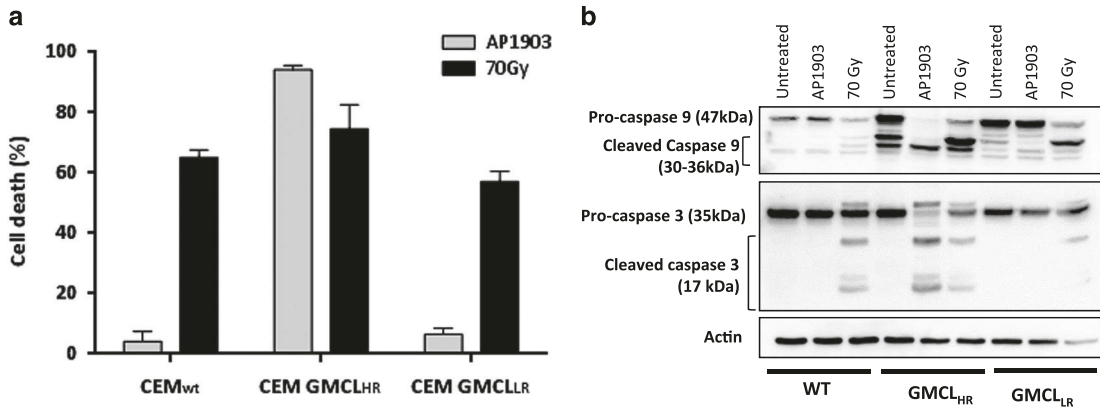


Figure 3. Low-AP1903 response was directly linked to the iCaspase-9 pathway. **(a)** Histogram shows percentage of CEM cell death at 24 h after irradiation (70 Gy) or AP1903 (10 nM) exposure. Cell death was evaluated in the indicated cell populations with annexin-V-7-AAD staining ($n = 3$). **(b)** Western blot analysis of caspase pathway after irradiation (70 Gy) or AP1903 (10 nM) exposure. CEM cell lines were tested 24 h after treatment in the indicated cell populations. Actin hybridization was used as a protein-loading control ($n = 3$).

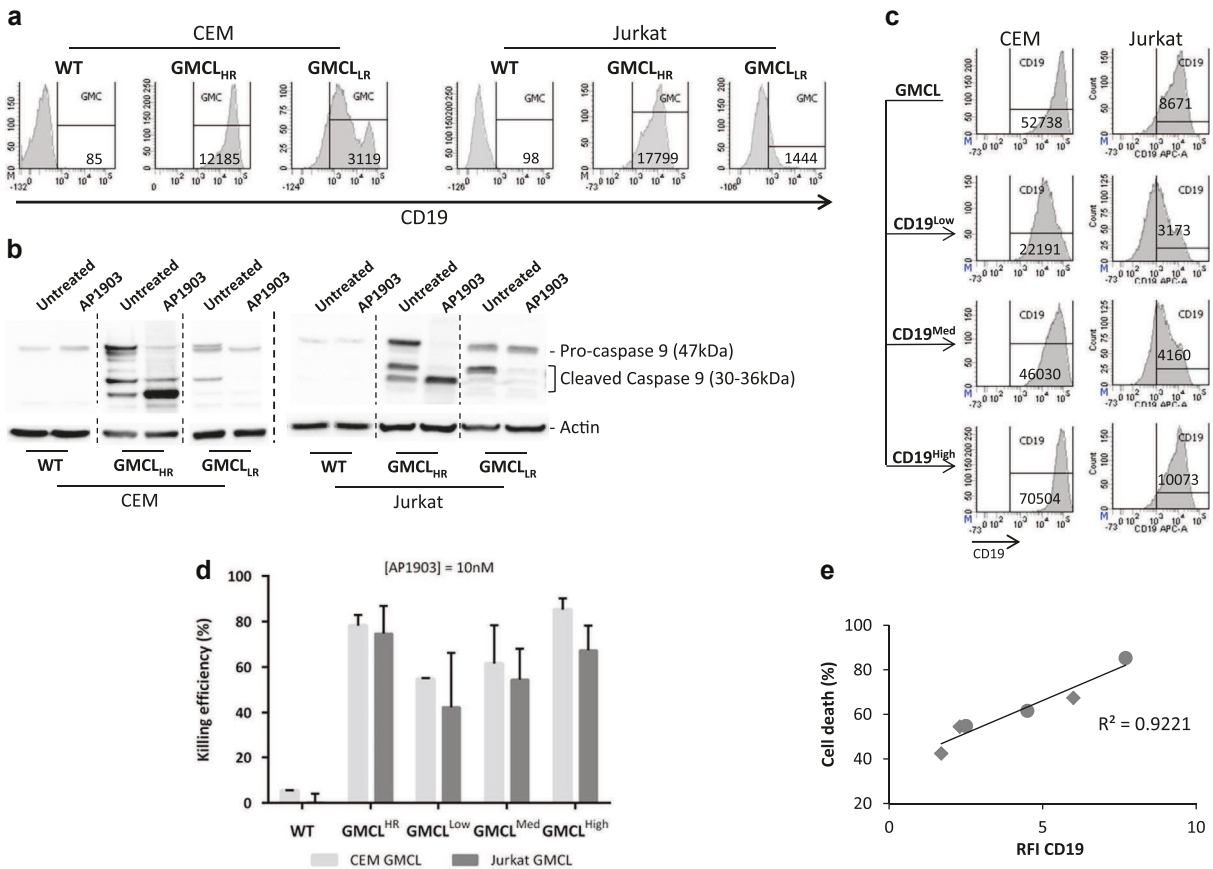


Figure 4. Direct correlation between Δ CD19 and iCaspase-9 transgene expression and AP1903 killing efficiency. **(a)** Fluorescence-activated cell-sorting (FACS) histograms show Δ CD19 cell surface expression in T-cell lines (Jurkat and CEM) that were unmodified (WT), or genetically modified (GMCL) and showed high or low responses to AP1903 (GMCL_{HR} and GMCL_{LR}, respectively). Values on each histogram indicate the mean fluorescence intensity (MFI) detected from fluorescently labeled anti- Δ CD19 antibodies. **(b)** Western blot analysis shows caspase-9 processing in untransduced, GMCL_{HR} and GMCL_{LR} cells before (untreated) and after AP1903 (10 nM, 24 h) exposure. Actin was used as a protein-loading control ($n = 3$). **(c)** Cell-sorting protocol for isolating three different CEM and Jurkat GMCL subpopulations, according to the MFI of Δ CD19 signals (MFI values are shown on each histogram). GMCL_{High}, high Δ CD19 expression; GMCL_{Low}, low Δ CD19 expression; GMCL_{Med}, intermediate Δ CD19 expression. **(d)** The percent AP1903 killing efficiency is shown for the three different GMCL subpopulations, determined by annexin-V-7-AAD staining ($n = 2$). **(e)** Correlation between Δ CD19 cell surface expression (RFI: Ratio Fluorescence Intensity of Δ CD19/CD4) and killing efficiency (%) for two different T-cell lines, Jurkat (diamonds) and CEM (circles). R^2 is the correlation coefficient.

ΔCD19 RFIs against the corresponding killing efficiencies confirmed a direct correlation ($R=0.9221$) between killing efficiency and transgene expression levels (Figure 4e).

Retroviral LTR promoter methylation status was associated with the response to AP1903

In gene therapy, it is well-known that viral LTR promoter methylation leads to transcriptional repression, and thus, transgene silencing. This type of transcriptional repression can be alleviated by treating with a hypomethylating agent. We reasoned that treating our cells with a hypomethylating agent might restore transgene expression and sensitivity to AP1903-induced apoptosis. We determined that 5-aza may be a good candidate for hypomethylation, because, in allogeneic HSCT, it is used to mitigate GvHD without compromising GvL. To treat genetically modified cell lines (GMCLs) with 5-aza, we first defined the best treatment sequence to optimize the improvement in transgene expression. Thus, cell lines were incubated with 5-aza for 1–5 days, and on the last day AP1903 (10 nM) was added (Figure 5a). Based on the levels of transgene expression, killing efficiency and 5-aza toxicity, we determined that 4 days of 5-aza exposure provided the greatest improvement in GMCL_{LR} suicidal activity, with < 20% toxicity (Figure 5b).

We analyzed the methylation status in the majority (16 out of 20) of CpG islands located in the 5'-LTR promoters in DNA

isolated from CEM GMCL_{HR} or -GMCL_{LR}, after treating with or without 5-aza (Figure 5c). Figure 5d shows the results of sequencing individual cloned PCR products obtained from bisulfite DNA. The squares indicate the 16 CpG islands, and black squares correspond to methylated sequences. It was clear that the methylation status of GMCL_{LR} was higher than that of GMCL_{HR}, whether we considered the number of sequences that carried at least one methylated CpG island (16 vs 51.5%) or the number of methylated CpG islands among all CpG sites (1.2 vs 8.9%) (Figures 5d and e). In GMCL_{LR}, 5-aza treatment reduced the percent methylation from 51.5 to 25% (2.06-fold reduction) of the number of sequences, and from 8.9 to 3.57% (2.49-fold reduction) of CpG sites (Figures 5d and e). Functionally, the reduction in methylation of the DNA in GMCL_{LR} after treatment with 5-aza was correlated to the increase in cell death (from 1.8 to 43.8% = 24.3-fold increase; Figures 5d and e). Interestingly, in GMCL_{HR}, we did not identify any significant effect of 5-aza treatment, on either the methylation level (methylation without vs with 5-aza: 16 vs 14.2% of sequences and 1.2 vs 1.07% of CpG islands) or cell death (death without vs with 5-aza: 88.1 vs 92.8%), consistent with an absence of 5-aza toxicity.

Based on these data, we concluded that the methylation status was directly correlated with the sensitivity to AP1903-induced cell suicide.

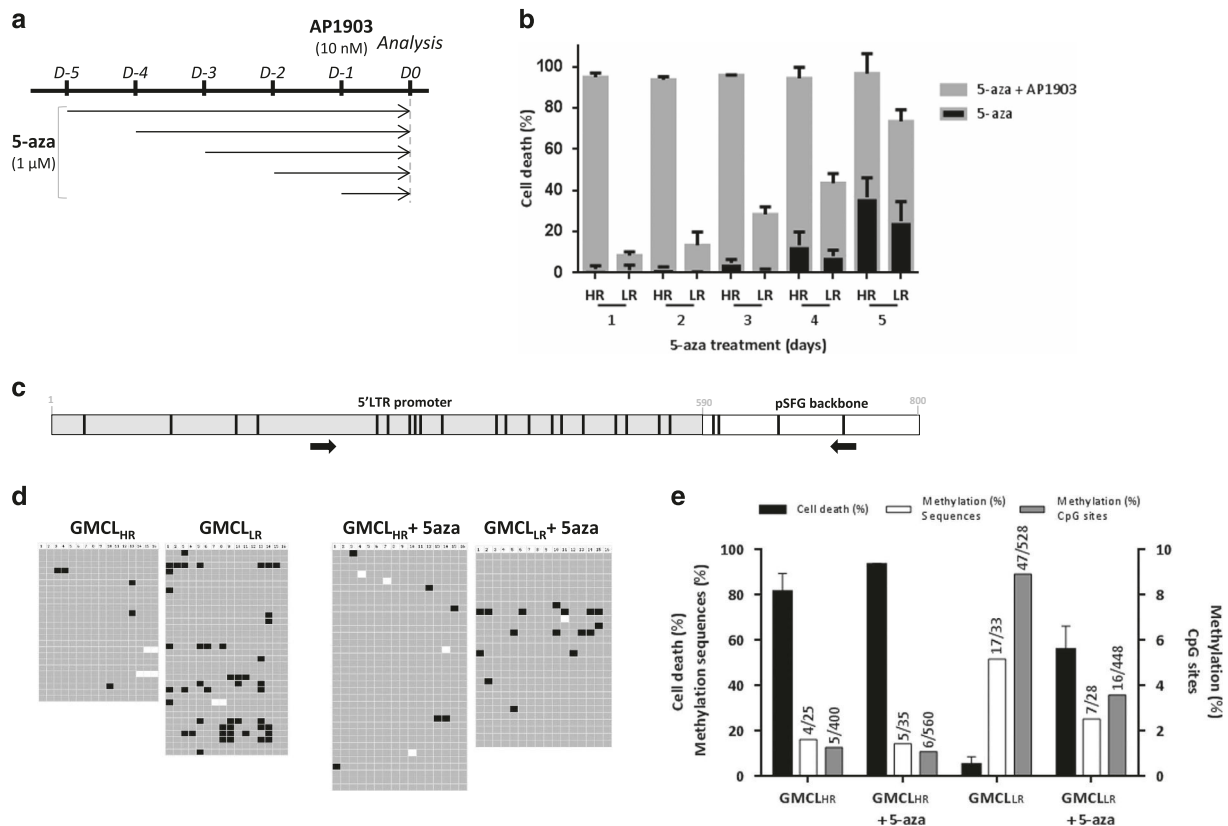


Figure 5. Methylation status of the retroviral LTR promoter was associated with the level of response to AP1903. **(a)** Schematic timeline of 5-azacytidine (5-aza) treatments. 5-aza (1 μ M) was applied for 1–5 days (D-1 to D-5) and AP1903 (10 nM) was applied on the last day (D-1) before analysis (D0). **(b)** The % of cell death in the presence of 5-aza alone (black bars) or 5-aza combined with AP1903 (5-aza+AP1903, gray bars) in genetically modified CEM cells that showed high or low responses to AP1903 (HR and LR, respectively). **(c)** Schematic representation of the PCR target region (primers indicated with arrows) and the CpG positions (vertical lines). **(d)** Graphic representation of methylation patterns in genetically modified CEM cell lines (CEM GMCL) that showed high or low responses to AP1903 (GMCL_{HR} and GMCL_{LR}, respectively). Each row corresponds to one DNA sequence, and each column represents one CpG site, numbered from 1 to 16, starting from the 5' end of the LTR PCR product: box colors represent residues that were methylated (black), unmethylated (gray) or unknown (white). **(e)** Methylation levels (%) were calculated over all individually analyzed sequences (left axis, white bars) or based on the number of CpG sites (right axis, gray bars). The percent cell death in each population, in the presence or absence of 5-aza is also indicated (black bars, left axis). Numbers of individual DNA sequences analyzed: CEM GMCL_{HR} ($n=25$), CEM GMCL_{HR}5-aza ($n=35$), CEM GMCL_{LR} ($n=33$), CEM GMCL_{LR}5-aza ($n=28$).

5-aza exposure increased GMCL_{LR} transgene expression and AP1903 sensitivity

We then subjected GMCL_{HR} and GMCL_{LR} to 5-aza treatment for 4 days, followed by AP1903 exposure on the last day. Flow cytometry analysis of Δ CD19 transgene expression did not show any effect on GMCL_{HR}, but we noted a 4.5-fold increase ($n=5$) on GMCL_{LR} (Figures 6a and b). A western blot analysis showed that 5-aza increased both the pro- and cleaved forms of iCaspase-9 in GMCL_{HR} and GMCL_{LR}. Addition of AP1903 led to an increase in pro-iCaspase-9 cleavage in GMCL_{LR} (Figure 6c). Finally, we demonstrated that 5-aza added to AP1903 treatment induced better killing efficiency (22.1-fold compared with AP1903 alone) in GMCL_{LR} (Figure 6d). To conclude, we showed that pretreatment with 5-aza reduced DNA methylation, which enhanced the expression of the suicide transgene and increased AP1903-induced apoptosis.

DISCUSSION

It was previously demonstrated that, in HSCT applications, GvHD, immune reconstitution, and viral and bacterial infections could be modulated early after HSCT with the administration of allogeneic T cells engineered to express a gene that conferred susceptibility to apoptosis (suicide gene). Two suicide gene systems, the HS-TK/GCV system³⁷ and, more recently, the iCaspase-9/AP1903 system, have

been validated in clinical trials.¹¹ Previous studies have shown that the iCaspase-9/AP1903 system was safe and powerful. In four young patients that had developed GvHD, a single dose of dimerizing drug (AP1903) eliminated over 90% of the GMTC within 30 min of administration, and the GvHD had resolved.¹⁰ However, although the GvHD disappeared, a small number of non-clinically alloreactive GMTCs remained that had not responded to AP1903. In suicide gene systems, control over adverse events requires, as much as possible, the depletion of GMTCs. In our clinical approach (Side by CIDE), only allo-GMTCs will be infused into patients; therefore, unlike the clinical trial of Di Stasi *et al.*,¹⁰ the donor alloreactive CD25⁺ T cells cannot be depleted with the anti-CD25 immunotoxin, RFT5-SMPT-dgA. Therefore, this study focused on mechanisms of AP1903 resistance.

First, we confirmed that the small percentage of GMTCs that showed a partial response to AP1903 comprised cells with low- Δ CD19 expression. Thus, due to the viral 2A-like cleavage peptide system, these cells also showed low-iCaspase-9 expression. We assessed transgene expression with either flow cytometry to detect Δ CD19 or with western blotting to detect iCaspase-9 cleavage. In both cases, transgene expression was directly correlated to killing efficiency. Although iCaspase-9 and Δ CD19 proteins are separately expressed after 2A peptide self-cleavage, both proteins are translated from the same mRNA. Transcription of iCaspase-9/ Δ CD19 mRNA is driven by a single LTR promoter.

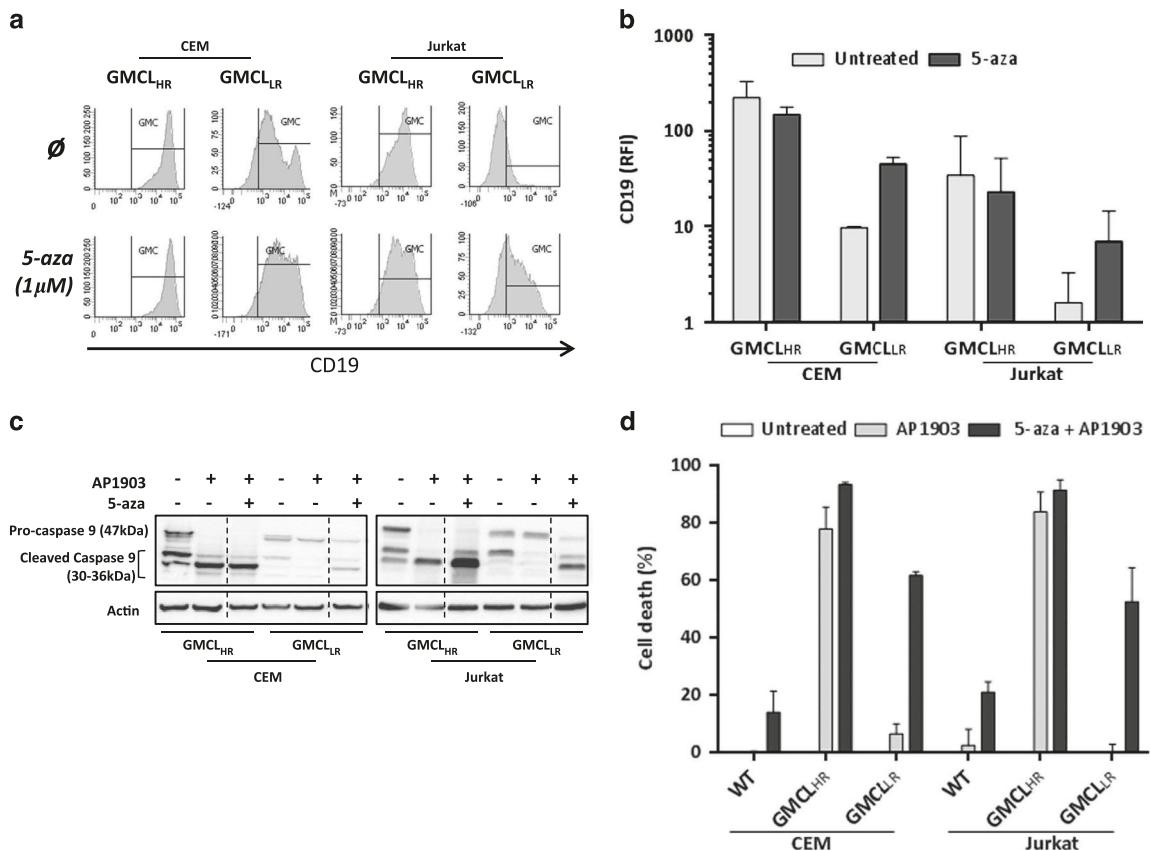


Figure 6. 5-azacytidine exposure increased transgene expression and improved AP1903 GMCL sensitivity. **(a)** Fluorescence-activated cell-sorting (FACS) histograms show cell surface Δ CD19 expression in T-cell lines (Jurkat and CEM) that were genetically modified (GMCL) and showed high or low responses to AP1903 (GMCL_{HR} and GMCL_{LR}, respectively). Cells were pretreated for 4 days in the absence (ϕ) or presence of 5-azacytidine (1 μ M 5-aza). Values on each histogram indicate the mean fluorescence intensity (MFI) detected from fluorescently labeled anti- Δ CD19 antibodies. **(b)** Histogram represents the ratio of fluorescence intensity of Δ CD19/CD4 (Δ CD19 RFI) for each cell line (GMCL_{HR} and GMCL_{LR}), after no treatment (untreated) or 4 days of 5-aza pretreatment ($n=2$ for CEM cell lines and $n=3$ for Jurkat cell lines). **(c)** Western blot analysis shows caspase-9 processing and actin expression (as a loading control) in Jurkat and CEM GMCL_{HR} and GMCL_{LR} cells. Cells were untreated (–) or treated (+) with 1 μ M 5-aza (4 days), 10 nM AP1903 (1 day) or both. **(d)** Killing efficiency in the absence (untreated) or presence of 5-aza alone or 5-aza+AP1903 treatment in CEM and Jurkat wild-type (WT), GMCL_{HR} and GMCL_{LR} cells ($n=2$ for CEM cell lines and $n=3$ for Jurkat cell lines).

In gene therapy, it was shown that reduction of transcriptional activity in host cells can be due to silencing retroviral elements involving different defense mechanisms. This can be mediated by endogenous factors that bind to the LTR promoter or by methylation of CpG islands to inhibit transgene expression.³⁸ Our results showed that both iCaspase-9 and Δ CD19 were simultaneously downregulated in GMCLs, which indicated that the LTR was a good target for studying methylation status. Thus, we hypothesized, and confirmed, that the weak transgene expression in GMCL_{LR} was associated with a higher level of methylation in the LTR promoter than that found in GMCL_{HR}. This finding was consistent with that of Straathof *et al.*,¹¹ who also demonstrated, with an iCaspase-9-2A-GFP retroviral vector, that low-GFP expression in GMTCs was associated with low-AP1903 responses. In the present work, we provide one explanation for reductions in transgene expression. However, low-response phenomenon is a low-frequency event.

For clinical purposes, cells that express a non-immunogenic membrane-bound marker (Δ CD20, Δ CD34, Δ CD19 or Δ NGFR) can be selected with immunomagnetic cell sorting to identify cells with high-transgene expression. However, some GMTCs with low-transgene expression may be selected with immunomagnetic cell sorting, and these may cause adverse events, because they can escape AP1903 toxicity. Thus, an additional treatment may be useful for restoring AP1903 sensitivity to GMTCs that express iCaspase-9. It was shown that a second *in vitro* activation (OKT3 / CD28) of iCaspase-9 in GMTCs¹² and a second *in vitro* exposure of GMTCs to the dimerizer, after circulating *in vivo*,¹⁰ could eliminate residual GMTCs. The former treatment is not relevant for clinical purposes, because it will have an important impact on unmanipulated T cells derived from the bone marrow graft. Moreover, the use of *in vivo* anti-CD28 mAbs can lead to serious adverse events (cytokine storm), as previously described.³¹

The hypomethylating agent, 5-aza, provides several beneficial effects. It is compatible with HSCT settings, because it is well-tolerated after transplantation.³⁴ Also, it upregulates HLA-DR expression, and it upregulates the epigenetically silenced tumor antigens; consequently, it induces a CD8⁺ T-cell response against tumor antigens, and thus, contributes to the GvL effect.^{33,39} 5-aza also inhibits DNA methyl transferase activity, which increases iCaspase-9 transgene expression and increases AP1903 killing efficiency. Finally, it increases regulatory T-cell expansion, and consequently limits GvHD.^{33,35}

The present work confirmed that, among the GMTCs produced with our clinical-grade supernatant, a small portion that expressed the iCaspase-9 suicide gene displayed a low response to the AP1903 dimerizer. This study was the first to show that the low sensitivity to AP1903 was linked to a high level of methylation in the LTR promoter. This epigenetic phenomenon could be reversed by treating with the 5-aza hypomethylating agent. As reported by others, 5-aza treatment has already been tested to induce demethylation of gene in the treatment of tumor-bearing mice.⁴⁰ Plumb *et al.*,⁴⁰ demonstrated that 5-aza could increase gene expression without toxicity (weight loss or other sign). Moreover, 5-aza could also be used to enhance other molecules such as lintuzumab in pre-clinical models of acute myeloid leukemia.⁴¹ However, this strategy remains to be tested in future clinical trials, and the best sequence of treatment remains to be defined. Moreover, in the present study, we did not identify a mechanism that conferred a specific resistance to AP1903; thus, the suicide system iCasp9/AP1903 represents an optimal system for safe, effective gene therapy. The monitoring of circulating GMTCs of our phase I-IIb clinical trial 'Side by CIDE', a biomedical research based on GMTCs expressing iCaspase-9 and Δ CD19 in context of hematopoietic stem cell allo-graft, will give us complementary information. It will allow us to better characterize the low-responder cells after *in vivo* injection of AP1903.

In conclusion, this study addressed an interesting issue in HSCT, and our results provided a means to improve and ensure GvHD control in cases of persistent, alloreactive GMTCs. This approach should be evaluated in future clinical trials.

MATERIAL AND METHODS

Peripheral blood cells, cell lines and retrovirus

Human T-cell lines, CEM (ATCC, Molsheim, France; CCL-119) and Jurkat (DSMZ, Braunschweig, Germany; ACC282) were stored in an internal master cell bank for non-ambiguous identification. Cell lines were cultured in RPMI1640 (Lonza, Paris, France) supplemented with 10% heat-inactivated, endotoxin-free fetal calf serum (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France).

Peripheral blood cell samples of healthy donors were collected at the French Blood Center (Besançon, France) after obtaining written informed consent.

Retroviral supernatant was produced at the Cell & Gene Therapy Center (Houston, TX, USA) from a PG13 packaging cell line that had been transfected with the SFG.iCasp9-2A- Δ CD19.vector.¹⁰

Retroviral transduction of iCaspase-9/ Δ CD19 gene to produce GMCs

GMTCs (primary cells or cell lines) that expressed iCaspase-9/ Δ CD19 were generated by retroviral transduction in a six-well-retronectin ($1.2 \mu\text{g cm}^{-2}$ in PBS overnight at 4 °C, Takara, Shiga, Japan) -coated plate. PBMCs were activated with CD3/CD28 beads for 3 days prior to transduction. Cells were then spin-transduced (1.5 h, 2000 g, 10 °C) with the retroviral particles. Transduction efficiency was determined by performing flow cytometric analysis to identify Δ CD19 cell surface marker expression. Four days after transduction, Δ CD19-positive cells were magnetically labeled with CD19 microbeads (CD19 microbeads, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) and loaded onto a MACS Column (Miltenyi Biotec), according to the manufacturer's protocol. The isolated Δ CD19-expressing cells were expanded and cryopreserved.

All GMCs used in this study met the predefined release criteria for clinical trials (Side by CIDE). Cultures comprised >92% CD3⁺/CD19⁺ cells, and AP1903 exposure induced over 90% growth inhibition.

Induction of apoptosis with AP1903 \pm 5-aza and generation of low-responder cell lines

Suicide gene functionality in GMCs was assessed by adding to the culture medium the synthetic molecule AP1903 (Bellicum Pharmaceuticals, Houston, TX, USA) at 10 nM final concentration. During cell production, the functionality of iCaspase-9 transgene was verified by adding AP1903 on the day following CD19 immunomagnetic cell sorting. Cell death was evaluated 24 h later with flow cytometry.

To generate AP1903-low-responder cell lines (GMCL_{LR}), viable CEM and Jurkat cells that expressed iCaspase-9/ Δ CD19⁺ were treated with serially increasing doses of AP1903 (from 0.1 to 10 nM). In some cases, a single dose of 5-aza (1 μM , Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) was added to GMCLs from 1 to 5 days before, or concurrently with, AP1903 treatment.

Immunophenotyping and cell-death analysis

Cell-surface phenotype was investigated with the following monoclonal antibodies: anti-CD3, anti-CD4, (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) and anti-CD19 (Miltenyi Biotec). Antibody binding was detected on a Canto II flow cytometer with Diva software (Becton Dickinson). Appropriately matched isotype controls were included in all immunophenotyping analyses.

Cell death was first assessed visually by counting dead cells that could take up trypan blue. For more precise cell-death analysis, cells were stained with annexin-V and 7-aminoactinomycin (7-AAD) (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA) after 24 h of AP1903 treatment, and analyzed with flow cytometry. Fluorescence analysis was gated on CD3⁺/CD19⁺ positive cells. Cells were considered viable when they were negative for both annexin-V and 7-AAD.

The absolute cell-death quantification was determined with Trucount tubes (Becton Dickinson) after acquiring 5000 or 10000 fluorescent beads with flow cytometry. Thus, we evaluated cell killing as follows: %Dead cells = [1 - (absolute number of viable cells in AP1903-treated cells/absolute number of viable cells in untreated cells)] \times 100.

Western blotting

Cells were lysed, cooled by incubating on ice, by sonication in RIPA buffer supplemented with a protease inhibitor cocktail (complete Mini EDTA-free; Roche, Bâle, Switzerland). Lysate protein content was quantified with a BCA protein assay. Then, equivalent amounts of cell extract (20 µg proteins) were fractionated on SDS-PAGE, and separated proteins were electrotransferred onto Polyfluorure de vinylidene membranes. Membranes were probed overnight with primary antibodies (diluted at 1:1000) that bound to human caspases 3, 8, 9 and 10 (#9662, #4790 S, #9502 S, #9752 S, Cell Signaling, Danvers, MA, USA). We added antibodies (diluted 1:10⁶) that recognized β-actin (clone AC15, #A5441, Sigma-Aldrich) as an internal loading control. For immunodetection, we added the following secondary antibodies (diluted at 1:24 000): horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit IgG (#111-035-144, Jackson, West Grove, PA, USA) or sheep anti-mouse IgG (#515-035-062, Jackson). Then, we added enhanced chemiluminescence detection reagents, and chemiluminescence was detected with a camera and Bio-1D software (Vilber-Lourmat, Collegien, France).

Methylation status analysis

Conversion of unmethylated DNA cytosine residues to uracil with bisulfite was performed with the MethylEdge Bisulfite Conversion System (Promega, Madison, WI, USA), according to the manufacturer's protocol. Converted DNA was subjected to PCR with primers that specifically recognized the 5'-LTR promoter region, designed with Methyl primer express v1.0 software (Life technologies, Courtaboeuf, France). The region targeted by the primers included most of the CpG islands (16 of 20). The primer sequences were: 5LTRbi-Fw 5'-AAGGATTGAAATGATTTGTG-3'; 5LTRbi-Rv 5'-CTAAACAATCRAACAACACAA-3'. The PCR products were gel-purified and cloned into the pCR2.1 TOPO vector with the TOPO TA Cloning Kit (Life technologies). DNA was purified from selected bacterial colonies with the NucleoSpin plasmid Kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany). For each culture condition, at least 20 individual bacterial colonies were Sanger-sequenced. Then, sequences were aligned to the unmethylated LTR sequence for analysis with the BISMA software.⁴² To evaluate the methylation status, we analyzed the methylation level (%) observed over all individual sequences and the number of CpG sites that were found to be informative.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Pr Malcolm Brenner (Center for Cell and Gene Therapy, Baylor College of Medicine, Houston, USA) for providing research grade of packaging cell line and retroviral supernatant. We also thank Pr David Spencer (Bellicum Pharmaceuticals, Houston, USA) for providing research grade AP1903 Chemical Inducer Dimerizer and for revising this manuscript. This study was supported by the 'Programme Hospitalier de Recherche Clinique' (PHRC #950898), the 'Ligue Nationale contre le Cancer' (2013), Etablissement Français du sang (APR 2013) and Région de Franche-Comté (Grant 2013); it was co-funded, in part, by the 2013/A02 tender of the Association Capucine and the Société Française de Greffe de Moelle—Thérapie Cellulaire (SFGM-TC).

AUTHOR CONTRIBUTIONS

EB-R executed all experiments, including cell cultures, flow cytometry and western blotting, and she wrote the original draft of the manuscript. CG, Il and J-MC assisted with retroviral transductions, GMTC production and AP1903 resistance. A-MM, PT and CB contributed to improving the manuscript and provided final approval. ED and FL provided relevant information of clinical interest and information on future clinical trials. CF and MD initiated and designed the study, participated in every step of the study, managed the whole project and wrote the manuscript.

REFERENCES

- Appelbaum FR. Haematopoietic cell transplantation as immunotherapy. *Nature* 2001; **411**: 385–389.
- Bonini C, Ferrari G, Verzeletti S, Servida P, Zappone E, Ruggieri L *et al*. HSV-TK gene transfer into donor lymphocytes for control of allogeneic graft-versus-leukemia. *Science* 1997; **276**: 1719–1724.

- Tiberghien P, Cahn JY, Brion A, Deconinck E, Racadot E, Herve P *et al*. Use of donor T-lymphocytes expressing herpes-simplex thymidine kinase in allogeneic bone marrow transplantation: a phase I-II study. *Hum Gene Ther* 1997; **8**: 615–624.
- Marin V, Criolioli E, Philip B, Tettamanti S, Pizzitola I, Biondi A *et al*. Comparison of different suicide-gene strategies for the safety improvement of genetically manipulated T cells. *Hum Gene Ther Methods* 2012; **23**: 376–386.
- Introna M, Barbui AM, Bambiacioni F, Casati C, Gaipa G, Borleri G *et al*. Genetic modification of human T cells with CD20: a strategy to purify and lyse transduced cells with anti-CD20 antibodies. *Hum Gene Ther* 2000; **11**: 611–620.
- Bonini C, Grez M, Traversari C, Ciceri F, Markt S, Ferrari G *et al*. Safety of retroviral gene marking with a truncated NGF receptor. *Nat Med* 2003; **9**: 367–369.
- Ciceri F, Bonini C, Markt S, Zappone E, Servida P, Bernardi M *et al*. Antitumor effects of HSV-TK-engineered donor lymphocytes after allogeneic stem-cell transplantation. *Blood* 2007; **109**: 4698–4707.
- Ciceri F, Bonini C, Stanghellini MT, Bondanza A, Traversari C, Salomoni M *et al*. Infusion of suicide-gene-engineered donor lymphocytes after family haploidentical haemopoietic stem-cell transplantation for leukaemia (the TK007 trial): a non-randomised phase I-II study. *Lancet Oncol* 2009; **10**: 489–500.
- Tiberghien P, Ferrand C, Lioure B, Milpied N, Angonin R, Deconinck E *et al*. Administration of herpes simplex-thymidine kinase-expressing donor T cells with a T-cell-depleted allogeneic marrow graft. *Blood* 2001; **97**: 63–72.
- Di Stasi A, Tey SK, Dotti G, Fujita Y, Kennedy-Nasser A, Martinez C *et al*. Inducible apoptosis as a safety switch for adoptive cell therapy. *N Engl J Med* 2011; **365**: 1673–1683.
- Straathof KC, Pule MA, Yotnda P, Dotti G, Vanin EF, Brenner MK *et al*. An inducible caspase 9 safety switch for T-cell therapy. *Blood* 2005; **105**: 4247–4254.
- Tey SK, Dotti G, Rooney CM, Heslop HE, Brenner MK. Inducible caspase 9 suicide gene to improve the safety of allodepleted T cells after haploidentical stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 2007; **13**: 913–924.
- Coito S, Sauce D, Duperrier A, Certoux JM, Bonyhadi M, Collette A *et al*. Retrovirus-mediated gene transfer in human primary T lymphocytes induces an activation- and transduction/selection-dependent TCR-B variable chain repertoire skewing of gene-modified cells. *Stem Cells Dev* 2004; **13**: 71–81.
- Sauce D, Tonnelier N, Duperrier A, Petracca B, de Carvalho Bittencourt M, Saadi M *et al*. Influence of ex vivo expansion and retrovirus-mediated gene transfer on primary T lymphocyte phenotype and functions. *J Hematother Stem Cell Res* 2002; **11**: 929–940.
- Sauce D, Bodinier M, Garin M, Petracca B, Tonnelier N, Duperrier A *et al*. Retrovirus-mediated gene transfer in primary T lymphocytes impairs their anti-Epstein-Barr virus potential through both culture-dependent and selection process-dependent mechanisms. *Blood* 2002; **99**: 1165–1173.
- Sauce D, Mercier P, Battini JL, Ferrand C, Certoux JM, Manel N *et al*. Preferential retroviral-mediated transduction of EBV- and CMV-specific T cells after polyclonal T-cell activation. *Gene Ther* 2004; **11**: 1019–1022.
- Ferrand C, Robinet E, Contassot E, Certoux JM, Lim A, Herve P *et al*. Retrovirus-mediated gene transfer in primary T lymphocytes: influence of the transduction/selection process and of ex vivo expansion on the T cell receptor beta chain hypervariable region repertoire. *Hum Gene Ther* 2000; **11**: 1151–1164.
- Deschamps M, Robinet E, Certoux JM, Mercier P, Sauce D, De Vos J *et al*. Transcriptome of retrovirally transduced CD8+ lymphocytes: influence of cell activation, transgene integration, and selection process. *Mol Immunol* 2008; **45**: 1112–1125.
- Sauce D, Rufier N, Mercier P, Bodinier M, Remy-Martin JP, Duperrier A *et al*. Retrovirus-mediated gene transfer in polyclonal T cells results in lower apoptosis and enhanced ex vivo cell expansion of CMV-reactive CD8 T cells as compared with EBV-reactive CD8 T cells. *Blood* 2003; **102**: 1241–1248.
- Mercier-Letondal P, Deschamps M, Sauce D, Certoux JM, Milpied N, Lioure B *et al*. Early immune response against retrovirally transduced herpes simplex virus thymidine kinase-expressing gene-modified T cells coinfecting with a T cell-depleted marrow graft: an altered immune response? *Hum Gene Ther* 2008; **19**: 937–950.
- Traversari C, Markt S, Magnani Z, Mangia P, Russo V, Ciceri F *et al*. The potential immunogenicity of the TK suicide gene does not prevent full clinical benefit associated with the use of TK-transduced donor lymphocytes in HSCT for hematologic malignancies. *Blood* 2007; **109**: 4708–4715.
- Garin M, Garrett E, Tiberghien P, Apperley JF, Chalmers D, Melo JV *et al*. Molecular mechanism for ganciclovir resistance in human T lymphocytes transduced with retroviral vectors carrying the herpes simplex virus thymidine kinase gene. *Blood* 2001; **97**: 122–129.
- Deschamps M, Mercier-Letondal P, Certoux JM, Henry C, Lioure B, Pagneux C *et al*. Deletions within the HSV-tk transgene in long-lasting circulating gene-modified T cells infused with a hematopoietic graft. *Blood* 2007; **110**: 3842–3852.
- lulicci JD, Oliver SD, Morley S, Ward C, Ward J, Dalgarno D *et al*. Intravenous safety and pharmacokinetics of a novel dimerizer drug, AP1903, in healthy volunteers. *J Clin Pharmacol* 2001; **41**: 870–879.

- 25 Spencer DM, Wandless TJ, Schreiber SL, Crabtree GR. Controlling signal transduction with synthetic ligands. *Science* 1993; **262**: 1019–1024.
- 26 Fan L, Freeman KW, Khan T, Pham E, Spencer DM. Improved artificial death switches based on caspases and FADD. *Hum Gene Ther* 1999; **10**: 2273–2285.
- 27 Zhong B, Watts KL, Gori JL, Wohlfahrt ME, Enssle J, Adair JE *et al*. Safeguarding nonhuman primate iPS cells with suicide genes. *Mol Ther* 2011; **19**: 1667–1675.
- 28 Casucci MF, Nicolis di Robilant L, Dual B. Transgenesis of T cells with a novel CD44v6-specific chimeric antigen receptor and a suicide gene for safe and effective targeting of chemoresistance in hematopoietic tumors. *Blood* 2011; **2**: 378–382.
- 29 Budde LE, Berger C, Lin Y, Wang J, Lin X, Frayo SE *et al*. Combining a CD20 Chimeric Antigen Receptor and an Inducible Caspase 9 Suicide Switch to Improve the Efficacy and Safety of T Cell Adoptive Immunotherapy for Lymphoma. *PLoS One* 2013; **8**: e82742.
- 30 Ramos CA, Asgari Z, Liu E, Yvon E, Heslop HE, Rooney CM *et al*. An inducible caspase 9 suicide gene to improve the safety of mesenchymal stromal cell therapies. *Stem Cells* 2010; **28**: 1107–1115.
- 31 Suntharalingam G, Perry MR, Ward S, Brett SJ, Castello-Cortes A, Brunner MD *et al*. Cytokine storm in a phase 1 trial of the anti-CD28 monoclonal antibody TGN1412. *N Engl J Med* 2006; **355**: 1018–1028.
- 32 Di Ianni M, Terenzi A, Perruccio K, Ciernelli R, Lucheroni F, Benedetti R *et al*. 5-Azacytidine prevents transgene methylation in vivo. *Gene Ther* 1999; **6**: 703–707.
- 33 Choi J, Ritchey J, Prior JL, Holt M, Shannon WD, Deych E *et al*. In vivo administration of hypomethylating agents mitigate graft-versus-host disease without sacrificing graft-versus-leukemia. *Blood* 2010; **116**: 129–139.
- 34 de Lima M, Giral S, Thall PF, de Padua Silva L, Jones RB, Komanduri K *et al*. Maintenance therapy with low-dose azacitidine after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for recurrent acute myelogenous leukemia or myelodysplastic syndrome: a dose and schedule finding study. *Cancer* 2010; **116**: 5420–5431.
- 35 Goodyear OC, Dennis M, Jilani NY, Loke J, Siddique S, Ryan G *et al*. Azacitidine augments expansion of regulatory T cells after allogeneic stem cell transplantation in patients with acute myeloid leukemia (AML). *Blood* 2012; **119**: 3361–3369.
- 36 Kim JH, Lee SR, Li LH, Park HJ, Park JH, Lee KY *et al*. High cleavage efficiency of a 2 A peptide derived from porcine teschovirus-1 in human cell lines, zebrafish and mice. *PLoS One* 2011; **6**: e18556.
- 37 Bonini C, Bondanza A, Perna SK, Kaneko S, Traversari C, Ciceri F *et al*. The suicide gene therapy challenge: how to improve a successful gene therapy approach. *Mol Ther* 2007; **15**: 1248–1252.
- 38 Herbst F, Ball CR, Tuorto F, Nowrouzi A, Wang W, Zavidij O *et al*. Extensive methylation of promoter sequences silences lentiviral transgene expression during stem cell differentiation in vivo. *Mol Ther* 2012; **20**: 1014–1021.
- 39 Jabbour E, Giral S, Kantarjian H, Garcia-Manero G, Jagasia M, Kebriaei P *et al*. Low-dose azacitidine after allogeneic stem cell transplantation for acute leukemia. *Cancer* 2009; **115**: 1899–1905.
- 40 Plumb JA, Strathdee G, Sludden J, Kaye SB, Brown R. Reversal of drug resistance in human tumor xenografts by 2'-deoxy-5-azacytidine-induced demethylation of the hMLH1 gene promoter. *Cancer Res* 2000; **60**: 6039–6044.
- 41 Sutherland MK, Yu C, Anderson M, Zeng W, van Rooijen N, Sievers EL *et al*. 5-azacytidine enhances the anti-leukemic activity of lintuzumab (SGN-33) in preclinical models of acute myeloid leukemia. *MAbs* 2010; **2**: 440–448.
- 42 Rohde C, Zhang Y, Reinhardt R, Jeltsch A. BISMA--fast and accurate bisulfite sequencing data analysis of individual clones from unique and repetitive sequences. *BMC Bioinformatics* 2010; **11**: 230.

Supplementary Information accompanies this paper on Gene Therapy website (<http://www.nature.com/gt>)

Résultat III

Protocole Clinique

Recherche biomédicale portant sur l'utilisation de lymphocytes T génétiquement modifiés exprimant le gène inductible de la caspase-9 humaine (iCasp9) et le gène de sélection Δ CD19 dans la greffe hématopoïétique allogénique : Etude de phase I

Side by CIDE

Suicide T cell gene therapy by using a Chemical Inducer of Dimerization of iCaspase-9

Promoteur de l'essai : CHRU de Besançon.

Numéro EudraCT : 2013-003154-24

Le protocole clinique *Side by CIDE* est un essai de phase I monocentrique destiné à évaluer l'utilisation de LT génétiquement modifiés exprimant le gène suicide de la iCasp9, activable en cas de déclenchement de la maladie du greffon contre l'hôte, dans le cadre de la greffe hématopoïétique allogénique déplétée en LT et LB.

Une première étude clinique utilisant le système suicide de la iCasp9 a déjà été réalisée aux Etats-Unis par l'équipe de Malcolm K Brenner : *CASPALLO Trial* (NCT00710892). Cette étude a inclus 10 patients pédiatriques âgés de 3 à 17 ans en rechute après une greffe de cellules souches hématopoïétiques (Di Stasi et al., 2011; Zhou et al., 2014). Les patients ont reçu une dose escalade de LT iCasp9 allant de 1.10^6 à 10.10^6 cellules/kg (1.10^6 n=2, 3.10^6 n=2, 10.10^6 n=6). L'injection des LT a été réalisée 30 à 90 jours après la greffe. Dans cette étude, 4 patients ont développé une GvHD qui a pu être contrôlée par une injection d'AP1903.

Au laboratoire, une première étude clinique portant sur l'administration de lymphocytes T exprimant le gène *HSV-TK* avec un greffon médullaire T-déplété a été menée entre 1996 et 2000. Après activation par l'anti-CD3 et l'IL-2 et transduction avec un vecteur contenant le gène *HSV-tk* et le gène de résistance à la néomycine, les cellules étaient sélectionnées en présence de G418. Une cohorte de 12 patients à haut risque de GvHD a reçu entre 2.10^5 et 2.10^6 CGM/kg avec un greffon T-déplété en provenance d'un donneur familial géno-identique à J0 (Tiberghien et al., 2001). Parmi les 4 GvHD observées, 3 ont répondu à un traitement par GCV seul alors que l'adjonction de corticoïdes était nécessaire dans un cas. Cette étude a permis de démontrer la faisabilité et l'absence de toxicité aigüe de l'administration de lymphocytes T du donneur exprimant le gène suicide *HSV-tk* ainsi que la *néomycine phosphotransférase*, lors d'une greffe de moelle osseuse allogénique T-déplétée.

Sur la base de cette première étude, notre équipe a voulu poursuivre l'évaluation du bénéfice potentiel de telles cellules exprimant un gène suicide, associées à un greffon médullaire T- et B-déplété. Le protocole *Side by CIDE* doit inclure 12 patients adultes à haut risque de GvHD qui recevront des LT iCasp9 en même temps que le greffon médullaire T & B déplété (**Figure 47**).

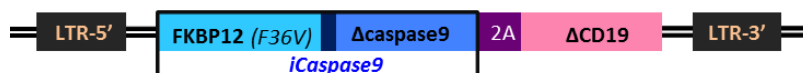


Figure 47 : Construction rétrovirale pSFG iCaspase9-2A-ΔCD19.

Cette construction a été utilisée pour modifier génétiquement les LT dans l'essai *CASPALLO*. C'est cette construction qui sera également utilisée pour le protocole *Side by CIDE*.

La cohorte sera traitée selon un schéma d'escalade de doses : 3 patients à 2.10^6 CGM/kg, 3 patients à 5.10^6 CGM/kg et tous les autres patients à 10.10^6 CGM/kg. Le passage au palier de dose supérieur est conditionné par l'absence de GvHD de grade III-IV et l'absence d'effets indésirables inattendus de grade \geq III. Dans tous les cas, si des effets indésirables inattendus de grade \geq III surviennent un retour au palier

précédent sera entrepris après avis de l'investigateur. Si une GvHD de grade \geq II survient, l'AP1903 sera administré et conduira à l'élimination spécifique des LT iCasp9 permettant ainsi l'amélioration de l'état clinique du patient. Si l'administration d'AP1903 n'a pas d'effet sur la GvHD, un traitement immunosuppresseur sera donné pour contrôler la maladie.

Par rapport au protocole précédent TKO, différentes modifications permettant notamment d'améliorer les fonctions des CGM ont été apportées afin de poursuivre l'évaluation du bénéfice potentiel de lymphocytes T exprimant un gène suicide, associés à un greffon médullaire T- et B-déplété. Ces modifications sont résumées dans le **Tableau VI**. Des modifications du processus de production des cellules génétiquement modifiées (activation, gène de sélection, méthode de sélection temps de culture) vont ainsi nous permettre d'améliorer les fonctions de CGM. L'utilisation du système iCasp9/AP1903 permet une meilleure sensibilité à la mort cellulaire comparativement au système HSV-tk/GCV et également une meilleure élimination des cellules γ compris des cellules quiescentes, en plus des cellules en division. Ce système utilise des protéines humaines (et non virales) permettant ainsi de limiter les réponses immunes anti-CGM. En ce qui concerne la préparation du greffon médullaire, une déplétion des cellules CD3+/CD19+ est réalisée à la place de la sélection CD34+. Elle doit permettre de conserver le bénéfice potentiel de populations lymphoïdes ou « accessoires » non T et non B tout en déplaçant sélectivement des populations lymphoïdes impliquées dans la survenue de GvHD. Enfin, Le nombre de CGM injectées est augmenté afin d'accroître les effets facilitateurs sur la prise de greffe (minimiser les risques de rejet), les effets GvL ainsi que la compétence immunologique post transplantation.

Tableau VI : Tableau comparatif des études TKO-I et Side by Side réalisées par notre équipe.

	TKO (1996-1999)	Side by Side (2016)	Conséquences
Activation des LT	OKT3 + IL-2	CD3/CD28 + IL-2	Amélioration des fonctions des CGM <i>in vivo</i>
Vecteur rétroviral	G1 Tk1SvNa HS-tk wt + NeoR	SFG-iCasp9-2A- Δ CD19	Gènes humains : Immunogénicité limitée Diminution du temps de culture Toxicité limitée pendant la sélection
Sélection des CGM	Culture en G418	Tri immuno- magnétique Δ CD19	Sélection rapide et directe Diminution du temps de culture
Temps de culture	12 jours	9 jours	Diminution du temps de culture
Préparation de la moelle	Sélection positive CD34+	Déplétion CD3+/CD19+	Déplétion sélective des populations lymphoïdes impliquées dans la survenue de GvHD Maintien du bénéfice potentiel de populations lymphoïdes non T et non B
Conditionnement pré-greffe	Thiotepa, Cytoxan et TBI	Cytoxan et TBI ou Bisulfan	Conditionnement moins toxique
Dose de CGM administrée / kg	2.10^5 (n=5), 6.10^5 (n=5), 2.10^6 (n=5)	2.10^6 (n=3), 5.10^6 (n=3), 10.10^6 (n=6)	
Prophylaxie post greffe	Ciclosporine	Pas de prophylaxie	Amélioration des fonctions des lymphocytes et des CGM et de manière plus générale, des compétences immunologiques après greffe. Limitation de la toxicité médicamenteuse chez les receveurs.
Activation du gène suicide	Ganciclovir	AP1903	Élimination rapide des cellules quiescentes et en division Pas d'interférence avec les traitements anti-viraux

Dans le cadre de mon contrat CIFRE débuté en 2013, j'ai participé à la mise en place du protocole clinique *Side by CIDE* en prenant part, notamment, à la réalisation des manipulations expérimentales demandées par l'ANSM lors des différentes soumissions du dossier (**Figure 48**). Le 16 mars 2016, l'ANSM a donné son accord pour le lancement du protocole clinique *Side by CIDE*. Ainsi, nous espérons pouvoir inclure les premiers patients à l'automne 2016.

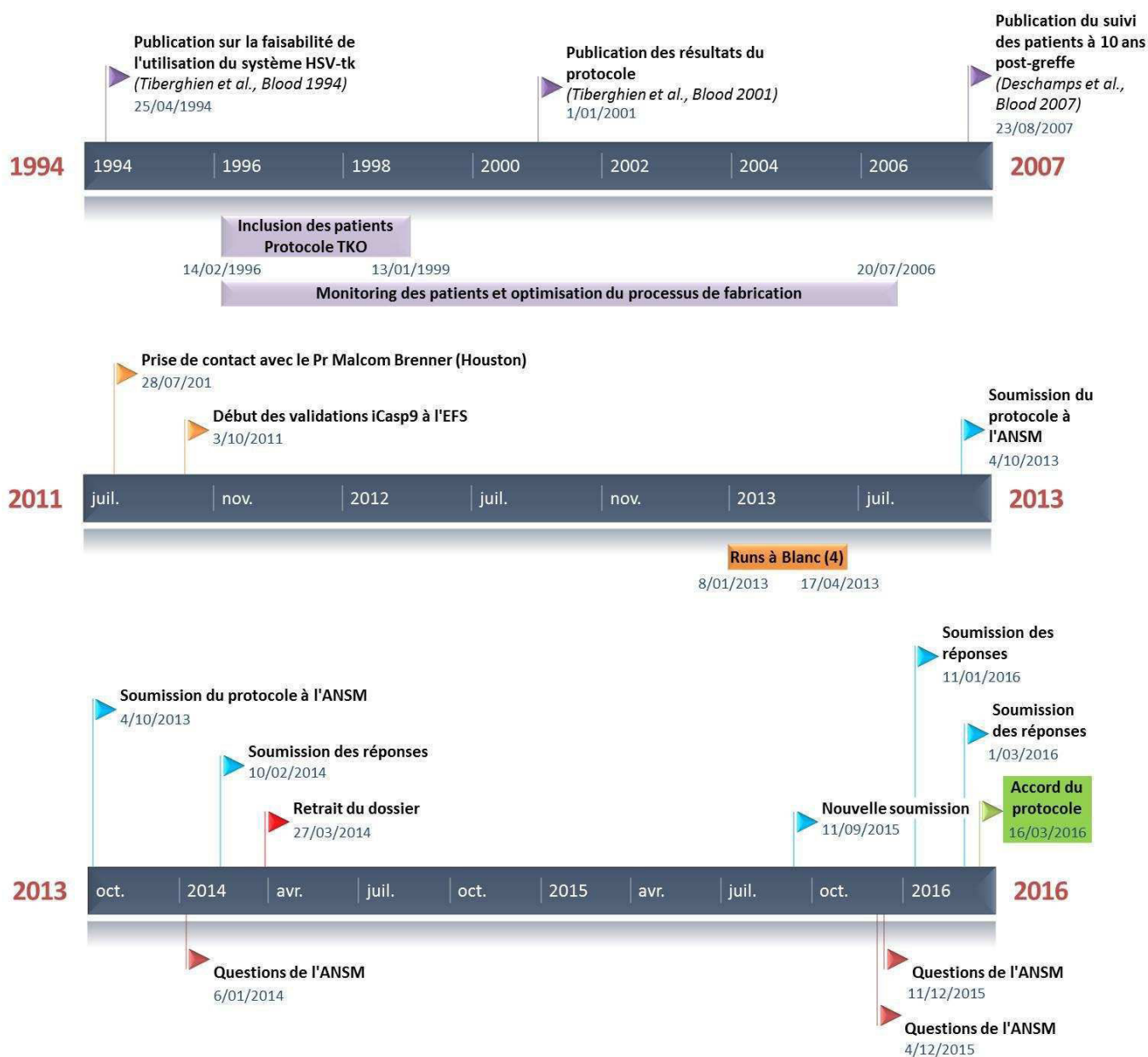


Figure 48 : Étapes allant de la recherche à la soumission et l'acceptation du protocole *Side by CIDE* à l'ANSM.

Comme nous avons pu le voir avec *Side by CIDE*, le passage de la recherche à la clinique est très long. Ainsi, une recherche innovante peut être dépassée en arrivant en clinique comme l'utilisation de γ -rétrovirus plutôt que de lentivirus que l'ANSM nous a reproché dans un premier temps.

Résultat IV

Données non publiées

Développement d'une construction de reprogrammation du microenvironnement tumoral

Développement d'un CAR dirigé contre l'antigène EGFRvIII

Développement d'une construction de reprogrammation du microenvironnement tumoral

Comme nous l'avons vu, la mise en place d'un microenvironnement tumoral accompagne fréquemment l'échappement tumoral. En effet, cellules tumorales sont capables de surexprimer des récepteurs inhibiteurs de la réponse immunitaire telles que PDL-1, CTLA-4 ou FasL, de favoriser le développement de populations immuno-régulatrices (MDSC, Tregs) mais aussi de sécréter des molécules inhibitrices comme le TGF β ou l'IL-10 (Beavis et al., 2016; Kerkar and Restifo, 2012; Maus and June, 2016). Grâce à l'immunothérapie, le but est donc d'améliorer les capacités des cellules par l'expression de cytokines et de récepteurs aux chémokines.

Nous disposons d'une construction génique permettant la production d'IL-12 sous le contrôle d'un promoteur conditionnel (RE-NFAT) (**Figure 49**).

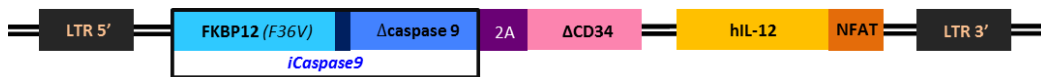


Figure 49 : Vecteur rétroviral pSFG-iCasp9.2A.ΔCD34 / hIL-12.NFAT.

Cette stratégie permet la production spécifique d'IL-12 sur le site tumoral, modulant ainsi le microenvironnement tumoral.

La synthèse de ce vecteur a été réalisée par la société GeneCust. Nous avons ensuite pu générer une lignée d'empaquetage PG13 pour ce vecteur (94,4% ΔCD34 positive). Les lymphocytes T primaires obtenus par transduction rétrovirale montrent une efficacité de transduction de 5,3% +/- 1% (n=5) (**Figure 50**).

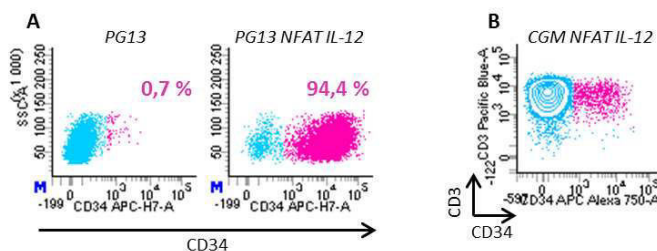


Figure 50 : Expression du transgène Δ CD34 suite à la transduction avec le vecteur rétroviral pSFG-iCasp9.2A.ΔCD34/hIL-12.NFAT.

A : lignée d'empaquetage PG13 produisant le surnageant ; B : efficacité de transduction des LT (exemple représentatif).

La fonctionnalité de la construction dans les LT génétiquement modifiés a été évaluée après enrichissement de la fraction CD34 par tri magnétique. Les lymphocytes génétiquement modifiés ont été activés avec de la PMA-ionomycine pendant 24h et l'IL-12 sécrétée a été dosée par test ELISA (**Figure 51**).

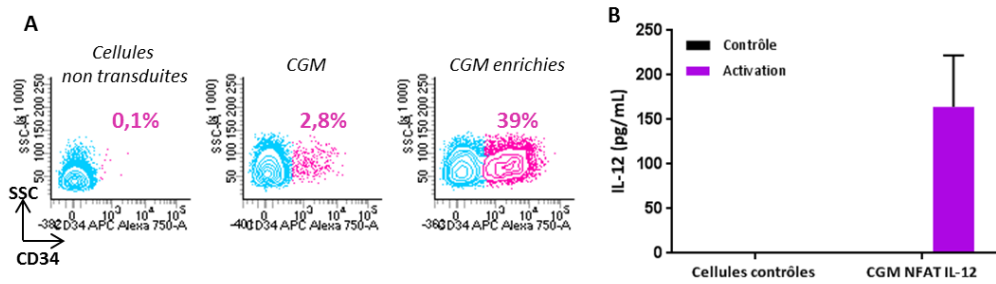


Figure 51 : Production d'IL-12 par les lymphocytes génétiquement modifiés.

A : Lymphocytes T transduits puis enrichis ; **B :** Analyse par ELISA de l'IL-12 produite après activation des cellules contrôles et génétiquement modifiées (CGM) (PMA 10ng/mL, ionomycine 1,6µg/mL, n=3).

Nous nous sommes ensuite intéressés à la fonctionnalité de l'IL-12 produite. Pour cela, les CGM ont été activées pour produire de l'IL-12 et le surnageant a été récolté pour être mis en contact avec des cellules NK. En effet, l'IL-12 est connue pour induire la production d'IFN γ par différentes cellules et notamment les cellules NK (Trinchieri, 2003). Les cellules NK ont été isolées par sélection négative (EasySep™ Human NK Cell Enrichment Kit, #19055, StemCell) à partir de PBMC de donneurs sains de l'EFS et mises en contact avec le surnageant de culture de CGM NFAT IL-12. Après 24h de co-culture, la production d'IFN γ par les cellules NK a été évaluée par cytométrie en flux (**Figure 52**).

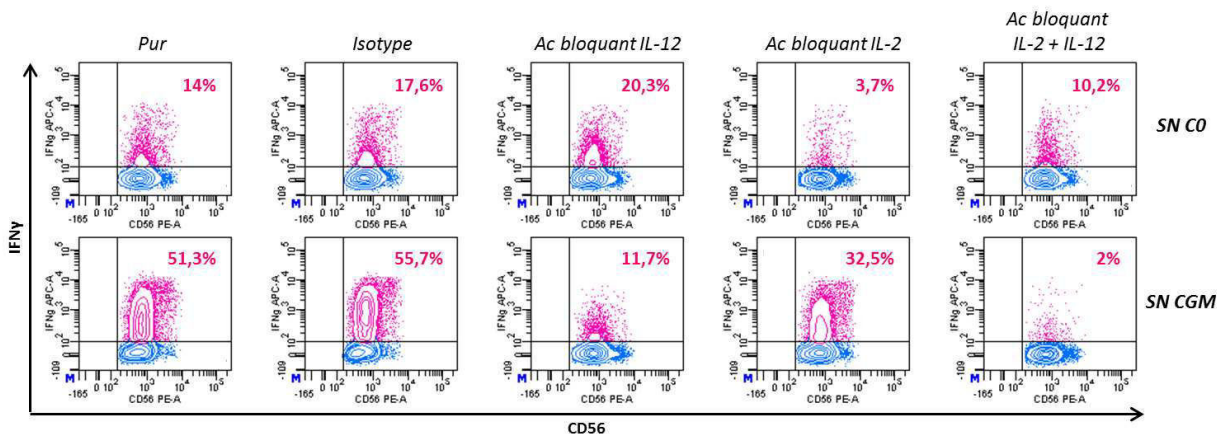


Figure 52 : Bioactivité de l'IL-12 sécrétée par les CGM.

L'activation des cellules NK a été évaluée par la production d'IFN γ en cytométrie en flux. Les cellules NK ont été cultivées 24h dans le surnageant de culture de cellules non transduites (SN CO) ou de cellules génétiquement modifiées (SN CGM) (Exemple représentatif, n=4).

Ces expériences ont permis de montrer une augmentation de la production d'IFN γ par les NK stimulés avec le surnageant de culture des CGM comparativement aux cellules NK cultivées dans le surnageant de culture de cellules non transduites démontrant donc la bioactivité de l'IL-12 produite. De plus, à l'aide d'un anticorps bloquant l'IL-12 (#554659, BD Pharmingen, USA), nous avons pu confirmer que l'activation des cellules NK était bien due à la présence d'IL-12 dans le milieu.

Dans le cadre de mon contrat CIFRE, mon objectif sur ce projet était de développer et de valider la fonctionnalité du vecteur inducible. Je serai associée aux publications futures utilisant ce vecteur.

Développement d'un CAR dirigé contre l'antigène EGFRvIII

Afin de mettre en place l'outil CAR au laboratoire, nous nous sommes intéressés au modèle tumorale du glioblastome. Incurable, le glioblastome est la tumeur du système nerveux la plus courante (2400 cas / an en France) et la plus agressive. Les traitements disponibles actuellement sont peu satisfaisants et présentent de nombreux effets secondaires. Un antigène tumoral, variant du récepteur du facteur de croissance épidermique (EGFRvIII) est exprimé à la surface des cellules dans 30% à 53% des gliomes et constitue une cible antigénique idéale pour le développement d'un CAR (Li et al., 2009). En effet, une approche d'immunothérapie cellulaire utilisant des LT génétiquement modifiés, reprogrammés pour exprimer un récepteur antigénique chimérique (CAR) reconnaissant l'antigène EGFRvIII permettrait d'activer le LT et de lyser la cellule cible. L'approche CAR permet de combiner la spécificité antigénique d'un anticorps et la fonction effectrice de la cellule T.

En collaboration avec plusieurs équipes (Pr Brenner, Baylor College of Medicine, Houston, USA ; Bellicum Pharmaceuticals, Houston, USA), notre équipe développe actuellement un CAR dirigé contre EGFRvIII, un antigène associé aux glioblastomes. Nous avons développé un récepteur chimérique de 3^{ème} génération couplant une simple chaîne d'immunoglobuline aux molécules de co-stimulation CD28 et 4-1BB ainsi qu'à la chaîne CD3 ζ . L'ensemble de ces séquences a été intégré dans un squelette rétroviral pSFG avec une cassette portant le gène suicide de la *iCasp9* et le gène de sélection Δ CD19 (Figure 53).



Figure 53 : Vecteur rétroviral pSFG-CAR-EGFRvIII3 : LTR-MR1scFv-CD28-4.1BB-CD3 ζ -IRES-iCasp9-2A- Δ CD19-LTR.

La séquence codant la portion extracellulaire est constituée d'une séquence appelée *Leader* qui va permettre d'adresser cette protéine CAR au niveau de la membrane plasmique. Cette séquence a été décrite par Smallshaw et collaborateurs (Smallshaw et al., 1999). On trouve ensuite les séquences codant la portion N-terminale de la chaîne lourde du fragment Fab d'une Ig dirigée contre EGFRvIII, puis pour une première portion charnière, *Hinger 1* permettant de relier l'extrémité C-terminale de la chaîne lourde à l'extrémité N-terminale de la chaîne légère et conduisant à une conformation dans l'espace permettant la reconnaissance de l'Ag (Genbank accession number U76382.1 GI : 1667481)(Ohno et al., 2010). La région transmembranaire est codée par une seconde séquence charnière appelée *Hinger 2*. La portion intracellulaire correspond à la succession de trois domaines permettant la transduction du signal d'activation en aval du récepteur et des domaines de co-activation lymphocytaires : CD3 ζ , 4-1BB et CD28.

Nous avons déjà pu générer une lignée d’empaquetage PG13 que nous avons choisi de caractériser. Dans un premier temps, nous l’avons utilisée afin de valider notre construction (**Figure 54**).

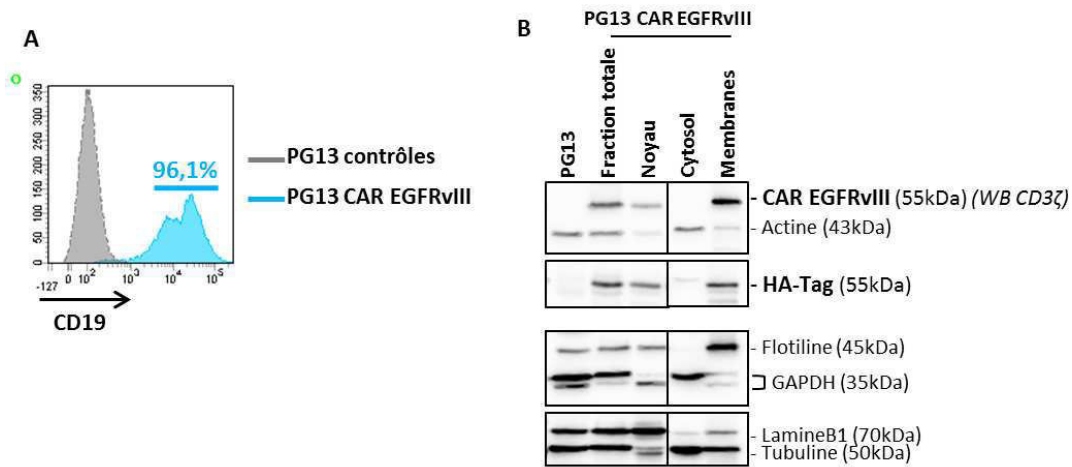


Figure 54 : Expression du CAR EGFRvIII dans la lignée d’empaquetage PG13.

A : Expression du gène de sélection Δ CD19 par cytométrie en flux ; B : Fractionnement sub-cellulaire de la lignée PG13 et western blotting révélé à l’aide d’un anticorps anti-HA, anti-CD3ζ et d’anticorps spécifiques des compartiments cellulaires (anti-flotiline pour la fraction membranaire, anti-GAPDH et anti-tubuline pour le cytosol et anti-lamine B1 pour le noyau).

Après fractionnement des compartiments subcellulaires, membrane, cytosol et noyau, nous avons analysé par western-blotting l’expression du CAR grâce à 2 anticorps : un anticorps anti-Tag-HA nous permettant de visualiser la partie extracellulaire de notre CAR qui porte le Tag-HA et un anticorps anti-CD3ζ pour marquer la partie intracellulaire. Ainsi, nous avons mis en évidence que la protéine CAR était localisée dans le compartiment membranaire démontrant donc que la protéine CAR était ancrée dans la membrane cytoplasmique et exprimée à la surface cellulaire.

Nous avons, par la suite, utilisé notre lignée d’empaquetage pour transduire des LT isolés de PBMC de donneurs sains de l’EFS et activés à l’aide de billes CD3/CD28 (Dynabeads® Human T-Activator CD3/CD28, #11161D, ThermoFisher) et d’IL-2. Nous avons utilisé ces cellules pour montrer la reconnaissance de l’antigène EGFRvIII par notre CAR à l’aide du peptide immunogène (LEEKKGNYVVDHC, Pep3) correspondant spécifiquement à la zone de jonction du variant EGFRvIII (séquence absente de la séquence EGFR sauvage), couplé à la Biotine (**Figure 55**).

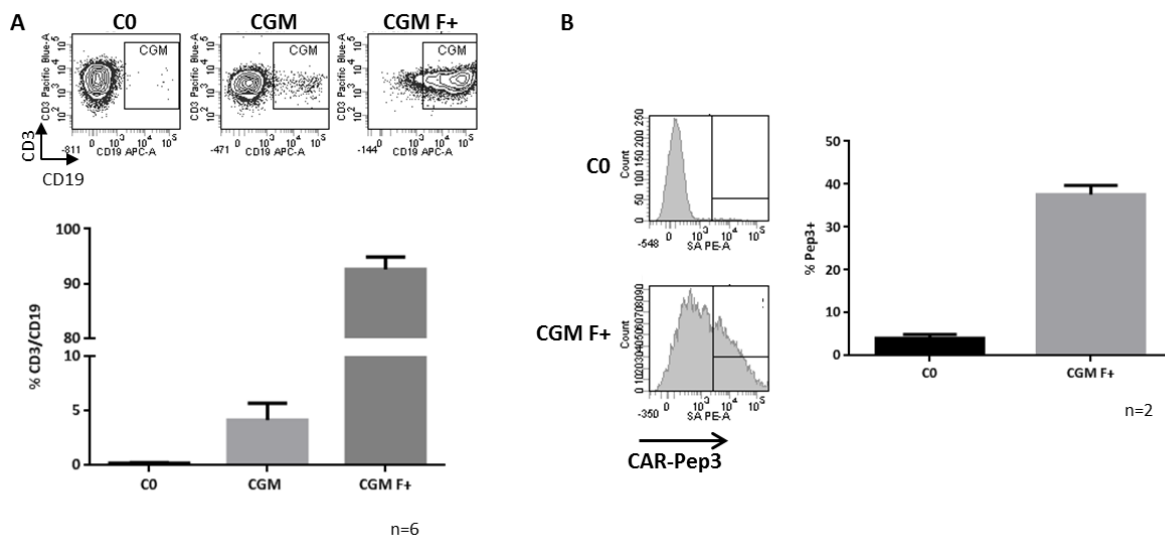


Figure 55 : Expression membranaire du CAR EGFRvIII et reconnaissance du peptide cible par les lymphocytes T génétiquement modifiés.

A : analyse par cytométrie en flux de l'efficacité de transduction (CGM) et de l'efficacité du tri (CGM F+) ; B : analyse par cytométrie en flux de la reconnaissance de la cible à l'aide du peptide immunogène Pep3.

De manière intéressante, le marquage spécifique des cellules CAR+ par le Pep3 biotinylé en cytométrie de flux montre la reconnaissance de l'antigène EGFRvIII par le récepteur antigénique chimérique CAR et confirme donc son expression membranaire.

Nous cherchons maintenant à évaluer la fonctionnalité des lymphocytes T CAR EGFRvIII face à une lignée de glioblastome surexprimant l'EGFRvIII (U87-EGFRvIII) dans un modèle *in vitro* mais aussi, *in vivo*, dans un modèle murin. Des expériences préliminaires nous ont permis de mettre en évidence la production d'IFN γ par les lymphocytes T CAR EGFRvIII face à la lignée U87 EGFRvIII (Figure 56).

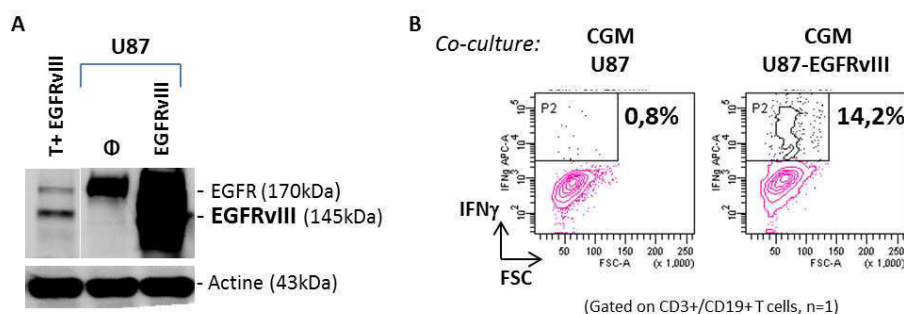


Figure 56: Reconnaissance des cellules cibles U87 EGFRvIII par les lymphocytes T CAR EGFRvIII.

A : Expression de la cible EGFRvIII par la lignée de glioblastome U87 ; B : Production d'IFN γ par les lymphocytes T CAR EGFRvIII (CGM) en réponse à une stimulation par des cellules surexprimant l'antigène tumoral cible.

Cependant, ces expériences sont difficiles à répliquer, nous avons émis l'hypothèse d'un problème lié à l'expression du CAR. En effet, le vecteur rétroviral utilisé avec sa taille de 10804pb, entre dans la limite d'utilisation des rétrovirus. Cette limite pourrait expliquer les variations d'expression de notre CAR. Nous travaillons donc actuellement à l'établissement d'une plus petite construction qui ne contiendrait plus la séquence de la iCaspase9 permettant un gain de 2000pb. Nous travaillons

également au développement d'un vecteur lentiviral qui nous permettra d'exprimer le CAR sécurisé. Ce projet est en accord avec les volontés de l'ANSM qui souhaite favoriser l'utilisation des vecteurs lentiviraux en remplacement des vecteurs γ -rétroviraux.

Enfin, dans l'idée d'évaluer *in vivo* la capacité des LT CAR à réduire la tumeur, nous avons développé un modèle murin dans différentes souches de souris disponibles au laboratoire. Nous avons ainsi pu mettre en évidence qu'une injection sous-cutanée de cellules U87-EGFRvIII et exprimant la luciférase permet l'obtention de tumeurs (**Figure 57**).

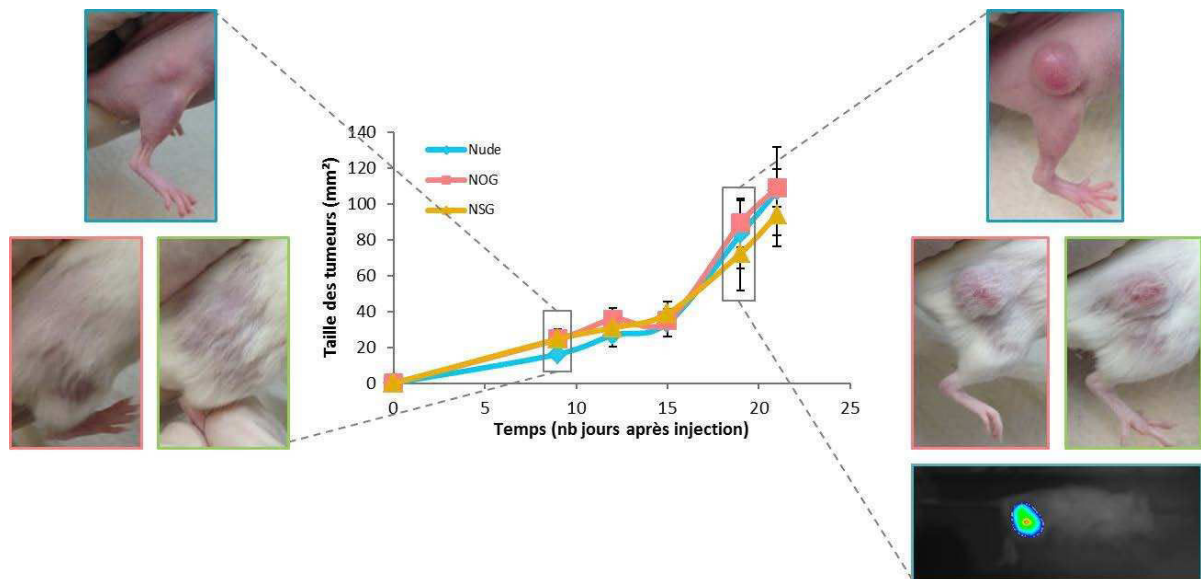


Figure 57: Modèle murin dans 3 souches de souris disponibles : Nude, NOG et NSG.

Les cellules U87 EGFRvIII ont été injectées en sous-cutané et la croissance tumorale a été suivie par mesure de la tumeur et imagerie (les U87 EGFRvIII expriment la luciférase).

Les 3 modèles murins présentent des résultats similaires en terme de prises des tumeurs et de croissance, aussi pour des raisons d'ordre technique (élevage et disponibilité) nous avons choisi de travailler avec le modèle de souris NSG. La prochaine étape de ce travail sera alors l'injection de cellules génétiquement modifiées exprimant le CAR dirigé contre EGFRvIII à des souris porteuses de tumeurs U87 EGFRvIII en sous cutanée dans un premier temps puis dans un modèle d'injection des tumeurs en intracrânien.

DISCUSSIONS
PERSPECTIVES

Mon travail de thèse, financé par un contrat CIFRE avec l'EFS Bourgogne/Franche-Comté s'inscrit dans le cadre du développement d'immunothérapies anti-cancer et notamment le développement et la caractérisation d'outils innovants de thérapie génique. Au cours de cette thèse, différentes constructions géniques ont pu être développées et validées. Les constructions développées permettront de rediriger la spécificité d'un lymphocyte T contre une cible définie et de moduler le microenvironnement tumoral dans un contexte de thérapie cellulaire sécurisée.

Les thérapies utilisant des gènes suicides ont été largement développées ces dernières années notamment pour la sécurisation des thérapies cellulaires. Ces systèmes utilisent principalement des enzymes capables de convertir une pro-drogue non toxique en un métabolite toxique pour la cellule génétiquement modifiée. La preuve du concept de l'utilisation de système suicide dans les LT a été faite dès 1994 (Tiberghien et al., 1994). Plusieurs essais cliniques ont été mis en place permettant de démontrer la faisabilité de l'approche (Bonini et al., 1997; Tiberghien et al., 2001). Différents systèmes ont pu être développés afin de sécuriser les thérapies cellulaires mais aussi les immunothérapies anti-tumorales notamment pour limiter leurs effets secondaires comme la GvHD (Philip et al., 2014; Tey et al., 2007).

Sécurisation des thérapies cellulaires

Fort des compétences développées par notre équipe avec le système HSV-tk/GCV, nous nous sommes intéressés au système iCasp9/AP1903, un autre système suicide validé en clinique. Des études précédentes ont montré la puissance et l'efficacité de ce système : chez 4 patients ayant développés une GvHD suite à une greffe de cellules souches hématopoïétiques et de lymphocytes T génétiquement modifiés, une dose d'AP1903 a permis d'éliminer les signes de la GvHD et 90% des CGM en 30 min (Di Stasi et al., 2011). Nous avons voulu caractériser cette population de cellules qui persistait après traitement à l'AP1903. Nous avons pu montrer que les cellules persistantes après traitement présentaient un plus fort niveau de méthylation du transgène ce qui diminuait son expression. Pour restaurer l'expression du transgène, nous avons utilisé un agent hypométhylant : le 5-azacytidine. En effet, la méthylation est un des mécanismes de défense que peut utiliser la cellule génétiquement modifiée et qui a pour conséquence d'éteindre l'expression d'un transgène. Le 5-azacytidine s'incorpore à l'ADN et se lie ensuite, de façon covalente, à la DNMT1, une enzyme responsable de la méthylation de l'ADN. Ainsi, la liaison du 5-azacytidine à cette enzyme va induire l'inhibition de son activité. Un pré-traitement avec le 5-azacytidine des cellules génétiquement modifiées permet de restaurer l'expression du transgène et de ce fait la sensibilité à l'AP1903. Toutefois, nous n'avons pas pu mettre en évidence ce mécanisme sur des lymphocytes T primaires. En effet, le phénomène que nous avons observé sur nos lignées cellulaires est rare et long à mettre en place.

Cependant, avant une application clinique, la combinaison 5-azacytine / AP1903 doit être testée sur un modèle murin notamment pour montrer l'absence de toxicité liée à la combinaison des molécules. Le 5-azacytidine a déjà été utilisé pour induire la déméthylation d'un gène dans un modèle tumoral murin sans montrer de signes de toxicité majeurs (Plumb et al., 2000). Cette molécule a également déjà été utilisée pour améliorer les effets d'un traitement, c'est le cas du lintuzumab, un anti-CD33 utilisé dans le traitement de la LAL (Sutherland et al., 2010). Bien que déjà utilisé chez l'homme, sous le nom Decitabine pour le traitement des syndromes myélodysplasiques, la cinétique de traitement chez l'homme reste à définir. L'ouverture du protocole clinique *Side by Side* pourrait, grâce au suivi à long terme des patients, nous permettre d'étudier ce phénomène rare et de tester *in vitro* cette combinaison de traitements.

En outre, nous n'avons pas identifié de mécanisme conférant une résistance spécifique à AP1903. Ainsi, le système suicide iCasp9/AP1903 représente un système sûr et efficace pour la thérapie génique c'est pourquoi nous avons souhaité l'intégrer aux différentes constructions que nous avons développées au laboratoire. La fonctionnalité de la iCasp9 dans ces constructions n'a toutefois pas pu être démontrée. Comme nous l'avons vu, un certain niveau d'expression est nécessaire pour obtenir un système suicide fonctionnel. Ainsi, le design de notre vecteur a peut-être un problème : en effet, la séquence codant la iCasp9 est en 3'. De plus, une étude a montré que si la iCasp9 n'était pas placée directement derrière le LTR 5', elle n'était pas fonctionnelle du fait d'une expression trop faible (Budde et al., 2013). De nouvelles constructions modifiant le design du vecteur ou utilisant des lentivirus sont actuellement en cours au laboratoire afin de remédier à ces problèmes d'expression.

Reprogrammation des LT avec un CAR et nouveaux axes de développement

Pendant cette thèse, un vecteur permettant la reprogrammation du LT pour qu'il exprime un CAR afin de rediriger sa spécificité a été développé et caractérisé. Une construction plasmidique rétrovirale portant l'ensemble des séquences d'intérêt (CAR et cassette de sécurisation iCasp9 et de sélection Δ CD19) a été produite et une lignée d'emballage PG13 a été établie. Cette lignée a été utilisée pour caractériser l'expression du CAR et transduire des LT de donneurs sains. Ainsi, nous avons pu montrer une expression du CAR EGFRvIII à la membrane des PG13 par fractionnement cellulaire et western blot. Les LT génétiquement modifiés nous ont également permis de valider la reconnaissance du peptide cible par le CAR EGFRvIII. La fonctionnalité des LT CAR EGFRvIII n'a toutefois pas pu être confirmée. En effet, l'expression du CAR et de la cassette suicide iCasp9 ne sont pas encore satisfaisantes puisque l'expression membranaire du CAR et la sensibilité à l'AP1903 sont faibles et difficilement reproductibles.

Nous travaillons actuellement au développement d'un vecteur lentiviral qui permet notamment l'intégration de plus grandes séquences. La taille du vecteur rétroviral utilisé au cours de ces travaux, en dépassant les 10kb (10804 pb), se situe dans la limite d'utilisation des γ -rétrovirus. L'utilisation des constructions γ -rétrovirales commence à diminuer au profit des lentivirus qui présentent plusieurs avantages tant sur l'aspect de la technologie que sur l'aspect de la sécurité. Les gènes codant les protéines de la capsid (*env*) sont intégrés dans un plasmide à part, ce qui permet de modifier plus facilement le tropisme du virus. Des modifications (ajout de séquences cPPT, CTS, WPRE) ont également été opérées afin de permettre un meilleur transport du gène d'intérêt dans le noyau pour son intégration au génome de la cellule hôte et une meilleure expression du transgène (Sirven et al., 2000; Zufferey et al., 1999). Sur le plan de la sécurité, les lentivirus présentent un risque de mutagénèse insertionnelle moins élevée que les rétrovirus. Le risque de mutagénèse insertionnelle qui pourrait conduire à une oncogénèse est donc plus faible. En effet, les lentivirus ne s'intègrent pas préférentiellement près des sites d'initiation de la transcription. De plus, la délétion de la région U3 du LTR 3' permet de limiter l'activité transcriptionnelle résiduelle du promoteur et d'éviter le risque d'activation des gènes voisins du site d'intégration (Miyoshi et al., 1998; Zufferey et al., 1998). Enfin, au vue de ces remarques, l'ANSM préconise l'utilisation des lentivirus plutôt que des γ -rétrovirus.

Par la suite, il pourrait être intéressant d'étudier différentes voies de stimulations des LT. En effet, les essais actuels de transfert adoptif de LT utilisent des LT non sélectionnées et sans enrichissement d'une sous-population ou une autre. Toutefois, en thérapie génique, il est important de favoriser la transduction de LT à un stade de différenciation précoce qui conserve les meilleures capacités de prolifération et de différenciation. Dans ce contexte, l'équipe de N. Restifo a récemment caractérisé une sous-population de LT mémoires ayant d'importantes propriétés de renouvellement : les LT mémoires souches (T_{scM}) (Gattinoni et al., 2011). Cette population présente le même phénotype que des LT naïfs (CD45RA⁺ CD45RO⁻ CCR7⁺ CD62L⁺ CD27⁺ CD28⁺) mais exprime également CD95, particulièrement présent sur les LT mémoires (**Figure 58**). Ces T_{scM} présentent des propriétés de cellules souches : ils sont multipotents, possèdent des capacités d'auto-renouvellement et peuvent générer l'ensemble des groupes de LT mémoires et effecteurs.

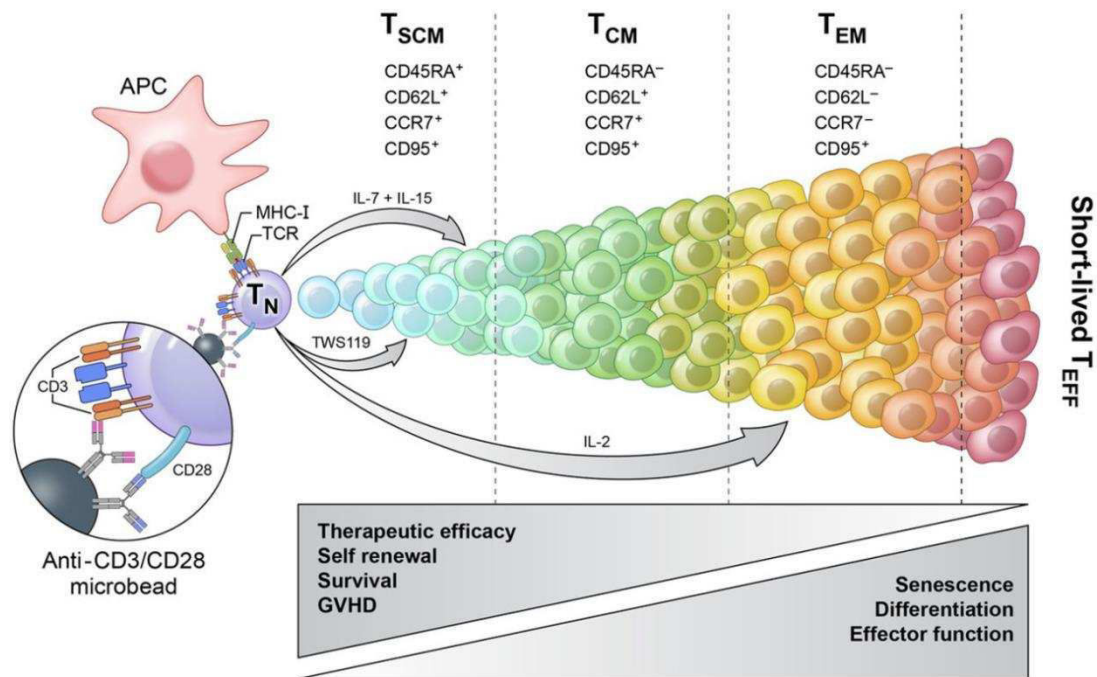


Figure 58 : Les différents sous populations de LT mémoires et leurs capacités (Gattinoni and Restifo, 2013).

Les T_{SCM} sont une population très attractive pour une utilisation en immunothérapie anti-cancer, ils pourraient notamment permettre d'améliorer la persistance des cellules génétiquement modifiées *in vivo*. De plus, des études en modèles murins ont montré que cette sous-population possède de bonnes capacités de prolifération et de survie, supérieures aux autres sous-populations de cellules mémoires (Gattinoni et al., 2011; Gattinoni et al., 2009). Au niveau clinique, Cieri a montré qu'il était possible de produire cette sous-population cellulaire et de la modifier génétiquement en utilisant des produits certifiés GMP (Cieri et al., 2013). Dans cette étude, les auteurs ont travaillé à partir de PBMC stimulés par des billes CD3/CD28 en présence de faibles concentrations d'IL-7 et d'IL-15. Ce type de stimulation a permis la génération de cellules présentant un phénotype semblable au T_{SCM}. Dans ce contexte, une étude clinique basée sur l'utilisation de LT CD62L⁺ génétiquement modifiés pour exprimer un TCR spécifique de l'antigène NY-ESO-1 est en cours (NCT02062359). Une autre étude en phase de recrutement de patients cherche à voir l'effet de T_{CM} transduits avec un CAR CD19 et sécurisé avec le système huEGFRt (NCT02051257).

Modulation du microenvironnement tumoral et amélioration de la stratégie CAR

L'IL-12 est une cytokine inflammatoire importante dans la réponse immunitaire innée et adaptative. Elle n'est pas sécrétée par les LT mais par les cellules dendritiques, les macrophages et les neutrophiles. L'IL-12 permet de stimuler la prolifération et la cytotoxicité des LT CD4 et CD8 en favorisant notamment la différenciation Th1 des CD4 (Trinchieri, 2003; Zeh et al., 1993). Elle conduit à l'augmentation de la sécrétion d'IFN γ , TNF α et permet aussi d'améliorer la présentation des antigènes (Zhao and Perlman,

2012). Ainsi, dans le contexte de l'immunothérapie anti-tumorale, la sécrétion d'IL-12 au sein du microenvironnement tumoral peut conduire à améliorer les fonctions cytotoxiques des LT CAR, à atténuer l'immunosuppression des LTreg et à reprogrammer les cellules dendritiques et les macrophages (Lasek et al., 2014). Cependant, malgré ses effets bénéfiques, elle est toxique à forte concentration, d'où l'intérêt de développer un système de production inductible de l'IL-12 (Miyoshi et al., 1998; Zeh et al., 1993; Zhang et al., 2011).

Ces travaux de thèse ont permis le développement et la validation d'une construction génique permettant la modulation du microenvironnement tumoral par la sécrétion inductible d'IL-12. Cette construction est basée sur l'expression de l'IL-12 sous la dépendance d'un promoteur inductible : la production d'IL-12 par les LT génétiquement modifiés est contrôlée par l'activation du facteur de transcription NFAT, conséquence de l'activation du LT. Cette construction pourrait par la suite être utilisée pour d'autres projets en cours au laboratoire. Un projet visant à extraire les TILs à partir de métastases hépatiques est actuellement en développement : ces TILs pourraient être transduits avec cette construction avant leur ré-injection au patient. Ainsi, au contact de la tumeur, les TILs activés vont sécréter de l'IL-12 permettant d'améliorer la réponse immunitaire anti-tumorale. Cette stratégie a déjà été évaluée chez des patients atteints de mélanome métastatique (NTC01236573). Le transfert adoptif de TILs et d'IL-2 a permis d'obtenir des réponses objectives dans plus de 70% de patients souffrant de mélanome métastatique. Afin d'améliorer cette stratégie, l'équipe du Pr Rosenberg a mis en place le premier essai clinique chez l'homme utilisant des TILs génétiquement modifiés pour exprimer de l'IL-12 de façon inductible. Cet essai a été réalisé chez 33 patients, et des réponses anti-tumorales ont pu être observées en absence de co-injection d'IL-2 et des régressions ont été observées avec une quantité de TIL très inférieure aux doses utilisées de façon conventionnelle (10 à 100 fois moins). Toutefois, les auteurs ont rencontré des problèmes de persistance des TILs et des effets secondaires (toxicités hépatiques et rénales, fièvre) imputables à l'IL-12 ont tout de même été observés démontrant un besoin d'amélioration du protocole afin de le rendre plus sûr (Zhang et al., 2015). Les auteurs de cette étude suggèrent de travailler, soit sur la quantité d'IL-12 sécrétée en apportant des modifications sur la structure du vecteur : suppression de séquences *enhancer* en amont du promoteur ou utilisation d'un promoteur qui pourrait être en plus régulé par ajout de petites molécules chimiques ; soit en jouant sur les caractéristiques de l'IL-12 produite en utilisant les techniques d'ingénieries des protéines pour réduire son temps de demi-vie. Cette dernière stratégie préserverait les bénéfices de l'IL-12 au niveau de la tumeur mais diminuerait l'activité de l'IL-12 circulante.

Cette construction inductible pourrait servir de base de travail pour le développement d'autres constructions soit en remplaçant l'IL-12 par une autre cytokine soit en combinaison avec une construction codant un TCRtg ou un CAR. Une 4^{ème} génération de CAR appelé CAR armés ou TRUCK pour

T cells redirected for universal cytokine killing a été décrite (**Figure 59**) (Chmielewski et al., 2014; Pegram et al., 2014; Yeku and Brentjens, 2016). Ces stratégies permettent d'améliorer les thérapies utilisant des CAR. Elles consistent à apporter une modification génique supplémentaire au LT CAR pour lui permettre d'exprimer, de façon constitutive ou inducible, des cytokines (IL-12) ou des ligands (4.1BBL, CD40L...) qui améliorent l'efficacité et la persistance des LT CAR conduisant à l'optimisation de la réponse immunitaire anti-tumorale. Le choix de la seconde modification génétique se fait notamment sur les connaissances du microenvironnement tumoral propre à chaque cancer.

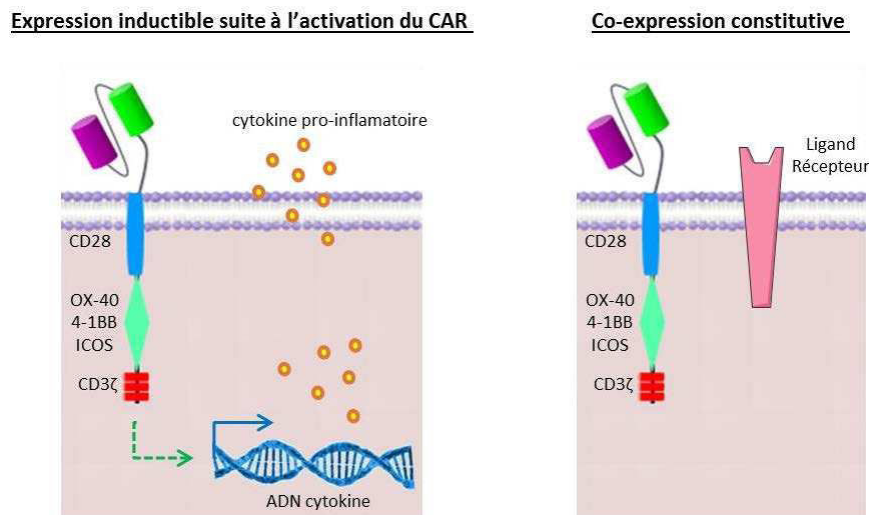


Figure 59 : Développement des stratégies de CAR armés permettant une meilleure efficacité et une meilleure persistance des LT CAR.

Différentes approches basées sur cette stratégie sont actuellement en cours d'investigation. Une approche de TRUCK consiste notamment à utiliser l'IL-12. Dans ce système, la reconnaissance de l'antigène *via* le récepteur CAR permet l'activation du LT et l'initiation des mécanismes conduisant à l'élimination de la cellule cible mais aussi le relargage d'IL-12. L'accumulation de cette cytokine pro-inflammatoire va ainsi permettre une modulation du microenvironnement tumoral et le recrutement de différentes cellules de l'immunité contribuant à la réponse anti-tumorale. L'utilisation de TRUCK IL-12 est actuellement en cours d'évaluation clinique dans le cancer de l'ovaire (Koneru et al., 2015a). Dans cette étude, les auteurs reprogramment les LT autologues à l'aide d'un vecteur permettant la co-expression d'un CAR de 2^{ème} génération dirigé contre l'antigène MUC16^{ecto}, d'IL-12 et d'un système de sécurisation utilisant huEGFRt. Ils ont pu montrer *in vitro* que les LT capables de co-exprimer le CAR et l'IL-12 présentaient de meilleures capacités de prolifération et de sécrétion d'IFN γ en comparaison avec les LT qui exprimaient seulement le CAR. Ces données ont pu être confirmées dans un modèle murin de xéno greffes de tumeurs ovariennes (Koneru et al., 2015b), et l'évaluation clinique de cette stratégie chez l'homme est actuellement en phase de recrutement des patients (NCT02498912).

Le développement des CAR armés peut aussi consister à modifier les LT pour exprimer un ligand tel que CD40L afin d'améliorer ses capacités. Une fois exprimé par le LT, CD40L va se lier à son récepteur CD40 exprimé par les APC. Cette interaction va stimuler l'expression, par ces APC, des molécules de co-stimulation telles que B7, qui interagit avec CD28 du LT, ainsi que la sécrétion de cytokines telles que l'IL-2. L'activation de CD40 *via* son ligand CD40L joue également un rôle dans l'immunité médiée par les LT CD8 *via* la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (IL-12, IFN γ) (Cella et al., 1996). L'interaction CD40/CD40L favorise donc l'activation des LT en améliorant les fonctions des APC. De plus, la liaison de CD40L à son récepteur CD40 exprimé par les cellules tumorales est capable d'induire la mort de la cellule tumorale par apoptose. Différentes équipes travaillent à l'utilisation de cette molécule pour améliorer les fonctions des LT CAR (Curran et al., 2015).

Cette stratégie peut également être utilisée pour améliorer le homing des LT génétiquement modifiés au site tumoral, un point critique pour l'efficacité de la thérapie adoptive. Les cellules de mélanomes sécrètent les chemokines CXCL1 et CXCL8 dont le récepteur CXCR2 est principalement exprimé par les neutrophiles et les monocytes mais pas par les LT. Ainsi, une étude a montré que des LT génétiquement modifiés pour exprimer un TCR spécifique de gp100 et CXCR2 présentaient une meilleure localisation au niveau de la tumeur que les LT modifiés pour exprimer seulement le TCR transgénique spécifique de gp100 (Peng et al., 2010).

Ces stratégies de CAR armés et de TRUCK sont des approches prometteuses pour améliorer les thérapies utilisant des CAR et sont actuellement en cours d'évaluation clinique (NCT02498912).

La thérapie cellulaire utilisant des LT CAR se trouve limitée par le nombre de CAR à développer pour couvrir le plus grand nombre de cancers et d'antigènes. Une solution envisageable repose sur le développement de CAR universel (uCAR) (**Figure 60**). Ce système utilise comme domaine de reconnaissance l'avidine ou un anti-FITC fusionné aux domaines de transduction du signal couramment utilisés. Cette construction s'utilise en combinaison avec un anticorps monoclonal biotinylé ou marqué FITC (Shi et al., 2014).

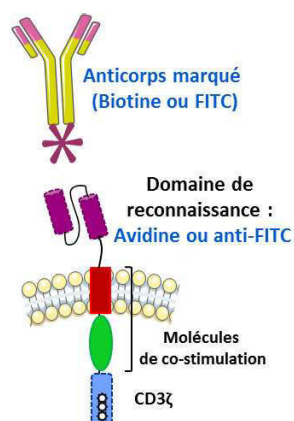


Figure 60 : **Structure d'un CAR universel.**

Cette stratégie flexible permet ainsi de cibler un large panel d'antigènes, il suffit seulement d'avoir un anticorps candidat. Deux équipes ont, pour le moment, pu démontrer la faisabilité de cette stratégie *in vitro* (Tamada et al., 2012; Urbanska et al., 2012).

Association avec les inhibiteurs de checkpoints immunologiques

Dans le microenvironnement tumoral, les LT CAR peuvent être la cible d'une régulation négative par des signaux inhibant l'activation lymphocytaire. En effet, différents signaux tels que des cytokines anti-inflammatoires (IL-10, TGF β), des populations cellulaires immunosuppressives présentes dans le microenvironnement tumoral (MDSC, Tregs) et l'engagement de récepteurs inhibiteurs (PD-1, CTLA-4) peuvent induire une immunosuppression qui bloque les fonctions des LT conduisant à l'inhibition de la réponse anti-tumorale (Wang and Wang, 2007). Ainsi, la combinaison des thérapies adoptives avec des molécules capables d'inhiber les checkpoints immunologiques tels que PD-1 ou CTLA-4 pourrait permettre d'améliorer la réponse anti-tumorale. En effet, ces récepteurs peuvent être contrôlés par l'utilisation d'anticorps monoclonaux qui permettent d'abroger l'immunosuppression des LT. Ces anticorps thérapeutiques (Ipilimumab, Nivolumab) ont déjà montré des résultats encourageants dans différents cancers où une réponse T spécifique préexistait au traitement (Rizvi et al., 2015; Robert et al., 2015; Van Allen et al., 2015). Comme les LT sont sensibles à l'inhibition médiée notamment par PD-1 ou CTLA-4, la combinaison des thérapies utilisant des LT CAR avec des anticorps inhibiteurs des checkpoints immunologiques permettrait de préserver leurs fonctions au sein du microenvironnement (John et al., 2013). Cette approche est en cours d'évaluation clinique chez des patients atteints de LAL et de LLC qui seront traités avec un CAR CD19 de 2^{ème} génération (CD28-CD3 ζ) en combinaison avec l'ipilimumab qui permet de bloquer CTLA-4 (NCT00586391).

Gestion des effets secondaires

Les stratégies visant à améliorer les thérapies cellulaires utilisant des CAR impliquent également une meilleure gestion des effets secondaires (*on-target*, *off tumor toxicity*, syndrome de lyse tumorale et relargage massif de cytokines).

L'utilisation de système de sécurisation de type « gène suicide » peut être une solution permettant le développement de LT CAR modifiées qui seraient rapidement éliminables en cas d'événements indésirables graves liés à l'injection des CGM.

Des effets secondaires liés à la reconnaissance de tissus sains par les cellules génétiquement modifiées appelés *on-target*, *off tumor toxicity* ont également été observés. Une stratégie consiste à développer des CAR bispécifiques : TanCAR (Grada et al., 2013). Ce type de CAR possède 2 domaines de

reconnaissance exprimé en tandem (**Figure 61**). Grâce à leur double spécificité, les tanCAR permettent donc de mieux cibler les cellules tumorales ou de limiter les échappements par diminution ou perte d'expression de l'antigène cible. Il est également possible de cibler simultanément un antigène de tumeur et des éléments du microenvironnement tumoral dans le but d'optimiser la réponse anti-tumorale.

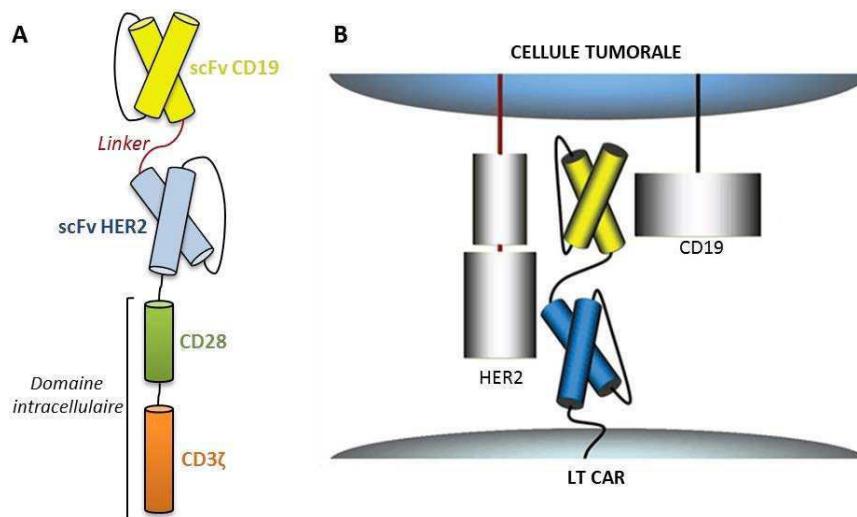


Figure 61 : **Structure des TanCAR (A) et reconnaissance de la cible tumorale (B).**
D'après Grada et al., 2013.

D'autres signes de toxicité sont répertoriés tels que le syndrome de libération massive de cytokines et le syndrome de lyse tumorale. Ils sont la conséquence d'une forte activation des cellules de l'immunité et notamment du relargage en grande quantité de nombreuses cytokines inflammatoires telles que IL-6, IL-10, IFN γ , TNF α . Ces syndromes peuvent rapidement engendrer de graves dommages chez le patient voire sa mort. Il est donc important de maîtriser ces phénomènes et de mettre en place une prise en charge et un suivi clinique accru du patient après l'injection des LT CAR. Les cliniciens ont toutefois mis en place différents traitements à base de corticostéroïdes, de Tocilizumab (anti-IL-6) ou des antagonistes du TNF α et du récepteur à l'IL-1 afin de limiter ces problèmes tout en veillant à conserver les effets bénéfiques de LT CAR. Des études approfondies doivent être menées afin de déterminer la dose minimale de LT à injecter pour obtenir la meilleure réponse tout en limitant la sévérité des effets secondaires. Des essais de traitement à des stades précoces de la maladie alors que la charge tumorale est plus faible pourraient également être une solution. De plus, lors du développement, la puissance du CAR doit également être discutée avec les cliniciens.

Vers une utilisation dans un contexte allogénique

Malgré la révolution engendrée par le développement des immunothérapies utilisant des CAR, celles-ci présentent un obstacle majeur : une utilisation majoritairement en autologue qui limite les risques de

GvHD. De manière importante, les cellules NK activent leurs fonctions cytotoxiques de façon indépendante de la présentation par les molécules du CMH. C'est pourquoi, elles présentent un gros potentiel pour l'immunothérapie, elles pourraient être utilisées dans un contexte allogénique. Les cellules NK présentent ainsi un fort potentiel pour une utilisation alternative aux LT en immunothérapie. Ces cellules lymphoïdes de l'immunité innée sont impliquées dans l'immunosurveillance des cancers et dans le contrôle précoce des infections par des pathogènes intracellulaires. Elles sont capables de lyser les cellules grâce à la sécrétion de granules cytotoxiques contenant granzymes et perforines mais aussi par la sécrétion de cytokines telles que l'IFN γ et le TNF α . Des études cliniques utilisant des cellules NK provenant de donneurs haploidentiques ont permis d'obtenir des rémissions dans des LAM et se sont également montrées efficaces sur des tumeurs solides (Geller and Miller, 2011; Miller et al., 2005). Différentes études ont déjà permis de montrer une activité anti-tumorale médiée par un CAR exprimé par des lignées cellulaires NK (principalement NK-92) mais aussi des cellules NK isolées de sang périphérique ou produites à partir de cellules souches (Hermanson and Kaufman, 2015). Les cellules NK présentent donc un réel intérêt pour l'immunothérapie. Des études approfondies doivent toutefois être menées pour définir la meilleure stratégie CAR à développer. La comparaison des CAR de 1^{ère} et 2^{ème} génération pourrait demander une évolution concernant la composition en molécules de co-stimulation afin d'obtenir une activation optimale de la cellule NK. L'utilisation de la molécule CD3 ζ semble importante, en revanche, la nécessité du CD28 est discutée car cette molécule n'est pas naturellement exprimée par les cellules NK.

Le développement des systèmes TALEN et CRISPR qui permettent l'édition du génome est également très étudié dans le contexte de la modification des LT. Sur cette thématique, la société Cellectis a développé différents systèmes pour permettre d'obtenir des LT CAR multi-résistants et utilisables dans un contexte allogénique. L'utilisation du système TALEN leur a permis d'éteindre spécifiquement les chaînes $\alpha\beta$ du TCR et l'enzyme dCK dans des LT génétiquement modifiés avec un CAR (Poirot et al., 2015; Valton et al., 2015). Ainsi, les LT à modifier génétiquement pourraient provenir de donneurs sains plutôt que de patients et l'extinction de l'enzyme dCK permettrait aux LT de tolérer 3 molécules de référence utilisées pour la lymphodéplétion (Clofarabine, Fludarabine, Cytarabine). Cellectis a pu évaluer cette stratégie, en Angleterre, chez une fillette de 11 mois atteinte d'une LAL réfractaire et en rechute (Qasim et al., 2015). Des LT d'un donneur sain ont été modifiés génétiquement pour exprimer un CAR CD19 et un système suicide (RQR8) par transduction lentivirale. Le TALEN permettant l'extinction de la chaîne α du TCR a ensuite été électroporé dans les LT CAR CD19. Les LT qui exprimaient toujours un TCR après ces modifications ont été déplétés. À ce jour, cette intervention qui comprend une lymphodéplétion (Fludarabine, Cyclophosphamide, Alemtuzumab) et l'injection de LT CAR CD19 tierce partie a permis d'induire une rémission moléculaire, là, où les traitements précédents avaient échoué. Cette première application chez l'homme du système TALEN fournit un début de

preuve de concept de l'utilisation des LT tierce partie pour le transfert adoptif de LT CAR. Cette stratégie doit maintenant être évaluée dans le cadre d'un essai clinique.

Conclusion générale

En conclusion, différentes stratégies sont à l'étude pour permettre d'améliorer les thérapies cellulaires utilisant des LT exprimant un CAR, que ce soit en terme d'activité anti-tumorale, de prolifération, de persistance *in vivo*, mais aussi de sécurité (**Figure 62**). Certaines d'entre elles telles que la modification génétique des cellules NK ou l'utilisation des systèmes d'édition du génome pourrait permettre la production d'une banque universelle et standardisée de cellules génétiquement modifiées générées à partir de cellules tierce partie utilisables dans un contexte allogénique pour le traitement des patients.

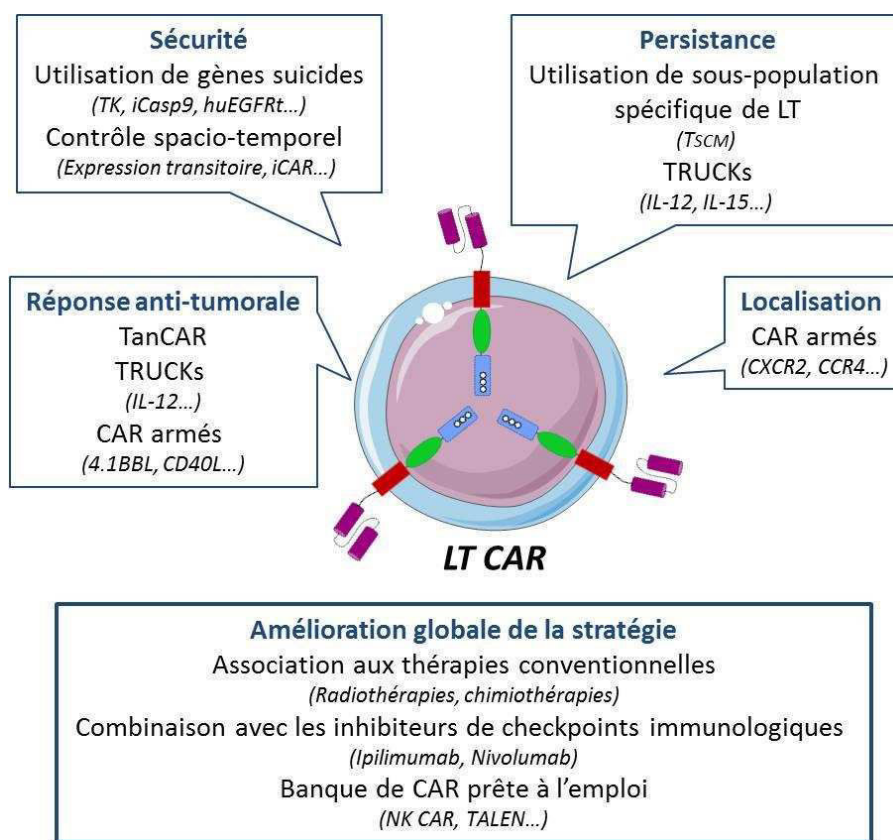


Figure 62 : Stratégies permettant l'amélioration des immunothérapies utilisant des CAR.

BIBLIOGRAPHIE

Aggarwal, S., Ghilardi, N., Xie, M. H., de Sauvage, F. J., and Gurney, A. L. (2003). **Interleukin-23 promotes a distinct CD4 T cell activation state characterized by the production of interleukin-17.** *The Journal of biological chemistry* 278, 1910-1914.

Al-Shawi, R., Ashton, S. V., Underwood, C., and Simons, J. P. (2001). **Expression of the Ror1 and Ror2 receptor tyrosine kinase genes during mouse development.** *Development genes and evolution* 211, 161-171.

Almeida, J. R., Price, D. A., Papagno, L., Arkoub, Z. A., Sauce, D., Bornstein, E., Asher, T. E., Samri, A., Schnuriger, A., Theodorou, I., *et al.* (2007). **Superior control of HIV-1 replication by CD8+ T cells is reflected by their avidity, polyfunctionality, and clonal turnover.** *The Journal of experimental medicine* 204, 2473-2485.

Baker, K. S., and Fraser, C. J. (2008). **Quality of life and recovery after graft-versus-host disease.** *Best practice & research Clinical haematology* 21, 333-341.

Baselga, J., and Albanell, J. (2001). **Mechanism of action of anti-HER2 monoclonal antibodies.** *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* 12 Suppl 1, S35-41.

Baselga, J., Smith, B. L., Rafferty, E. A., and Bombonati, A. (2012). **Case records of the Massachusetts General Hospital. Case 16-2012. A 32-year-old woman with HER2-positive breast cancer.** *The New England journal of medicine* 366, 2018-2026.

Beavis, P. A., Slaney, C. Y., Kershaw, M. H., Gyorki, D., Neeson, P. J., and Darcy, P. K. (2016). **Reprogramming the tumor microenvironment to enhance adoptive cellular therapy.** *Seminars in immunology* 28, 64-72.

Becker, M. L., Near, R., Mudgett-Hunter, M., Margolies, M. N., Kubo, R. T., Kaye, J., and Hedrick, S. M. (1989). **Expression of a hybrid immunoglobulin-T cell receptor protein in transgenic mice.** *Cell* 58, 911-921.

Blank, C., Brown, I., Peterson, A. C., Spiotto, M., Iwai, Y., Honjo, T., and Gajewski, T. F. (2004). **PD-L1/B7H-1 inhibits the effector phase of tumor rejection by T cell receptor (TCR) transgenic CD8+ T cells.** *Cancer research* 64, 1140-1145.

Bonini, C., Bondanza, A., Perna, S. K., Kaneko, S., Traversari, C., Ciceri, F., and Bordignon, C. (2007). **The suicide gene therapy challenge: how to improve a successful gene therapy approach.** *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 15, 1248-1252.

Bonini, C., Ferrari, G., Verzeletti, S., Servida, P., Zappone, E., Ruggieri, L., Ponzoni, M., Rossini, S., Mavilio, F., Traversari, C., and Bordignon, C. (1997). **HSV-TK gene transfer into donor lymphocytes for control of allogeneic graft-versus-leukemia.** *Science* 276, 1719-1724.

Brentjens, R. J., Davila, M. L., Riviere, I., Park, J., Wang, X., Cowell, L. G., Bartido, S., Stefanski, J., Taylor, C., Olszewska, M., *et al.* (2013). **CD19-targeted T cells rapidly induce molecular remissions in adults with chemotherapy-refractory acute lymphoblastic leukemia.** *Science translational medicine* 5, 177ra138.

Bridgeman, J. S., Hawkins, R. E., Hombach, A. A., Abken, H., and Gilham, D. E. (2010). **Building better chimeric antigen receptors for adoptive T cell therapy.** *Current gene therapy* 10, 77-90.

Budde, L. E., Berger, C., Lin, Y., Wang, J., Lin, X., Frayo, S. E., Brouns, S. A., Spencer, D. M., Till, B. G., Jensen, M. C., *et al.* (2013). **Combining a CD20 chimeric antigen receptor and an inducible caspase 9 suicide switch to improve the efficacy and safety of T cell adoptive immunotherapy for lymphoma.** *PloS one* 8, e82742.

Burnet, M. (1957). **Cancer; a biological approach. I. The processes of control.** *British medical journal* 1, 779-786.

Burt, R. K., Drobyski, W. R., Seregina, T., Traynor, A., Oyama, Y., Keever-Taylor, C., Stefka, J., Kuzel, T. M., Brush, M., Rodriguez, J., *et al.* (2003). **Herpes simplex thymidine kinase gene-transduced donor lymphocyte infusions.** *Experimental hematology* 31, 903-910.

Carter, P., Presta, L., Gorman, C. M., Ridgway, J. B., Henner, D., Wong, W. L., Rowland, A. M., Kotts, C., Carver, M. E., and Shepard, H. M. (1992). **Humanization of an anti-p185HER2 antibody for human cancer therapy.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89, 4285-4289.

Cattoglio, C., Facchini, G., Sartori, D., Antonelli, A., Miccio, A., Cassani, B., Schmidt, M., von Kalle, C., Howe, S., Thrasher, A. J., *et al.* (2007). **Hot spots of retroviral integration in human CD34+ hematopoietic cells.** *Blood* 110, 1770-1778.

Cavazzana-Calvo, M., Hacein-Bey, S., de Saint Basile, G., Gross, F., Yvon, E., Nusbaum, P., Selz, F., Hue, C., Certain, S., Casanova, J. L., *et al.* (2000). **Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease.** *Science* 288, 669-672.

Cella, M., Scheidegger, D., Palmer-Lehmann, K., Lane, P., Lanzavecchia, A., and Alber, G. (1996). **Ligation of CD40 on dendritic cells triggers production of high levels of interleukin-12 and enhances T cell stimulatory capacity: T-T help via APC activation.** *The Journal of experimental medicine* 184, 747-752.

Chalmers, D., Ferrand, C., Apperley, J. F., Melo, J. V., Ebeling, S., Newton, I., Duperrier, A., Hagenbeek, A., Garrett, E., Tiberghien, P., and Garin, M. (2001). **Elimination of the truncated message from the herpes simplex virus thymidine kinase suicide gene.** *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 4, 146-148.

Chen, W., Jin, W., Hardegen, N., Lei, K. J., Li, L., Marinon, N., McGrady, G., and Wahl, S. M. (2003). **Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3.** *The Journal of experimental medicine* 198, 1875-1886.

Chmielewski, M., Hombach, A. A., and Abken, H. (2014). **Of CARs and TRUCKs: chimeric antigen receptor (CAR) T cells engineered with an inducible cytokine to modulate the tumor stroma.** *Immunological reviews* 257, 83-90.

Chouaib, S. (2003). **Integrating the quality of the cytotoxic response and tumor susceptibility into the design of protective vaccines in tumor immunotherapy.** *The Journal of clinical investigation* 111, 595-597.

Christian, M., Cermak, T., Doyle, E. L., Schmidt, C., Zhang, F., Hummel, A., Bogdanove, A. J., and Voytas, D. F. (2010). **Targeting DNA double-strand breaks with TAL effector nucleases.** *Genetics* 186, 757-761.

Ciceri, F., Bonini, C., Markt, S., Zappone, E., Servida, P., Bernardi, M., Pescarollo, A., Bondanza, A., Peccatori, J., Rossini, S., *et al.* (2007). **Antitumor effects of HSV-TK-engineered donor lymphocytes after allogeneic stem-cell transplantation.** *Blood* 109, 4698-4707.

Ciceri, F., Bonini, C., Stanghellini, M. T., Bondanza, A., Traversari, C., Salomoni, M., Turchetto, L., Colombi, S., Bernardi, M., Peccatori, J., *et al.* (2009). **Infusion of suicide-gene-engineered donor lymphocytes after family haploidentical haemopoietic stem-cell transplantation for leukaemia (the TK007 trial): a non-randomised phase I-II study.** *The Lancet Oncology* 10, 489-500.

Cieri, N., Camisa, B., Cocchiarella, F., Forcato, M., Oliveira, G., Provasi, E., Bondanza, A., Bordignon, C., Peccatori, J., Ciceri, F., *et al.* (2013). **IL-7 and IL-15 instruct the generation of human memory stem T cells from naive precursors.** *Blood* 121, 573-584.

Clackson, T., Yang, W., Rozamus, L. W., Hatada, M., Amara, J. F., Rollins, C. T., Stevenson, L. F., Magari, S. R., Wood, S. A., Courage, N. L., *et al.* (1998). **Redesigning an FKBP-ligand interface to generate chemical dimerizers with novel specificity.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 10437-10442.

Copelan, E. A. (2006). **Hematopoietic stem-cell transplantation.** *The New England journal of medicine* 354, 1813-1826.

Corrigan-Curay, J., Kiem, H. P., Baltimore, D., O'Reilly, M., Brentjens, R. J., Cooper, L., Forman, S., Gottschalk, S., Greenberg, P., Junghans, R., *et al.* (2014). **T-cell immunotherapy: looking forward.** *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 22, 1564-1574.

Coulbaly, S. T., Rossolillo, P., Winter, F., Kretzschmar, F. K., Braye, M., Martin, D. P., Lener, D., and Negroni, M. (2015). **Potent Sensitisation of Cancer Cells to Anticancer Drugs by a Quadruple Mutant of the Human Deoxycytidine Kinase.** *PLoS one* 10, e0140741.

Coulie, P. G., Brichard, V., Van Pel, A., Wolfel, T., Schneider, J., Traversari, C., Mattei, S., De Plaen, E., Lurquin, C., Szikora, J. P., *et al.* (1994). **A new gene coding for a differentiation antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on HLA-A2 melanomas.** *The Journal of experimental medicine* 180, 35-42.

- Couzin-Frankel, J. (2013). **Breakthrough of the year 2013. Cancer immunotherapy.** *Science* 342, 1432-1433.
- Curran, K. J., Seinstra, B. A., Nikhamin, Y., Yeh, R., Usachenko, Y., van Leeuwen, D. G., Purdon, T., Pegram, H. J., and Brentjens, R. J. (2015). **Enhancing antitumor efficacy of chimeric antigen receptor T cells through constitutive CD40L expression.** *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 23, 769-778.
- Davila, M. L., Riviere, I., Wang, X., Bartido, S., Park, J., Curran, K., Chung, S. S., Stefanski, J., Borquez-Ojeda, O., Olszewska, M., *et al.* (2014). **Efficacy and toxicity management of 19-28z CAR T cell therapy in B cell acute lymphoblastic leukemia.** *Science translational medicine* 6, 224ra225.
- de Felipe, P., Luke, G. A., Brown, J. D., and Ryan, M. D. (2010). **Inhibition of 2A-mediated 'cleavage' of certain artificial polyproteins bearing N-terminal signal sequences.** *Biotechnology journal* 5, 213-223.
- de Felipe, P., Luke, G. A., Hughes, L. E., Gani, D., Halpin, C., and Ryan, M. D. (2006). **E unum pluribus: multiple proteins from a self-processing polyprotein.** *Trends in biotechnology* 24, 68-75.
- Del Vecchio, M., Bajetta, E., Canova, S., Lotze, M. T., Wesa, A., Parmiani, G., and Anichini, A. (2007). **Interleukin-12: biological properties and clinical application.** *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 13, 4677-4685.
- Delyon, J., Maio, M., and Lebbe, C. (2015). **The ipilimumab lesson in melanoma: achieving long-term survival.** *Seminars in oncology* 42, 387-401.
- Desnoyers, L. R., Vasiljeva, O., Richardson, J. H., Yang, A., Menendez, E. E., Liang, T. W., Wong, C., Bessette, P. H., Kamath, K., Moore, S. J., *et al.* (2013). **Tumor-specific activation of an EGFR-targeting antibody enhances therapeutic index.** *Science translational medicine* 5, 207ra144.
- Di Stasi, A., Tey, S. K., Dotti, G., Fujita, Y., Kennedy-Nasser, A., Martinez, C., Straathof, K., Liu, E., Durett, A. G., Grilley, B., *et al.* (2011). **Inducible apoptosis as a safety switch for adoptive cell therapy.** *The New England journal of medicine* 365, 1673-1683.
- Dong, H., Strome, S. E., Salomao, D. R., Tamura, H., Hirano, F., Flies, D. B., Roche, P. C., Lu, J., Zhu, G., Tamada, K., *et al.* (2002). **Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion.** *Nature medicine* 8, 793-800.
- Donnelly, M. L., Hughes, L. E., Luke, G., Mendoza, H., ten Dam, E., Gani, D., and Ryan, M. D. (2001a). **The 'cleavage' activities of foot-and-mouth disease virus 2A site-directed mutants and naturally occurring '2A-like' sequences.** *The Journal of general virology* 82, 1027-1041.
- Donnelly, M. L., Luke, G., Mehrotra, A., Li, X., Hughes, L. E., Gani, D., and Ryan, M. D. (2001b). **Analysis of the aphthovirus 2A/2B polyprotein 'cleavage' mechanism indicates not a proteolytic reaction, but a novel translational effect: a putative ribosomal 'skip'.** *The Journal of general virology* 82, 1013-1025.
- Dudley, M. E., Wunderlich, J. R., Robbins, P. F., Yang, J. C., Hwu, P., Schwartzentruber, D. J., Topalian, S. L., Sherry, R., Restifo, N. P., Hubicki, A. M., *et al.* (2002). **Cancer regression and autoimmunity in patients after clonal repopulation with antitumor lymphocytes.** *Science* 298, 850-854.
- Dunn, G. P., Old, L. J., and Schreiber, R. D. (2004). **The three Es of cancer immunoeediting.** *Annual review of immunology* 22, 329-360.
- Ellyard, J. I., Simson, L., and Parish, C. R. (2007). **Th2-mediated anti-tumour immunity: friend or foe?** *Tissue antigens* 70, 1-11.
- Eshhar, Z., Bach, N., Fitzer-Attas, C. J., Gross, G., Lustgarten, J., Waks, T., and Schindler, D. G. (1996). **The T-body approach: potential for cancer immunotherapy.** *Springer seminars in immunopathology* 18, 199-209.
- Eshhar, Z., Waks, T., Gross, G., and Schindler, D. G. (1993). **Specific activation and targeting of cytotoxic lymphocytes through chimeric single chains consisting of antibody-binding domains and the gamma or zeta subunits of the immunoglobulin and T-cell receptors.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90, 720-724.
- Fedorov, V. D., Themeli, M., and Sadelain, M. (2013). **PD-1- and CTLA-4-based inhibitory chimeric antigen receptors (iCARs) divert off-target immunotherapy responses.** *Science translational medicine* 5, 215ra172.

Fehse, B., Ayuk, F. A., Kroger, N., Fang, L., Kuhlcke, K., Heinzemann, M., Zabelina, T., Fauser, A. A., and Zander, A. R. (2004). **Evidence for increased risk of secondary graft failure after in vivo depletion of suicide gene-modified T lymphocytes transplanted in conjunction with CD34+-enriched blood stem cells.** *Blood* *104*, 3408-3409.

Ferrara, J. L., Levine, J. E., Reddy, P., and Holler, E. (2009). **Graft-versus-host disease.** *Lancet* *373*, 1550-1561.

Finkelshtein, D., Werman, A., Novick, D., Barak, S., and Rubinstein, M. (2013). **LDL receptor and its family members serve as the cellular receptors for vesicular stomatitis virus.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *110*, 7306-7311.

Frecha, C., Levy, C., Cosset, F. L., and Verhoeven, E. (2010). **Advances in the field of lentivector-based transduction of T and B lymphocytes for gene therapy.** *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* *18*, 1748-1757.

Freeman, G. J., Long, A. J., Iwai, Y., Bourque, K., Chernova, T., Nishimura, H., Fitz, L. J., Malenkovich, N., Okazaki, T., Byrne, M. C., *et al.* (2000). **Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation.** *The Journal of experimental medicine* *192*, 1027-1034.

Fridman, W. H., Pages, F., Sautes-Fridman, C., and Galon, J. (2012). **The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome.** *Nature reviews Cancer* *12*, 298-306.

Froelich, S., Tai, A., and Wang, P. (2010). **Lentiviral vectors for immune cells targeting.** *Immunopharmacology and immunotoxicology* *32*, 208-218.

Fujii, S., Shimizu, K., Shimizu, T., and Lotze, M. T. (2001). **Interleukin-10 promotes the maintenance of antitumor CD8(+) T-cell effector function in situ.** *Blood* *98*, 2143-2151.

Galon, J., Costes, A., Sanchez-Cabo, F., Kirilovsky, A., Mlecnik, B., Lagorce-Pages, C., Tosolini, M., Camus, M., Berger, A., Wind, P., *et al.* (2006). **Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome.** *Science* *313*, 1960-1964.

Gamonet, C., Bole-Richard, E., Delherme, A., Aubin, F., Toussiot, E., Garnache-Ottou, F., Godet, Y., Ysebaert, L., Tournilhac, O., Caroline, D., *et al.* (2015). **New CD20 alternative splice variants: molecular identification and differential expression within hematological B cell malignancies.** *Experimental hematology & oncology* *5*, 7.

Gan, H. K., Cvrljevic, A. N., and Johns, T. G. (2013). **The epidermal growth factor receptor variant III (EGFRvIII): where wild things are altered.** *The FEBS journal* *280*, 5350-5370.

Garin, M. I., Garrett, E., Tiberghien, P., Apperley, J. F., Chalmers, D., Melo, J. V., and Ferrand, C. (2001). **Molecular mechanism for ganciclovir resistance in human T lymphocytes transduced with retroviral vectors carrying the herpes simplex virus thymidine kinase gene.** *Blood* *97*, 122-129.

Gattinoni, L., Lugli, E., Ji, Y., Pos, Z., Paulos, C. M., Quigley, M. F., Almeida, J. R., Gostick, E., Yu, Z., Carpenito, C., *et al.* (2011). **A human memory T cell subset with stem cell-like properties.** *Nature medicine* *17*, 1290-1297.

Gattinoni, L., and Restifo, N. P. (2013). **Moving T memory stem cells to the clinic.** *Blood* *121*, 567-568.

Gattinoni, L., Zhong, X. S., Palmer, D. C., Ji, Y., Hinrichs, C. S., Yu, Z., Wrzesinski, C., Boni, A., Cassard, L., Garvin, L. M., *et al.* (2009). **Wnt signaling arrests effector T cell differentiation and generates CD8+ memory stem cells.** *Nature medicine* *15*, 808-813.

Geller, M. A., and Miller, J. S. (2011). **Use of allogeneic NK cells for cancer immunotherapy.** *Immunotherapy* *3*, 1445-1459.

Gill, S., Maus, M. V., and Porter, D. L. (2015). **Chimeric antigen receptor T cell therapy: 25years in the making.** *Blood reviews*.

Glimcher, L. H., and Murphy, K. M. (2000). **Lineage commitment in the immune system: the T helper lymphocyte grows up.** *Genes & development* *14*, 1693-1711.

Goebeler, M. E., Knop, S., Viardot, A., Kufer, P., Topp, M. S., Einsele, H., Noppeney, R., Hess, G., Kallert, S., Mackensen, A., *et al.* (2016). **Bispecific T-Cell Engager (BiTE) Antibody Construct Blinatumomab for the Treatment of Patients With Relapsed/Refractory Non-Hodgkin Lymphoma:**

Final Results From a Phase I Study. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology.

Goverman, J., Gomez, S. M., Segesman, K. D., Hunkapiller, T., Laug, W. E., and Hood, L. (1990). **Chimeric immunoglobulin-T cell receptor proteins form functional receptors: implications for T cell receptor complex formation and activation.** Cell 60, 929-939.

Grada, Z., Hegde, M., Byrd, T., Shaffer, D. R., Ghazi, A., Brawley, V. S., Corder, A., Schonfeld, K., Koch, J., Dotti, G., *et al.* (2013). **TanCAR: A Novel Bispecific Chimeric Antigen Receptor for Cancer Immunotherapy.** Molecular therapy Nucleic acids 2, e105.

Greco, R., Oliveira, G., Stanghellini, M. T., Vago, L., Bondanza, A., Peccatori, J., Cieri, N., Markt, S., Mastaglio, S., Bordignon, C., *et al.* (2015). **Improving the safety of cell therapy with the TK-suicide gene.** Frontiers in pharmacology 6, 95.

Griffioen, M., van Egmond, E. H., Kester, M. G., Willemze, R., Falkenburg, J. H., and Heemskerk, M. H. (2009). **Retroviral transfer of human CD20 as a suicide gene for adoptive T-cell therapy.** Haematologica 94, 1316-1320.

Gross, G., Waks, T., and Eshhar, Z. (1989). **Expression of immunoglobulin-T-cell receptor chimeric molecules as functional receptors with antibody-type specificity.** Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 86, 10024-10028.

Grupp, S. A., Kalos, M., Barrett, D., Aplenc, R., Porter, D. L., Rheingold, S. R., Teachey, D. T., Chew, A., Hauck, B., Wright, J. F., *et al.* (2013). **Chimeric antigen receptor-modified T cells for acute lymphoid leukemia.** The New England journal of medicine 368, 1509-1518.

Hami, L. S., Green, C., Leshinsky, N., Markham, E., Miller, K., and Craig, S. (2004). **GMP production and testing of Xcellerated T Cells for the treatment of patients with CLL.** Cytotherapy 6, 554-562.

Hamid, O. (2014). **Immunotherapy for melanoma using programmed death 1 checkpoint inhibitors.** Clinical advances in hematology & oncology : H&O 12, 782-784.

Heimberger, A. B., Hlatky, R., Suki, D., Yang, D., Weinberg, J., Gilbert, M., Sawaya, R., and Aldape, K. (2005). **Prognostic effect of epidermal growth factor receptor and EGFRvIII in glioblastoma multiforme patients.** Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research 11, 1462-1466.

Henry, C., Deschamps, M., Rohrlich, P. S., Pallandre, J. R., Remy-Martin, J. P., Callanan, M., Traverse-Glehen, A., GrandClement, C., Garnache-Ottou, F., Gressin, R., *et al.* (2010). **Identification of an alternative CD20 transcript variant in B-cell malignancies coding for a novel protein associated to rituximab resistance.** Blood 115, 2420-2429.

Hermanson, D. L., and Kaufman, D. S. (2015). **Utilizing chimeric antigen receptors to direct natural killer cell activity.** Frontiers in immunology 6, 195.

Heufler, C., Koch, F., Stanzl, U., Topar, G., Wysocka, M., Trinchieri, G., Enk, A., Steinman, R. M., Romani, N., and Schuler, G. (1996). **Interleukin-12 is produced by dendritic cells and mediates T helper 1 development as well as interferon-gamma production by T helper 1 cells.** European journal of immunology 26, 659-668.

Hodi, F. S., O'Day, S. J., McDermott, D. F., Weber, R. W., Sosman, J. A., Haanen, J. B., Gonzalez, R., Robert, C., Schadendorf, D., Hassel, J. C., *et al.* (2010). **Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma.** The New England journal of medicine 363, 711-723.

Hoffmann, P., Hofmeister, R., Brischwein, K., Brandl, C., Crommer, S., Bargou, R., Itin, C., Prang, N., and Baeuerle, P. A. (2005). **Serial killing of tumor cells by cytotoxic T cells redirected with a CD19-/CD3-bispecific single-chain antibody construct.** International journal of cancer Journal international du cancer 115, 98-104.

Houghton, B. C., Booth, C., and Thrasher, A. J. (2015). **Lentivirus technologies for modulation of the immune system.** Current opinion in pharmacology 24, 119-127.

Hsieh, C. S., Macatonia, S. E., Tripp, C. S., Wolf, S. F., O'Garra, A., and Murphy, K. M. (1993). **Development of TH1 CD4+ T cells through IL-12 produced by Listeria-induced macrophages.** Science 260, 547-549.

Hsu, P. D., Lander, E. S., and Zhang, F. (2014). **Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering.** Cell 157, 1262-1278.

Hudecek, M., Schmitt, T. M., Baskar, S., Lupo-Stanghellini, M. T., Nishida, T., Yamamoto, T. N., Bleakley, M., Turtle, C. J., Chang, W. C., Greisman, H. A., *et al.* (2010). **The B-cell tumor-associated antigen ROR1 can be targeted with T cells modified to express a ROR1-specific chimeric antigen receptor.** *Blood* 116, 4532-4541.

Hwu, P., Yang, J. C., Cowherd, R., Treisman, J., Shafer, G. E., Eshhar, Z., and Rosenberg, S. A. (1995). **In vivo antitumor activity of T cells redirected with chimeric antibody/T-cell receptor genes.** *Cancer research* 55, 3369-3373.

Introna, M., Barbui, A. M., Bambacioni, F., Casati, C., Gaipa, G., Borleri, G., Bernasconi, S., Barbui, T., Golay, J., Biondi, A., and Rambaldi, A. (2000). **Genetic modification of human T cells with CD20: a strategy to purify and lyse transduced cells with anti-CD20 antibodies.** *Human gene therapy* 11, 611-620.

Iulucci, J. D., Oliver, S. D., Morley, S., Ward, C., Ward, J., Dalgarno, D., Clackson, T., and Berger, H. J. (2001). **Intravenous safety and pharmacokinetics of a novel dimerizer drug, AP1903, in healthy volunteers.** *Journal of clinical pharmacology* 41, 870-879.

John, L. B., Devaud, C., Duong, C. P., Yong, C. S., Beavis, P. A., Haynes, N. M., Chow, M. T., Smyth, M. J., Kershaw, M. H., and Darcy, P. K. (2013). **Anti-PD-1 antibody therapy potently enhances the eradication of established tumors by gene-modified T cells.** *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 19, 5636-5646.

Johnson, L. A., Scholler, J., Ohkuri, T., Kosaka, A., Patel, P. R., McGettigan, S. E., Nace, A. K., Dentchev, T., Thekkat, P., Loew, A., *et al.* (2015). **Rational development and characterization of humanized anti-EGFR variant III chimeric antigen receptor T cells for glioblastoma.** *Science translational medicine* 7, 275ra222.

Kaech, S. M., and Cui, W. (2012). **Transcriptional control of effector and memory CD8+ T cell differentiation.** *Nature reviews Immunology* 12, 749-761.

Kaiser, A. D., Assenmacher, M., Schroder, B., Meyer, M., Orentas, R., Bethke, U., and Dropulic, B. (2015). **Towards a commercial process for the manufacture of genetically modified T cells for therapy.** *Cancer gene therapy* 22, 72-78.

Kammula, U. S., White, D. E., and Rosenberg, S. A. (1998). **Trends in the safety of high dose bolus interleukin-2 administration in patients with metastatic cancer.** *Cancer* 83, 797-805.

Kennedy, R., and Celis, E. (2008). **Multiple roles for CD4+ T cells in anti-tumor immune responses.** *Immunological reviews* 222, 129-144.

Kerker, S. P., and Restifo, N. P. (2012). **Cellular constituents of immune escape within the tumor microenvironment.** *Cancer research* 72, 3125-3130.

Kershaw, M. H., Westwood, J. A., and Darcy, P. K. (2013). **Gene-engineered T cells for cancer therapy.** *Nature reviews Cancer* 13, 525-541.

Klebanoff, C. A., Rosenberg, S. A., and Restifo, N. P. (2016). **Prospects for gene-engineered T cell immunotherapy for solid cancers.** *Nature medicine* 22, 26-36.

Klinger, M., Benjamin, J., Kischel, R., Stienen, S., and Zugmaier, G. (2016). **Harnessing T cells to fight cancer with BiTE((R)) antibody constructs - past developments and future directions.** *Immunological reviews* 270, 193-208.

Kloss, C. C., Condomines, M., Cartellieri, M., Bachmann, M., and Sadelain, M. (2013). **Combinatorial antigen recognition with balanced signaling promotes selective tumor eradication by engineered T cells.** *Nature biotechnology* 31, 71-75.

Kobayashi, H., Nagato, T., Aoki, N., Sato, K., Kimura, S., Tateno, M., and Celis, E. (2006a). **Defining MHC class II T helper epitopes for WT1 tumor antigen.** *Cancer immunology, immunotherapy : CII* 55, 850-860.

Kobayashi, H., Nagato, T., Yanai, M., Oikawa, K., Sato, K., Kimura, S., Tateno, M., Omiya, R., and Celis, E. (2004). **Recognition of adult T-cell leukemia/lymphoma cells by CD4+ helper T lymphocytes specific for human T-cell leukemia virus type I envelope protein.** *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 10, 7053-7062.

Kobayashi, H., Ngato, T., Sato, K., Aoki, N., Kimura, S., Tanaka, Y., Aizawa, H., Tateno, M., and Celis, E. (2006b). **In vitro peptide immunization of target tax protein human T-cell leukemia virus type 1-**

specific CD4+ helper T lymphocytes. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 12, 3814-3822.

Kochenderfer, J. N., Dudley, M. E., Feldman, S. A., Wilson, W. H., Spaner, D. E., Maric, I., Stetler-Stevenson, M., Phan, G. Q., Hughes, M. S., Sherry, R. M., *et al.* (2012). **B-cell depletion and remissions of malignancy along with cytokine-associated toxicity in a clinical trial of anti-CD19 chimeric-antigen-receptor-transduced T cells.** *Blood* 119, 2709-2720.

Kochenderfer, J. N., Dudley, M. E., Kassim, S. H., Somerville, R. P., Carpenter, R. O., Stetler-Stevenson, M., Yang, J. C., Phan, G. Q., Hughes, M. S., Sherry, R. M., *et al.* (2015). **Chemotherapy-refractory diffuse large B-cell lymphoma and indolent B-cell malignancies can be effectively treated with autologous T cells expressing an anti-CD19 chimeric antigen receptor.** *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 33, 540-549.

Kohler, G., and Milstein, C. (1975). **Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity.** *Nature* 256, 495-497.

Koneru, M., O'Ceirbhail, R., Pendharkar, S., Spriggs, D. R., and Brentjens, R. J. (2015a). **A phase I clinical trial of adoptive T cell therapy using IL-12 secreting MUC-16(ecto) directed chimeric antigen receptors for recurrent ovarian cancer.** *Journal of translational medicine* 13, 102.

Koneru, M., Purdon, T. J., Spriggs, D., Koneru, S., and Brentjens, R. J. (2015b). **IL-12 secreting tumor-targeted chimeric antigen receptor T cells eradicate ovarian tumors.** *Oncoimmunology* 4, e994446.

Kootstra, N. A., and Verma, I. M. (2003). **Gene therapy with viral vectors.** *Annual review of pharmacology and toxicology* 43, 413-439.

Krop, I. E., LoRusso, P., Miller, K. D., Modi, S., Yardley, D., Rodriguez, G., Guardino, E., Lu, M., Zheng, M., Girish, S., *et al.* (2012). **A phase II study of trastuzumab emtansine in patients with human epidermal growth factor receptor 2-positive metastatic breast cancer who were previously treated with trastuzumab, lapatinib, an anthracycline, a taxane, and capecitabine.** *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 30, 3234-3241.

Kryczek, I., Banerjee, M., Cheng, P., Vatan, L., Szeliga, W., Wei, S., Huang, E., Finlayson, E., Simeone, D., Welling, T. H., *et al.* (2009). **Phenotype, distribution, generation, and functional and clinical relevance of Th17 cells in the human tumor environments.** *Blood* 114, 1141-1149.

Kuwana, Y., Asakura, Y., Utsunomiya, N., Nakanishi, M., Arata, Y., Itoh, S., Nagase, F., and Kurosawa, Y. (1987). **Expression of chimeric receptor composed of immunoglobulin-derived V regions and T-cell receptor-derived C regions.** *Biochemical and biophysical research communications* 149, 960-968.

Lamers, C. H., van Elzaker, P., Langeveld, S. C., Sleijfer, S., and Gratama, J. W. (2006). **Process validation and clinical evaluation of a protocol to generate gene-modified T lymphocytes for immunogene therapy for metastatic renal cell carcinoma: GMP-controlled transduction and expansion of patient's T lymphocytes using a carboxy anhydrase IX-specific scFv transgene.** *Cytotherapy* 8, 542-553.

Larkin, J., Hodi, F. S., and Wolchok, J. D. (2015). **Combined Nivolumab and Ipilimumab or Monotherapy in Untreated Melanoma.** *The New England journal of medicine* 373, 1270-1271.

Lasek, W., Zagozdzon, R., and Jakobisiak, M. (2014). **Interleukin 12: still a promising candidate for tumor immunotherapy?** *Cancer immunology, immunotherapy : CII* 63, 419-435.

Le Blanc, K., Samuelsson, H., Gustafsson, B., Remberger, M., Sundberg, B., Arvidson, J., Ljungman, P., Lonnies, H., Nava, S., and Ringden, O. (2007). **Transplantation of mesenchymal stem cells to enhance engraftment of hematopoietic stem cells.** *Leukemia* 21, 1733-1738.

Lee, D. W., Kochenderfer, J. N., Stetler-Stevenson, M., Cui, Y. K., Delbrook, C., Feldman, S. A., Fry, T. J., Orentas, R., Sabatino, M., Shah, N. N., *et al.* (2015). **T cells expressing CD19 chimeric antigen receptors for acute lymphoblastic leukaemia in children and young adults: a phase 1 dose-escalation trial.** *Lancet* 385, 517-528.

Li, L., Dutra, A., Pak, E., Labrie, J. E., 3rd, Gerstein, R. M., Pandolfi, P. P., Recht, L. D., and Ross, A. H. (2009). **EGFRvIII expression and PTEN loss synergistically induce chromosomal instability and glial tumors.** *Neuro-oncology* 11, 9-21.

Li, M. O., Wan, Y. Y., and Flavell, R. A. (2007). **T cell-produced transforming growth factor-beta1 controls T cell tolerance and regulates Th1- and Th17-cell differentiation.** *Immunity* 26, 579-591.

- Li, S., Schmitz, K. R., Jeffrey, P. D., Wiltzius, J. J., Kussie, P., and Ferguson, K. M. (2005). **Structural basis for inhibition of the epidermal growth factor receptor by cetuximab**. *Cancer cell* 7, 301-311.
- Lombardo, A., and Naldini, L. (2014). **Genome editing: a tool for research and therapy: targeted genome editing hits the clinic**. *Nature medicine* 20, 1101-1103.
- Longley, D. B., Harkin, D. P., and Johnston, P. G. (2003). **5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies**. *Nature reviews Cancer* 3, 330-338.
- Maeder, M. L., and Gersbach, C. A. (2016). **Genome-editing Technologies for Gene and Cell Therapy**. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*.
- Marquez-Rodas, I., Cerezuela, P., Soria, A., Berrocal, A., Riso, A., Gonzalez-Cao, M., and Martin-Algarra, S. (2015). **Immune checkpoint inhibitors: therapeutic advances in melanoma**. *Annals of translational medicine* 3, 267.
- Martinez, M. T., Perez-Fidalgo, J. A., Martin-Martorell, P., Cejalvo, J. M., Pons, V., Bermejo, B., Martin, M., Albanell, J., and Lluch, A. (2015). **Treatment of HER2 positive advanced breast cancer with T-DM1: A review of the literature**. *Critical reviews in oncology/hematology*.
- Maude, S. L., Frey, N., Shaw, P. A., Aplenc, R., Barrett, D. M., Bunin, N. J., Chew, A., Gonzalez, V. E., Zheng, Z., Lacey, S. F., *et al.* (2014). **Chimeric antigen receptor T cells for sustained remissions in leukemia**. *The New England journal of medicine* 371, 1507-1517.
- Maus, M. V., and June, C. H. (2016). **Making Better Chimeric Antigen Receptors for Adoptive T-cell Therapy**. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 22, 1875-1884.
- Mellman, I., Coukos, G., and Dranoff, G. (2011). **Cancer immunotherapy comes of age**. *Nature* 480, 480-489.
- Mercier-Letondal, P., Deschamps, M., Sauce, D., Certoux, J. M., Milpied, N., Lioure, B., Cahn, J. Y., Deconinck, E., Ferrand, C., Tiberghien, P., and Robinet, E. (2008). **Early immune response against retrovirally transduced herpes simplex virus thymidine kinase-expressing gene-modified T cells coinfused with a T cell-depleted marrow graft: an altered immune response?** *Human gene therapy* 19, 937-950.
- Merhavi-Shoham, E., Haga-Friedman, A., and Cohen, C. J. (2012). **Genetically modulating T-cell function to target cancer**. *Seminars in cancer biology* 22, 14-22.
- Mezzanzanica, D., Canevari, S., Mazzoni, A., Figini, M., Colnaghi, M. I., Waks, T., Schindler, D. G., and Eshhar, Z. (1998). **Transfer of chimeric receptor gene made of variable regions of tumor-specific antibody confers anticarbohydrate specificity on T cells**. *Cancer gene therapy* 5, 401-407.
- Miao, H., Choi, B. D., Suryadevara, C. M., Sanchez-Perez, L., Yang, S., De Leon, G., Sayour, E. J., McLendon, R., Herndon, J. E., 2nd, Healy, P., *et al.* (2014). **EGFRvIII-specific chimeric antigen receptor T cells migrate to and kill tumor deposits infiltrating the brain parenchyma in an invasive xenograft model of glioblastoma**. *PloS one* 9, e94281.
- Miller, J. S., Soignier, Y., Panoskaltsis-Mortari, A., McNearney, S. A., Yun, G. H., Fautsch, S. K., McKenna, D., Le, C., Defor, T. E., Burns, L. J., *et al.* (2005). **Successful adoptive transfer and in vivo expansion of human haploidentical NK cells in patients with cancer**. *Blood* 105, 3051-3057.
- Milone, M. C., Fish, J. D., Carpenito, C., Carroll, R. G., Binder, G. K., Teachey, D., Samanta, M., Lakhai, M., Gloss, B., Danet-Desnoyers, G., *et al.* (2009). **Chimeric receptors containing CD137 signal transduction domains mediate enhanced survival of T cells and increased antileukemic efficacy in vivo**. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 17, 1453-1464.
- Mitchison, N. A. (1955). **Studies on the immunological response to foreign tumor transplants in the mouse. I. The role of lymph node cells in conferring immunity by adoptive transfer**. *The Journal of experimental medicine* 102, 157-177.
- Miyoshi, H., Blomer, U., Takahashi, M., Gage, F. H., and Verma, I. M. (1998). **Development of a self-inactivating lentivirus vector**. *Journal of virology* 72, 8150-8157.
- Mocellin, S., Rossi, C. R., and Nitti, D. (2004). **Cancer vaccine development: on the way to break immune tolerance to malignant cells**. *Experimental cell research* 299, 267-278.
- Morgan, R. A., Johnson, L. A., Davis, J. L., Zheng, Z., Woolard, K. D., Reap, E. A., Feldman, S. A., Chinnasamy, N., Kuan, C. T., Song, H., *et al.* (2012). **Recognition of glioma stem cells by genetically**

modified T cells targeting EGFRvIII and development of adoptive cell therapy for glioma. *Human gene therapy* 23, 1043-1053.

Morgan, R. A., Yang, J. C., Kitano, M., Dudley, M. E., Laurencot, C. M., and Rosenberg, S. A. (2010). **Case report of a serious adverse event following the administration of T cells transduced with a chimeric antigen receptor recognizing ERBB2.** *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 18, 843-851.

Munshi, N. C., Govindarajan, R., Drake, R., Ding, L. M., Iyer, R., Saylor, R., Kornbluth, J., Marcus, S., Chiang, Y., Ennist, D., *et al.* (1997). **Thymidine kinase (TK) gene-transduced human lymphocytes can be highly purified, remain fully functional, and are killed efficiently with ganciclovir.** *Blood* 89, 1334-1340.

Muul, L. M., Spiess, P. J., Director, E. P., and Rosenberg, S. A. (1987). **Identification of specific cytolytic immune responses against autologous tumor in humans bearing malignant melanoma.** *J Immunol* 138, 989-995.

Nadler, L. M., Anderson, K. C., Marti, G., Bates, M., Park, E., Daley, J. F., and Schlossman, S. F. (1983). **B4, a human B lymphocyte-associated antigen expressed on normal, mitogen-activated, and malignant B lymphocytes.** *J Immunol* 131, 244-250.

Ohno, M., Natsume, A., Ichiro Iwami, K., Iwamizu, H., Noritake, K., Ito, D., Toi, Y., Ito, M., Motomura, K., Yoshida, J., *et al.* (2010). **Retrovirally engineered T-cell-based immunotherapy targeting type III variant epidermal growth factor receptor, a glioma-associated antigen.** *Cancer science* 101, 2518-2524.

Oldham, R. A., Berinstein, E. M., and Medin, J. A. (2015). **Lentiviral vectors in cancer immunotherapy.** *Immunotherapy* 7, 271-284.

Ostermann, N., Lavie, A., Padiyar, S., Brundiers, R., Veit, T., Reinstein, J., Goody, R. S., Konrad, M., and Schlichting, I. (2000). **Potentiating AZT activation: structures of wild-type and mutant human thymidylate kinase suggest reasons for the mutants' improved kinetics with the HIV prodrug metabolite AZTMP.** *Journal of molecular biology* 304, 43-53.

Panelli, M. C., White, R., Foster, M., Martin, B., Wang, E., Smith, K., and Marincola, F. M. (2004). **Forecasting the cytokine storm following systemic interleukin (IL)-2 administration.** *Journal of translational medicine* 2, 17.

Parkhurst, M. R., Yang, J. C., Langan, R. C., Dudley, M. E., Nathan, D. A., Feldman, S. A., Davis, J. L., Morgan, R. A., Merino, M. J., Sherry, R. M., *et al.* (2011). **T cells targeting carcinoembryonic antigen can mediate regression of metastatic colorectal cancer but induce severe transient colitis.** *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 19, 620-626.

Pasquini, M. C., Wang, Z., Horowitz, M. M., and Gale, R. P. (2010). **2010 report from the Center for International Blood and Marrow Transplant Research (CIBMTR): current uses and outcomes of hematopoietic cell transplants for blood and bone marrow disorders.** *Clinical transplants*, 87-105.

Pegram, H. J., Park, J. H., and Brentjens, R. J. (2014). **CD28z CARs and armored CARs.** *Cancer J* 20, 127-133.

Peng, W., Ye, Y., Rabinovich, B. A., Liu, C., Lou, Y., Zhang, M., Whittington, M., Yang, Y., Overwijk, W. W., Lizee, G., and Hwu, P. (2010). **Transduction of tumor-specific T cells with CXCR2 chemokine receptor improves migration to tumor and antitumor immune responses.** *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 16, 5458-5468.

Philip, B., Kokalaki, E., Mekkaoui, L., Thomas, S., Straathof, K., Flutter, B., Marin, V., Marafioti, T., Chakraverty, R., Linch, D., *et al.* (2014). **A highly compact epitope-based marker/suicide gene for easier and safer T-cell therapy.** *Blood* 124, 1277-1287.

Pinzon-Charry, A., Maxwell, T., and Lopez, J. A. (2005). **Dendritic cell dysfunction in cancer: a mechanism for immunosuppression.** *Immunology and cell biology* 83, 451-461.

Pistoia, V., Cocco, C., and Airolli, I. (2009). **Interleukin-12 receptor beta2: from cytokine receptor to gatekeeper gene in human B-cell malignancies.** *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 27, 4809-4816.

Plumb, J. A., Strathdee, G., Sludden, J., Kaye, S. B., and Brown, R. (2000). **Reversal of drug resistance in human tumor xenografts by 2'-deoxy-5-azacytidine-induced demethylation of the hMLH1 gene promoter.** *Cancer research* 60, 6039-6044.

Poirot, L., Philip, B., Schiffer-Mannioui, C., Le Clerre, D., Chion-Sotinel, I., Derniame, S., Potrel, P., Bas, C., Lemaire, L., Galetto, R., *et al.* (2015). **Multiplex Genome-Edited T-cell Manufacturing Platform for "Off-the-Shelf" Adoptive T-cell Immunotherapies.** *Cancer research* 75, 3853-3864.

Precopio, M. L., Betts, M. R., Parrino, J., Price, D. A., Gostick, E., Ambrozak, D. R., Asher, T. E., Douek, D. C., Harari, A., Pantaleo, G., *et al.* (2007). **Immunization with vaccinia virus induces polyfunctional and phenotypically distinctive CD8(+) T cell responses.** *The Journal of experimental medicine* 204, 1405-1416.

Qasim, W., Jal Amrolia, P., Samarasinghe, S., Ghorashian, S., Zhan, H., Stafford, S., Butler, K., Ahsan, G., Gilmour, K., Adams, S., *et al.* (2015). **First Clinical Application of Talen Engineered Universal CAR19 T Cells in B-ALL.** *Blood* 126, 2046-2046.

Ramos, C. A., and Dotti, G. (2011). **Chimeric antigen receptor (CAR)-engineered lymphocytes for cancer therapy.** *Expert opinion on biological therapy* 11, 855-873.

Restifo, N. P., Dudley, M. E., and Rosenberg, S. A. (2012). **Adoptive immunotherapy for cancer: harnessing the T cell response.** *Nature reviews Immunology* 12, 269-281.

Riddell, S. R., Watanabe, K. S., Goodrich, J. M., Li, C. R., Agha, M. E., and Greenberg, P. D. (1992). **Restoration of viral immunity in immunodeficient humans by the adoptive transfer of T cell clones.** *Science* 257, 238-241.

Rizvi, N. A., Mazieres, J., Planchard, D., Stinchcombe, T. E., Dy, G. K., Antonia, S. J., Horn, L., Lena, H., Minenza, E., Mennezier, B., *et al.* (2015). **Activity and safety of nivolumab, an anti-PD-1 immune checkpoint inhibitor, for patients with advanced, refractory squamous non-small-cell lung cancer (CheckMate 063): a phase 2, single-arm trial.** *The Lancet Oncology* 16, 257-265.

Robbins, P. F., Dudley, M. E., Wunderlich, J., El-Gamil, M., Li, Y. F., Zhou, J., Huang, J., Powell, D. J., Jr., and Rosenberg, S. A. (2004). **Cutting edge: persistence of transferred lymphocyte clonotypes correlates with cancer regression in patients receiving cell transfer therapy.** *J Immunol* 173, 7125-7130.

Robbins, P. F., Morgan, R. A., Feldman, S. A., Yang, J. C., Sherry, R. M., Dudley, M. E., Wunderlich, J. R., Nahvi, A. V., Helman, L. J., Mackall, C. L., *et al.* (2011). **Tumor regression in patients with metastatic synovial cell sarcoma and melanoma using genetically engineered lymphocytes reactive with NY-ESO-1.** *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 29, 917-924.

Robert, C., Schachter, J., Long, G. V., Arance, A., Grob, J. J., Mortier, L., Daud, A., Carlino, M. S., McNeil, C., Lotem, M., *et al.* (2015). **Pembrolizumab versus Ipilimumab in Advanced Melanoma.** *The New England journal of medicine* 372, 2521-2532.

Rohde, C., Zhang, Y., Reinhardt, R., and Jeltsch, A. (2010). **BISMA--fast and accurate bisulfite sequencing data analysis of individual clones from unique and repetitive sequences.** *BMC bioinformatics* 11, 230.

Rosenberg, S. A. (2001). **Progress in human tumour immunology and immunotherapy.** *Nature* 411, 380-384.

Rosenberg, S. A., Aebbersold, P., Cornetta, K., Kasid, A., Morgan, R. A., Moen, R., Karson, E. M., Lotze, M. T., Yang, J. C., Topalian, S. L., and *et al.* (1990). **Gene transfer into humans--immunotherapy of patients with advanced melanoma, using tumor-infiltrating lymphocytes modified by retroviral gene transduction.** *The New England journal of medicine* 323, 570-578.

Rosenberg, S. A., Mule, J. J., Spiess, P. J., Reichert, C. M., and Schwarz, S. L. (1985). **Regression of established pulmonary metastases and subcutaneous tumor mediated by the systemic administration of high-dose recombinant interleukin 2.** *The Journal of experimental medicine* 161, 1169-1188.

Rosenberg, S. A., Packard, B. S., Aebbersold, P. M., Solomon, D., Topalian, S. L., Toy, S. T., Simon, P., Lotze, M. T., Yang, J. C., Seipp, C. A., and *et al.* (1988). **Use of tumor-infiltrating lymphocytes and interleukin-2 in the immunotherapy of patients with metastatic melanoma. A preliminary report.** *The New England journal of medicine* 319, 1676-1680.

Rosenberg, S. A., and Restifo, N. P. (2015). **Adoptive cell transfer as personalized immunotherapy for human cancer.** *Science* 348, 62-68.

Rosenberg, S. A., Yang, J. C., Sherry, R. M., Kammula, U. S., Hughes, M. S., Phan, G. Q., Citrin, D. E., Restifo, N. P., Robbins, P. F., Wunderlich, J. R., *et al.* (2011). **Durable complete responses in heavily pretreated patients with metastatic melanoma using T-cell transfer immunotherapy.** *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 17, 4550-4557.

Rubinstein, N., Alvarez, M., Zwirner, N. W., Toscano, M. A., Ilarregui, J. M., Bravo, A., Mordoh, J., Fainboim, L., Podhajcer, O. L., and Rabinovich, G. A. (2004). **Targeted inhibition of galectin-1 gene expression in tumor cells results in heightened T cell-mediated rejection; A potential mechanism of tumor-immune privilege.** *Cancer cell* 5, 241-251.

Rudd, C. E., Taylor, A., and Schneider, H. (2009). **CD28 and CTLA-4 coreceptor expression and signal transduction.** *Immunological reviews* 229, 12-26.

Sabatos, C. A., Chakravarti, S., Cha, E., Schubart, A., Sanchez-Fueyo, A., Zheng, X. X., Coyle, A. J., Strom, T. B., Freeman, G. J., and Kuchroo, V. K. (2003). **Interaction of Tim-3 and Tim-3 ligand regulates T helper type 1 responses and induction of peripheral tolerance.** *Nature immunology* 4, 1102-1110.

Sabini, E., Ort, S., Monnerjahn, C., Konrad, M., and Lavie, A. (2003). **Structure of human dCK suggests strategies to improve anticancer and antiviral therapy.** *Nature structural biology* 10, 513-519.

Sadelain, M. (2015). **CAR therapy: the CD19 paradigm.** *The Journal of clinical investigation* 125, 3392-3400.

Sadelain, M., Brentjens, R., and Riviere, I. (2013). **The basic principles of chimeric antigen receptor design.** *Cancer discovery* 3, 388-398.

Sampson, J. H., Choi, B. D., Sanchez-Perez, L., Suryadevara, C. M., Snyder, D. J., Flores, C. T., Schmittling, R. J., Nair, S. K., Reap, E. A., Norberg, P. K., *et al.* (2014). **EGFRvIII mCAR-modified T-cell therapy cures mice with established intracerebral glioma and generates host immunity against tumor-antigen loss.** *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 20, 972-984.

Sauce, D., Tonnelier, N., Duperrier, A., Petracca, B., de Carvalho Bittencourt, M., Saadi, M., Saas, P., Ferrand, C., Herve, P., Tiberghien, P., and Robinet, E. (2002). **Influence of ex vivo expansion and retrovirus-mediated gene transfer on primary T lymphocyte phenotype and functions.** *Journal of hematology & stem cell research* 11, 929-940.

Schneider, U., Schwenk, H. U., and Bornkamm, G. (1977). **Characterization of EBV-genome negative "null" and "T" cell lines derived from children with acute lymphoblastic leukemia and leukemic transformed non-Hodgkin lymphoma.** *International journal of cancer Journal international du cancer* 19, 621-626.

Schreiber, R. D., Old, L. J., and Smyth, M. J. (2011). **Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion.** *Science* 331, 1565-1570.

Scott, A. M., Wolchok, J. D., and Old, L. J. (2012). **Antibody therapy of cancer.** *Nature reviews Cancer* 12, 278-287.

Serafini, M., Manganini, M., Borleri, G., Bonamino, M., Imberti, L., Biondi, A., Golay, J., Rambaldi, A., and Introna, M. (2004). **Characterization of CD20-transduced T lymphocytes as an alternative suicide gene therapy approach for the treatment of graft-versus-host disease.** *Human gene therapy* 15, 63-76.

Shi, H., Sun, M., Liu, L., and Wang, Z. (2014). **Chimeric antigen receptor for adoptive immunotherapy of cancer: latest research and future prospects.** *Molecular cancer* 13, 219.

Sirven, A., Pflumio, F., Zennou, V., Titeux, M., Vainchenker, W., Coulombel, L., Dubart-Kupperschmitt, A., and Charneau, P. (2000). **The human immunodeficiency virus type-1 central DNA flap is a crucial determinant for lentiviral vector nuclear import and gene transduction of human hematopoietic stem cells.** *Blood* 96, 4103-4110.

Slamon, D. J., Clark, G. M., Wong, S. G., Levin, W. J., Ullrich, A., and McGuire, W. L. (1987). **Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene.** *Science* 235, 177-182.

Smallshaw, J. E., Georges, F., Lee, J. S., and Waygood, E. B. (1999). **Synthesis, cloning and expression of the single-chain Fv gene of the HPr-specific monoclonal antibody, Jel42. Determination of binding constants with wild-type and mutant HPrs.** *Protein engineering* 12, 623-630.

Spencer, D. M., Wandless, T. J., Schreiber, S. L., and Crabtree, G. R. (1993). **Controlling signal transduction with synthetic ligands.** *Science* 262, 1019-1024.

Springer, C. J., and Niculescu-Duvaz, I. (2000). **Prodrug-activating systems in suicide gene therapy.** *The Journal of clinical investigation* 105, 1161-1167.

Steinke, J. W., and Borish, L. (2001). **Th2 cytokines and asthma. Interleukin-4: its role in the pathogenesis of asthma, and targeting it for asthma treatment with interleukin-4 receptor antagonists.** *Respiratory research* 2, 66-70.

Stiegmaier, J., Benjamin, J., and Nagorsen, D. (2015). **Utilizing the BiTE (bispecific T-cell engager) platform for immunotherapy of cancer.** *Expert opinion on biological therapy* 15, 1093-1099.

Straathof, K. C., Pule, M. A., Yotnda, P., Dotti, G., Vanin, E. F., Brenner, M. K., Heslop, H. E., Spencer, D. M., and Rooney, C. M. (2005). **An inducible caspase 9 safety switch for T-cell therapy.** *Blood* 105, 4247-4254.

Sutherland, M. K., Yu, C., Anderson, M., Zeng, W., van Rooijen, N., Sievers, E. L., Grewal, I. S., and Law, C. L. (2010). **5-azacytidine enhances the anti-leukemic activity of lintuzumab (SGN-33) in preclinical models of acute myeloid leukemia.** *mAbs* 2, 440-448.

Szymczak, A. L., and Vignali, D. A. (2005). **Development of 2A peptide-based strategies in the design of multicistronic vectors.** *Expert opinion on biological therapy* 5, 627-638.

Szymczak, A. L., Workman, C. J., Wang, Y., Vignali, K. M., Dilioglou, S., Vanin, E. F., and Vignali, D. A. (2004). **Correction of multi-gene deficiency in vivo using a single 'self-cleaving' 2A peptide-based retroviral vector.** *Nature biotechnology* 22, 589-594.

Tamada, K., Geng, D., Sakoda, Y., Bansal, N., Srivastava, R., Li, Z., and Davila, E. (2012). **Redirecting gene-modified T cells toward various cancer types using tagged antibodies.** *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 18, 6436-6445.

Tamma, S., Huang, X., Wong, M., Milone, M. C., Ma, L., Levine, B. L., June, C. H., Wagner, J. E., Blazar, B. R., and Zhou, X. (2010). **4-1BB and CD28 signaling plays a synergistic role in redirecting umbilical cord blood T cells against B-cell malignancies.** *Human gene therapy* 21, 75-86.

Tebas, P., Stein, D., Tang, W. W., Frank, I., Wang, S. Q., Lee, G., Spratt, S. K., Surosky, R. T., Giedlin, M. A., Nichol, G., *et al.* (2014). **Gene editing of CCR5 in autologous CD4 T cells of persons infected with HIV.** *The New England journal of medicine* 370, 901-910.

Tey, S. K. (2014). **Adoptive T-cell therapy: adverse events and safety switches.** *Clinical & translational immunology* 3, e17.

Tey, S. K., Dotti, G., Rooney, C. M., Heslop, H. E., and Brenner, M. K. (2007). **Inducible caspase 9 suicide gene to improve the safety of allodepleted T cells after haploidentical stem cell transplantation.** *Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation* 13, 913-924.

Thomis, D. C., Markt, S., Bonini, C., Traversari, C., Gilman, M., Bordignon, C., and Clackson, T. (2001). **A Fas-based suicide switch in human T cells for the treatment of graft-versus-host disease.** *Blood* 97, 1249-1257.

Tiberghien, P., Ferrand, C., Lioure, B., Milpied, N., Angonin, R., Deconinck, E., Certoux, J. M., Robinet, E., Saas, P., Petracca, B., *et al.* (2001). **Administration of herpes simplex-thymidine kinase-expressing donor T cells with a T-cell-depleted allogeneic marrow graft.** *Blood* 97, 63-72.

Tiberghien, P., Reynolds, C. W., Keller, J., Spence, S., Deschaseaux, M., Certoux, J. M., Contassot, E., Murphy, W. J., Lyons, R., Chiang, Y., and *et al.* (1994). **Ganciclovir treatment of herpes simplex thymidine kinase-transduced primary T lymphocytes: an approach for specific in vivo donor T-cell depletion after bone marrow transplantation?** *Blood* 84, 1333-1341.

Trinchieri, G. (2003). **Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity.** *Nature reviews Immunology* 3, 133-146.

- Trinchieri, G., Wysocka, M., D'Andrea, A., Rengaraju, M., Aste-Amezaga, M., Kubin, M., Valiante, N. M., and Chehimi, J. (1992). **Natural killer cell stimulatory factor (NKSF) or interleukin-12 is a key regulator of immune response and inflammation.** *Progress in growth factor research* 4, 355-368.
- Trono, D. (2003). **Virology. Picking the right spot.** *Science* 300, 1670-1671.
- Tsirigotis, P., Shimoni, A., and Nagler, A. (2014). **The expanding horizon of immunotherapy in the treatment of malignant disorders: allogeneic hematopoietic stem cell transplantation and beyond.** *Annals of medicine* 46, 384-396.
- Tugues, S., Burkhard, S. H., Ohs, I., Vrohings, M., Nussbaum, K., Vom Berg, J., Kulig, P., and Becher, B. (2015). **New insights into IL-12-mediated tumor suppression.** *Cell death and differentiation* 22, 237-246.
- Urbanska, K., Lanitis, E., Poussin, M., Lynn, R. C., Gavin, B. P., Kelderman, S., Yu, J., Scholler, N., and Powell, D. J., Jr. (2012). **A universal strategy for adoptive immunotherapy of cancer through use of a novel T-cell antigen receptor.** *Cancer research* 72, 1844-1852.
- Valton, J., Guyot, V., Marechal, A., Filhol, J. M., Juillerat, A., Duclert, A., Duchateau, P., and Poirot, L. (2015). **A Multidrug-resistant Engineered CAR T Cell for Allogeneic Combination Immunotherapy.** *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 23, 1507-1518.
- Van Allen, E. M., Miao, D., Schilling, B., Shukla, S. A., Blank, C., Zimmer, L., Sucker, A., Hillen, U., Foppen, M. H., Goldinger, S. M., *et al.* (2015). **Genomic correlates of response to CTLA-4 blockade in metastatic melanoma.** *Science* 350, 207-211.
- van der Bruggen, P., Traversari, C., Chomez, P., Lurquin, C., De Plaen, E., Van den Eynde, B., Knuth, A., and Boon, T. (1991). **A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma.** *Science* 254, 1643-1647.
- van Herpen, C. M., van der Laak, J. A., de Vries, I. J., van Krieken, J. H., de Wilde, P. C., Balvers, M. G., Adema, G. J., and De Mulder, P. H. (2005). **Intratumoral recombinant human interleukin-12 administration in head and neck squamous cell carcinoma patients modifies locoregional lymph node architecture and induces natural killer cell infiltration in the primary tumor.** *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 11, 1899-1909.
- Vonderheide, R. H. (2002). **Telomerase as a universal tumor-associated antigen for cancer immunotherapy.** *Oncogene* 21, 674-679.
- Vyas, M., Koehl, U., Hallek, M., and von Strandmann, E. P. (2014). **Natural ligands and antibody-based fusion proteins: harnessing the immune system against cancer.** *Trends in molecular medicine* 20, 72-82.
- Wang, H. Y., and Wang, R. F. (2007). **Regulatory T cells and cancer.** *Current opinion in immunology* 19, 217-223.
- Wang, X., Chang, W. C., Wong, C. W., Colcher, D., Sherman, M., Ostberg, J. R., Forman, S. J., Riddell, S. R., and Jensen, M. C. (2011). **A transgene-encoded cell surface polypeptide for selection, in vivo tracking, and ablation of engineered cells.** *Blood* 118, 1255-1263.
- Wei, M. X., Tamiya, T., Chase, M., Boviatsis, E. J., Chang, T. K., Kowall, N. W., Hochberg, F. H., Waxman, D. J., Breakefield, X. O., and Chiocca, E. A. (1994). **Experimental tumor therapy in mice using the cyclophosphamide-activating cytochrome P450 2B1 gene.** *Human gene therapy* 5, 969-978.
- Weiner, L. M., Surana, R., and Wang, S. (2010). **Monoclonal antibodies: versatile platforms for cancer immunotherapy.** *Nature reviews Immunology* 10, 317-327.
- Wilke, C. M., Kryczek, I., Wei, S., Zhao, E., Wu, K., Wang, G., and Zou, W. (2011). **Th17 cells in cancer: help or hindrance?** *Carcinogenesis* 32, 643-649.
- Williams, M. A., and Bevan, M. J. (2007). **Effector and memory CTL differentiation.** *Annual review of immunology* 25, 171-192.
- Wing, K., Onishi, Y., Prieto-Martin, P., Yamaguchi, T., Miyara, M., Fehervari, Z., Nomura, T., and Sakaguchi, S. (2008). **CTLA-4 control over Foxp3+ regulatory T cell function.** *Science* 322, 271-275.
- Wu, C. Y., Roybal, K. T., Puchner, E. M., Onuffer, J., and Lim, W. A. (2015). **Remote control of therapeutic T cells through a small molecule-gated chimeric receptor.** *Science* 350, aab4077.
- Xu, X., Sun, Y. L., and Hoey, T. (1996). **Cooperative DNA binding and sequence-selective recognition conferred by the STAT amino-terminal domain.** *Science* 273, 794-797.

- Yang, Z. Z., Grote, D. M., Ziesmer, S. C., Niki, T., Hirashima, M., Novak, A. J., Witzig, T. E., and Ansell, S. M. (2012). **IL-12 upregulates TIM-3 expression and induces T cell exhaustion in patients with follicular B cell non-Hodgkin lymphoma.** *The Journal of clinical investigation* *122*, 1271-1282.
- Yeku, O. O., and Brentjens, R. J. (2016). **Armored CAR T-cells: utilizing cytokines and pro-inflammatory ligands to enhance CAR T-cell anti-tumour efficacy.** *Biochemical Society transactions* *44*, 412-418.
- Zeh, H. J., 3rd, Hurd, S., Storkus, W. J., and Lotze, M. T. (1993). **Interleukin-12 promotes the proliferation and cytolytic maturation of immune effectors: implications for the immunotherapy of cancer.** *Journal of immunotherapy with emphasis on tumor immunology : official journal of the Society for Biological Therapy* *14*, 155-161.
- Zhang, L., Conejo-Garcia, J. R., Katsaros, D., Gimotty, P. A., Massobrio, M., Regnani, G., Makrigiannakis, A., Gray, H., Schlienger, K., Liebman, M. N., *et al.* (2003). **Intratumoral T cells, recurrence, and survival in epithelial ovarian cancer.** *The New England journal of medicine* *348*, 203-213.
- Zhang, L., Kerkar, S. P., Yu, Z., Zheng, Z., Yang, S., Restifo, N. P., Rosenberg, S. A., and Morgan, R. A. (2011). **Improving adoptive T cell therapy by targeting and controlling IL-12 expression to the tumor environment.** *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* *19*, 751-759.
- Zhang, L., Morgan, R. A., Beane, J. D., Zheng, Z., Dudley, M. E., Kassim, S. H., Nahvi, A. V., Ngo, L. T., Sherry, R. M., Phan, G. Q., *et al.* (2015). **Tumor-infiltrating lymphocytes genetically engineered with an inducible gene encoding interleukin-12 for the immunotherapy of metastatic melanoma.** *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* *21*, 2278-2288.
- Zhang, S., Chen, L., Wang-Rodriguez, J., Zhang, L., Cui, B., Frankel, W., Wu, R., and Kipps, T. J. (2012). **The onco-embryonic antigen ROR1 is expressed by a variety of human cancers.** *The American journal of pathology* *181*, 1903-1910.
- Zhao, J., and Perlman, S. (2012). **Differential effects of IL-12 on Tregs and non-Treg T cells: roles of IFN-gamma, IL-2 and IL-2R.** *PloS one* *7*, e46241.
- Zhao, Y., Moon, E., Carpenito, C., Paulos, C. M., Liu, X., Brennan, A. L., Chew, A., Carroll, R. G., Scholler, J., Levine, B. L., *et al.* (2010). **Multiple injections of electroporated autologous T cells expressing a chimeric antigen receptor mediate regression of human disseminated tumor.** *Cancer research* *70*, 9053-9061.
- Zhou, X., Di Stasi, A., Tey, S. K., Krance, R. A., Martinez, C., Leung, K. S., Durett, A. G., Wu, M. F., Liu, H., Leen, A. M., *et al.* (2014). **Long-term outcome after haploidentical stem cell transplant and infusion of T cells expressing the inducible caspase 9 safety transgene.** *Blood* *123*, 3895-3905.
- Zhu, J., Yamane, H., and Paul, W. E. (2010). **Differentiation of effector CD4 T cell populations (*).** *Annual review of immunology* *28*, 445-489.
- Zufferey, R., Donello, J. E., Trono, D., and Hope, T. J. (1999). **Woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element enhances expression of transgenes delivered by retroviral vectors.** *Journal of virology* *73*, 2886-2892.
- Zufferey, R., Dull, T., Mandel, R. J., Bukovsky, A., Quiroz, D., Naldini, L., and Trono, D. (1998). **Self-inactivating lentivirus vector for safe and efficient in vivo gene delivery.** *Journal of virology* *72*, 9873-9880.
- Zundler, S., and Neurath, M. F. (2015). **Interleukin-12: Functional activities and implications for disease.** *Cytokine & growth factor reviews* *26*, 559-568.

ANNEXES

Annexe I

Article

New CD20 alternative splice variants: molecular identification and differential expression within hematological B cell malignancies

Clémentine Gamonet, **Elodie Bôle-Richard**, Aurélia Delherme, François Aubin, Eric Toussiro, Francine Garnache-Ottou, Yann Godet, Loïc Ysebaert, Olivier Tournilhac, Dartigeas Caroline, Fabrice Larosa, Eric Deconinck, Philippe Saas, Christophe Borg, Marina Deschamps and Christophe Ferrand

Experimental Hematology and Oncology, 2016

RESEARCH

Open Access



New CD20 alternative splice variants: molecular identification and differential expression within hematological B cell malignancies

Clémentine Gamonet¹, Elodie Bole-Richard¹, Aurélia Delherme¹, François Aubin², Eric Toussiro^{2,3,4}, Francine Garnache-Ottou^{1,2}, Yann Godet^{1,2}, Loïc Ysebaert⁵, Olivier Tournilhac⁶, Caroline Dartigeas⁷, Fabrice Larosa^{1,8}, Eric Deconinck^{1,2,8}, Philippe Saas^{1,2}, Christophe Borg^{1,2}, Marina Deschamps¹ and Christophe Ferrand^{1,9*}

Abstract

Background: CD20 is a B cell lineage-specific marker expressed by normal and leukemic B cells and targeted by several antibody immunotherapies. We have previously shown that the protein from a CD20 mRNA splice variant (D393-CD20) is expressed at various levels in leukemic B cells or lymphoma B cells but not in resting, sorted B cells from the peripheral blood of healthy donors.

Results: Western blot (WB) analysis of B malignancy primary samples showed additional CD20 signals. Deep molecular PCR analysis revealed four new sequences corresponding to in-frame CD20 splice variants (D657-CD20, D618-CD20, D480-CD20, and D177-CD20) matching the length of WB signals. We demonstrated that the cell spliceosome machinery can process ex vivo D480-, D657-, and D618-CD20 transcript variants by involving canonical sites associated with cryptic splice sites. Results of specific and quantitative RT-PCR assays showed that these CD20 splice variants are differentially expressed in B malignancies. Moreover, Epstein-Barr virus (EBV) transformation modified the CD20 splicing profile and mainly increased the D393-CD20 variant transcripts. Finally, investigation of three cohorts of chronic lymphocytic leukemia (CLL) patients showed that the total CD20 splice variant expression was higher in a stage B and C sample collection compared to routinely collected CLL samples or relapsed refractory stage A, B, or C CLL.

Conclusion: The involvement of these newly discovered alternative CD20 transcript variants in EBV transformation makes them interesting molecular indicators, as does their association with oncogenesis rather than non-oncogenic B cell diseases, differential expression in B cell malignancies, and correlation with CLL stage and some predictive CLL markers. This potential should be investigated in further studies.

Keywords: CD20, Alternative splicing, B malignancies, EBV transformation, CLL

*Correspondence: christophe.ferrand@efs.sante.fr

⁹ Laboratoire de Thérapeutique Immuno-Moléculaire et cellulaire des cancers, INSERM UMR1098, Etablissement Français du Sang-Bourgogne/Franche-Comté, 8, rue du Docteur Jean-François-Xavier Girod, 25020 Besançon Cedex, France

Full list of author information is available at the end of the article

Background

CD20 protein was highlighted in 1980 as a B lymphocyte-specific cell-surface antigen expressed in all stages of B cell ontogenesis except for early pro-B cells and plasma cells [1]. Despite no identified ligands, CD20 functions were investigated, and studies assigned it a role in cell differentiation [2] and calcium flux pathways [3].

The anchorage within the membrane of the 33 kDa protein makes it a good candidate as an ion channel [3], especially when organized into tetramers [4]. Moreover, the presence of two extracellular loops allows for targeting by monoclonal antibodies (MAbs) to induce B cell depletion. The most well-known MAb is rituximab (RTX), which has greatly improved treatment of B cell malignancies [5], in association or not with chemotherapy [6]. After RTX, numerous other MAbs (such as obinutuzumab and ofatumumab) were subsequently developed to improve B cell depletion but also to treat RTX resistance to or escape from treatment [7].

CD20 is encoded by a MS4A family gene located on chromosome 11. Multiple transcription initiation sites have been identified, and the translated region of this gene is located between the third (193th nucleotide) and eighth exons (216th nucleotide), resulting in a coding sequence of 894 bp distributed into six exons [8]. Moreover, alternative splicing of the CD20 gene has been highlighted, occurring in the 5' untranslated region and resulting in translation of three alternative CD20 mRNAs encoding the same protein in human B lymphocytes.

Alternative splicing remains a key process of pre-RNA maturation and allows an increase in protein translation and phenotype diversity [9]. Different patterns of splicing have been described, based on two families of regulatory proteins (constituting the spliceosome), the serine-rich (SR) and heterogeneous nuclear ribonucleoproteins (hnRNP) (for review, see [10]).

Aberrant splicing, caused by mutation in splice site sequences within cancer-related genes or in genes encoding splicing regulation proteins [11], has a dominant role in tumor establishment, progression, and response to treatment [12]. Abnormal splicing mechanisms produce numerous cancer-associated alternatively spliced variants that could promote angiogenesis, invasion, and drug resistance, conferring a more aggressive tumoral profile [13]. These alternative variants are differentially expressed in tumors [14] and thus may be used as diagnostic tools and prognostic markers [15]. Moreover, emerging treatments target new isoform proteins encoded from aberrant splicing [16] or modify splice site selection by oligonucleotide approaches to prevent abnormal splicing [17].

In oncohematology, numerous spliceosome gene mutations have been identified in chronic lymphocytic

leukemia (CLL), myelodysplastic syndromes, and lymphomas; among the most well-known of these are those involving SF3B1, U2AF1, and SRSF2 [18–20]. Alternative splicing occurring in B cells could also be modified by Epstein–Barr virus (EBV) infection in which the BMLF1 viral protein modifies STAT1 splicing after binding with the spliceosome component SRp20 [21] and thus may influence immortalization of target B cells.

We [22] and others [23] have identified novel alternative CD20 transcripts, fully matching the MS4A1 sequence, except for 501 bp (from nucleotides 111–612, starting +1 of the ATG codon) flanked by the cryptic acceptor (AS) and donor (DS) splice sites. The resulting in-frame cDNA sequence encodes a truncated CD20 protein, called D393-CD20 (previously named Δ CD20 [22]), that is missing the major part of the transmembrane and extracellular domains, including the RTX epitope. Interestingly, this protein has been observed in malignant or EBV-transformed B cells but not in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs), bone marrow-derived mast cells, or plasmocytes from healthy donors.

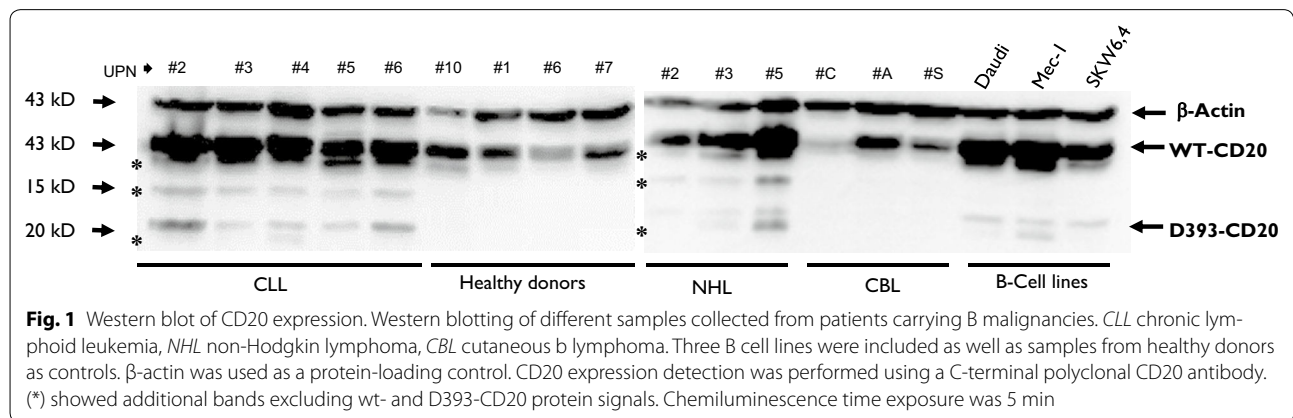
Additional investigations of D393-CD20 protein expression by western blotting on different hematologic samples have allowed us to detect extra signals that we followed up in the current work, extended to autoimmune or EBV-infected samples. Our molecular analysis has led to the description and characterization of new alternative CD20 transcripts that are differentially expressed in hematologic malignancies.

Results

Additional band signal is detected by c-terminal CD20 western blotting on blood samples collected from patients with hematologic malignancies

As expected, western blot analysis using a carboxy terminus CD20 antibody targeted to circulating PBMCs from patients with B cell hematologic malignancies (CLL and NHL), CBL, B cell lines, or healthy donors revealed immunoreactive bands at 35 kDa corresponding to the full-length CD20 protein, indicating the presence of B lymphocytes in each sample (Fig. 1). As previously described, a band at 19 kDa, encoded by the CD20 alternative transcript D393-CD20 [22], was detected on CLL (5/5) and NHL samples (3/3), as well as on leukemic B cell lines (3/3). In contrast, the three CBL (without tumoral circulating B cells, as detected by B cell clonality analysis) and the four healthy donor samples were all negative for the 19 kDa band.

We clearly detected an unexpected additional immunoreactive band at approximately 27 kDa in all CLL and NHL samples. This band was also detected on MCL samples (data not shown). Surprisingly, this band was not detected on the three B cell lines. Moreover, western



blot allowed detection of a supplementary signal at 33 and 17 kDa, respectively, close to the 35 kDa (full-length CD20 protein) or the 19 kDa (D393-CD20) bands.

Both CD20 homologous and truncated nucleotide sequences are identified in B cell lines

After RT-PCR of the full-length CD20 (fl-CD20) coding sequence, agarose gel electrophoresis allowed us to detect the expected two 894 and 393 bp PCR products corresponding respectively to the wt- and D393-CD20 cDNA sequences. None of these visible amplified DNA fragments matched in size to products that could correspond to a sequence encoding the 27 kDa or other additional signals.

All fl-CD20 PCR fragments between <894 and 100 bp in length, excluding the major 393 bp PCR product, were gel purified, TA cloned, amplified, and Sanger sequenced. Sequencing of more than 150 individual bacterial colonies allowed identification, in addition to the D393-CD20 sequence, of four new nucleotide sequences partially homologous to the wtCD20 reference nucleotide sequence published in GenBank (NM152866.2) (Additional file 1: Figures S2 and S3). The four sequences are named according to the length of the nucleotide deletion compared to the CD20 reference. Thus, D657-CD20, D618-CD20, D480-CD20, and D177-CD20 indicate deletions of 237, 276, 414, and 717 bp, respectively.

All newly identified sequences code for in-frame CD20 transcript variants resulting in MS4A1 alternative splicing

Bioedit© alignments revealed that all of the new sequences matched perfectly at the 5' and 3' regions with the conservation of start and stop codons of the wtCD20 whereas we detected a missing central area, generating a new sequence junction (Fig. 2a, b). A deeper analysis of the fusion sequences allowed highlighting of an alternative splicing phenomenon, bringing in a combination of

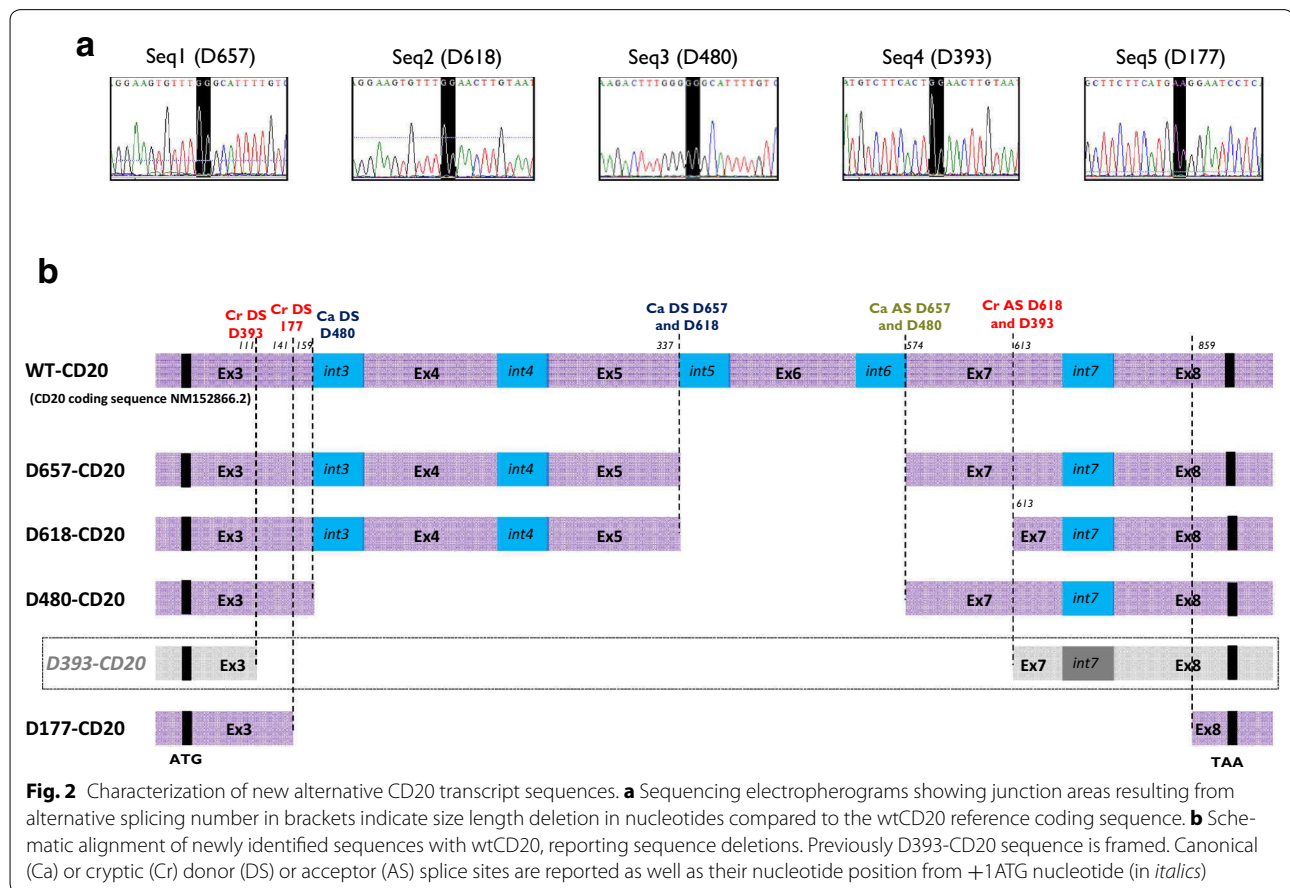
cryptic or canonical DS or AS sites. Five splicing sites corresponded to canonical and three to cryptic sites, either DS or AS. Identification of the three cryptic-DS or cryptic-AS was confirmed using the online splicing prediction tools *SplicePort Prediction* [24] and *ASSP Prediction* [25] (Fig. 2b).

Based on [26], two patterns of splicing involving both canonical DS and AS were identified as exon or multiple exon skipping for D480- and D657-CD20, respectively. One splicing pattern involving cryptic and canonical sites was qualified as an alternative 3' splice site (D618-CD20); lastly, two patterns (including the known D393-CD20) concerned alternative 5' and 3' cryptic splice sites. The characteristics of the splice variant transcripts are reported in Fig. 2b and summarized in Table 1. All sequences were in frame, and translation generated new amino acid fusion sequences (Fig. 2c).

Design of RT-PCR and RT-qPCR molecular tools allowed for specific detection and quantification of all newly identified spliced CD20 sequences

To study the presence of transcripts and their level of expression, we designed RT-PCR and RT-qPCR assays (Additional file 1: Figure S1). As shown in Fig. 3a, fl-CD20 PCR allowed amplification of all CD20 alternative transcripts from either genomic DNA or cDNA extracted or synthesized from transfected PG13 cell lines. Moreover, transcript-specific RT-PCR allowed detection specifically of the respective CD20 alternative transcripts without cross-reactivity with the others, as shown when the target used was gDNA (Fig. 3b). Interestingly, D393spe-PCR amplified cDNA synthesized from ARN extracted from wt-, D657-, D480, and D393-CD20 cell lines. Positive signals detected with D177spe-PCR from all cell lines meant that all constructs could produce the D177-CD20 transcript.

Finally, RT-qPCR assays allowed specific detection without cross-reactivity (data not shown) from one CD20



transcript variant to another. Reproducibility of all assays was assessed in seven independent experiments on four different B cell lines: Raji, Mec, Rec, and SKW6.1 (Fig. 3c). Standard deviations for values from each RT-qPCR for all four cell lines were (min–max) (0.52–0.8), (0.05–0.2), (0.1–0.52), (0.001–0.39), and (0.28–0.62), respectively, for D657-, D618-, D480-, D393-, and D177-CD20 PCR. Interestingly, we noted that B cell lines resulting from different B cell malignancies present specific CD20 splicing profiles.

Reintroduction of intron sequences within the coding CD20 sequence confirms involvement of canonical DS or AS splicing sites in D657-, D618, and D480-CD20 splice variant transcription

To confirm that canonical sites associated with cryptic splicing sites may be involved in CD20 variant transcription, as hypothesized from sequencing identification, some intron (3, 5, 6) sequences were used to generate artificial constructs carrying intron sequences within the wtCD20 coding sequence (Fig. 4a). D393- and D177-CD20 were produced by all three constructs independently of the presence of canonical sites because splicing involved only cryptic DS and AS. However, reintroduction of int5

alone in addition produced D618-CD20 transcripts. Dual reintroduction of int3 and 6 produced D480-CD20 whereas the presence of int5 and 6 allowed expression of D657- and D618-CD20 mRNA (Fig. 4b).

All of these results confirmed that the cell spliceosome machinery can process the ex vivo D480-, D657-, and D618-CD20 transcript variants by involving canonical sites associated with cryptic splice sites.

EBV transformation modifies the CD20 splicing profile and increases mainly D393-CD20 variant transcripts

Among the four B cell lines, CD20 splicing quantification showed a higher and significant increase in D393-CD20 variants in the EBV-transformed cell line SKW6.4. For this reason, the impact of EBV infection or transformation on CD20 splicing was investigated within different kinds of EBV samples.

Six EBV-transformed BLCLs were derived from the PBMCs of six healthy donors. As shown in Fig. 5a, total CD20 splicing was significantly increased in BLCL (3.4-fold, $p < 0.01$) compared to their respective PBMCs. Separate CD20 splice variant analysis revealed that increased total CD20 splices involved D657- and D618-CD20 but

Table 1 Summary of characteristics of CD20 splice variant transcripts

Transcripts	Donor site (DS)				Acceptor site (AS)				Reading frame	CDS (length) (bp)	Putative proteine		Junction sequence	
	nt ^a	Cryptic (Cr) or canonical (Ca)	Location	Seq	nt ^a	Cryptic (Cr) or canonical (Ca)	Location	Seq			AA (length)	Size (kDa)	nt	AA
D393-CD20	112	Cr	Ex3	GT	612	Cr	Ex7	AG	Yes	393	131	17–23 (15)	TTCACTG/ GAACTTG	RMSSL/ELVIA
D657-CD20	337	Ca	<i>Int5</i>	GC	573	Ca	<i>Int6</i>	AG	Yes	657	219	25	GTGTTTG/ GGCATT	SRKCL/GILSV
D618-CD20	337	Ca	<i>Int5</i>	GC	612	Cr	Ex7	AG	Yes	618	206	23	GTGTTTG/ GAACTTG	SRKCL/ELVIA
D480-CD20	160	Ca	<i>Int3</i>	GT	573	Ca	<i>Int6</i>	AG	Yes	480	160	18	TTTGGGG/ GGCATT	SKTLG/GILSV
D177-CD20	142	Cr	Ex3	GA	858	Cr	Ex8	AG	Yes	177	59	6,5	CATGAGG/ GAATCCT	SFFMR/ESSPI

^a From ATG site: ref Genebank NM 152866.2

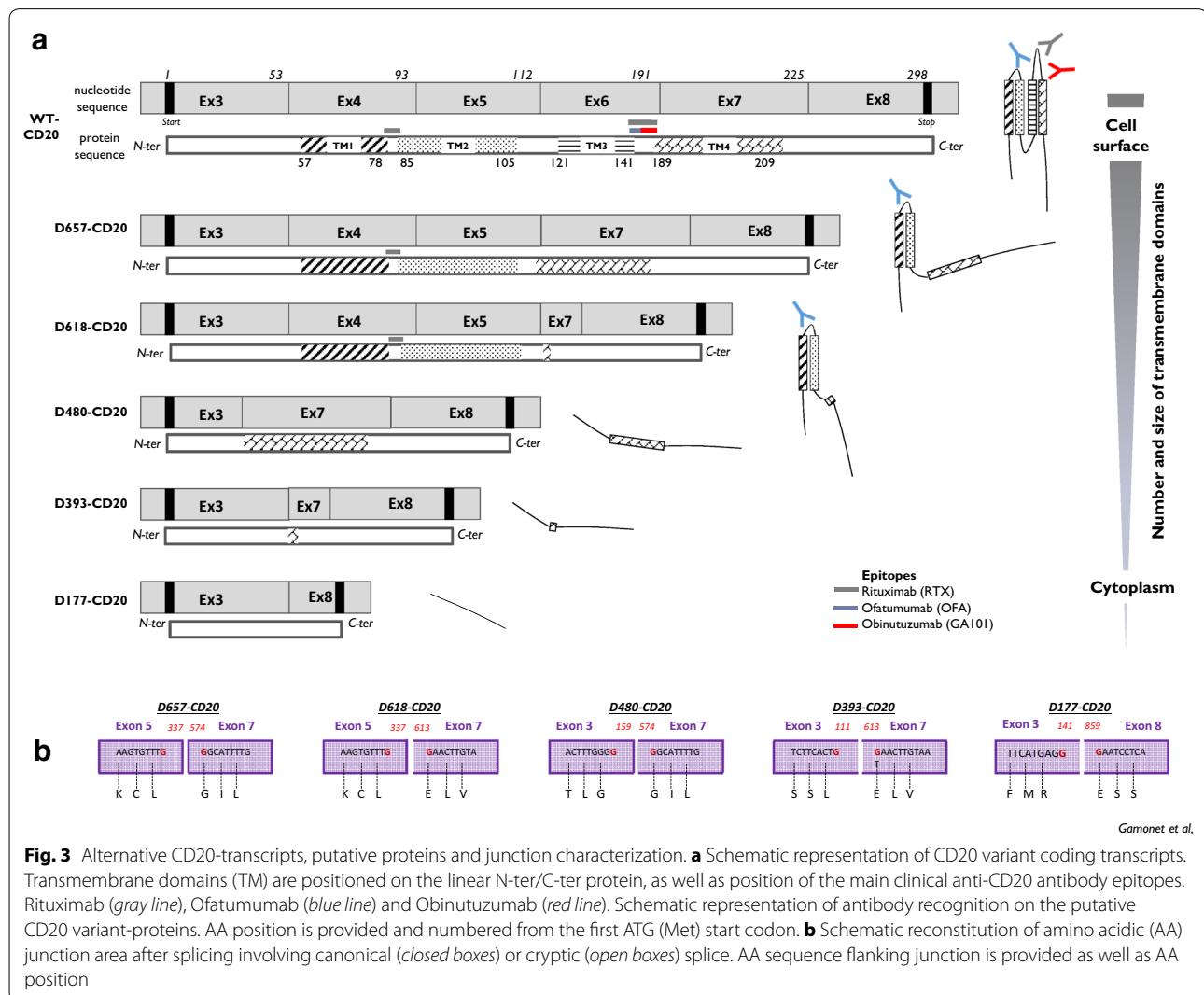


Fig. 3 Alternative CD20-transcripts, putative proteins and junction characterization. **a** Schematic representation of CD20 variant coding transcripts. Transmembrane domains (TM) are positioned on the linear N-ter/C-ter protein, as well as position of the main clinical anti-CD20 antibody epitopes. Rituximab (gray line), Ofatumumab (blue line) and Obinutuzumab (red line). Schematic representation of antibody recognition on the putative CD20 variant-proteins. AA position is provided and numbered from the first ATG (Met) start codon. **b** Schematic reconstitution of amino acid (AA) junction area after splicing involving canonical (closed boxes) or cryptic (open boxes) splice. AA sequence flanking junction is provided as well as AA position

mainly and statistically significantly D393-CD20 (110 time, $p < 0.001$). D393-CD20 represented the major part (76.5 %) of the total CD20 splice increase compared to both D657- and D618-CD20 (23.4 %).

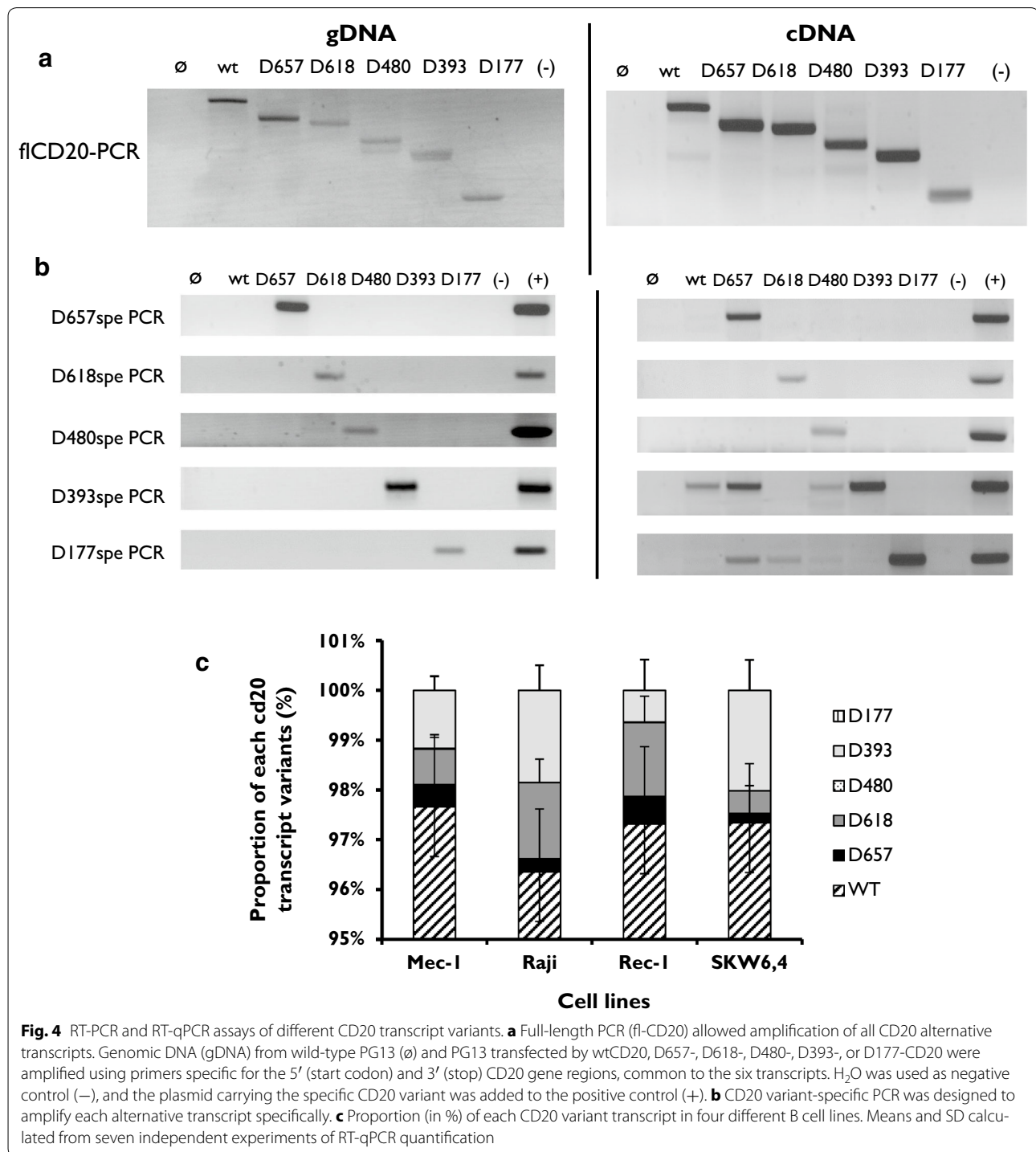
In contrast, total CD20 splicing did not vary significantly either for IMN samples compared to healthy PBMCs (Fig. 5b) or for EBV-reactivated samples after allograft (Fig. 5c), although we noted an increase in D657 and D618-CD20 splicing. Interestingly, D393-CD20 transcripts did not increase in these EBV-infected cases compared to EBV-transformed cell lines.

CD20 splice variant profile expression can discriminate B cell malignancies

Using the different CD20 variant profiles in the different B cell lines, Raji, Mec, Rec, and SKW6.1 (Fig. 3c), derived

from different hematologic diseases (respectively, CLL, Burkitt lymphoma, MCL, B lymphoblastoid), we investigated the RT-qPCR expression of the different CD20 variant transcripts in different B cell malignancies. The percentage of total alternative CD20 transcripts from all four B cell lines but also from the primary cells of FLs and DLBCLs were significantly different from healthy PBMCs ($p = 0.01$ and <0.01 respectively) (Fig. 6a).

When analyzed separately, D657 was found to be mainly involved in the increase of total CD20 splicing (81.93 %) whereas D618 and D393 represented, respectively, 7.04 and 10.66 % of the increase in FL. In contrast, in DLBCLs, the increase was due in part to D657-CD20 (43.87 %) but also to D393-CD20 (40.26 %) whereas D618 participated only at 15.72 % in the increase (Fig. 6b).



Relevance of alternative CD20 splice variant quantification within three different CLL patient cohorts

We took advantage of the availability of CLL samples from three different cohorts of patients (two collected at diagnosis and one at relapse): routinely collected CLL patient samples (50.8–49.1 % stages A–B/C respectively) for routine diagnostic analysis (CHU Toulouse, France,

$n = 70$); CD19-positive B cells purified from diagnostic stage B and C (65.5 and 34.5 %, respectively) CLL samples from elderly patients (>65 years, median 71.2) (CLL2007-SA trial [27], $n = 54$); and samples from relapsed stage A, B, or C (mainly stages B and C, 88.7 %) active-disease patients (CLL01 BOMP clinical trial, $n = 70$). Characteristics of CLL populations are given in Additional file 1:

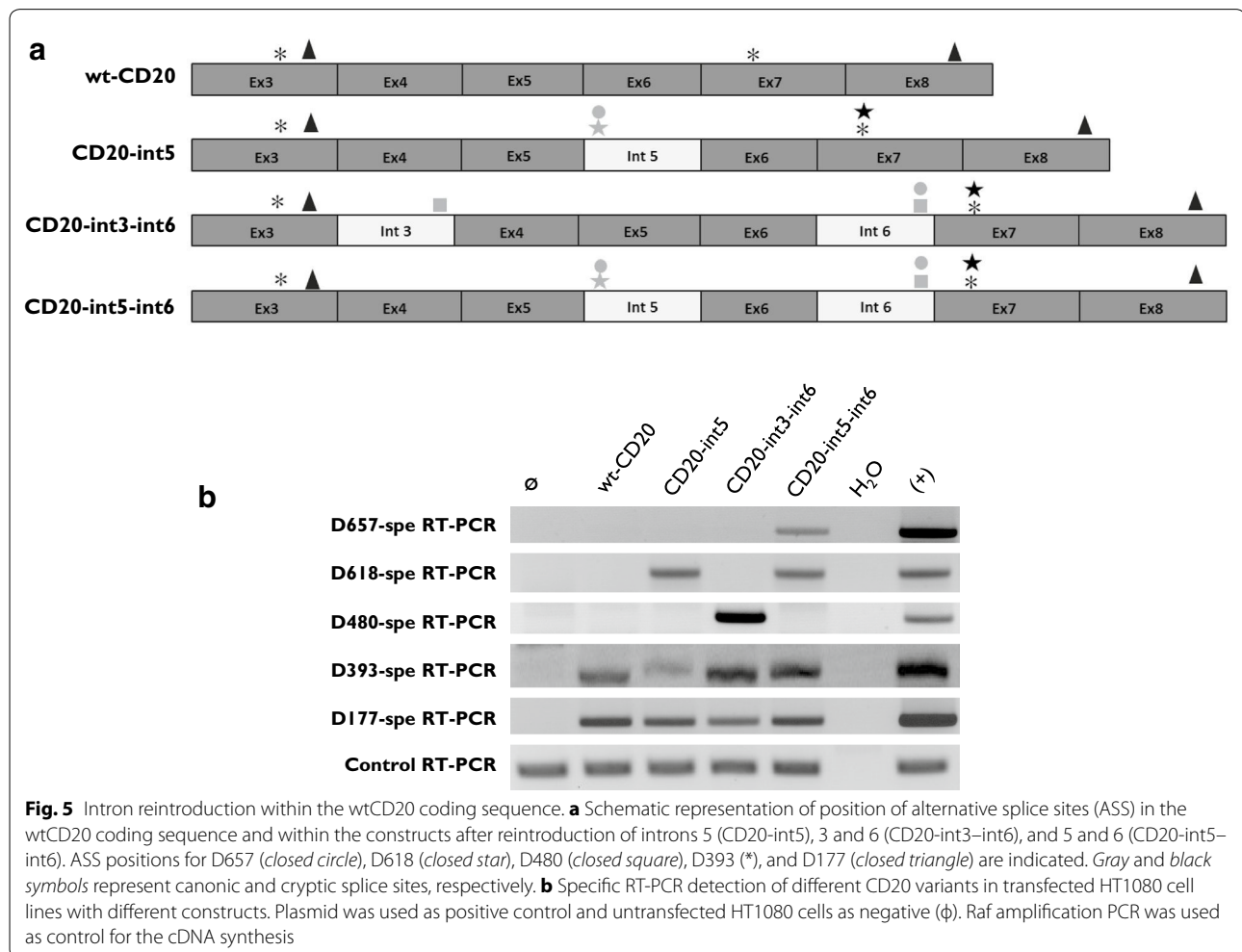


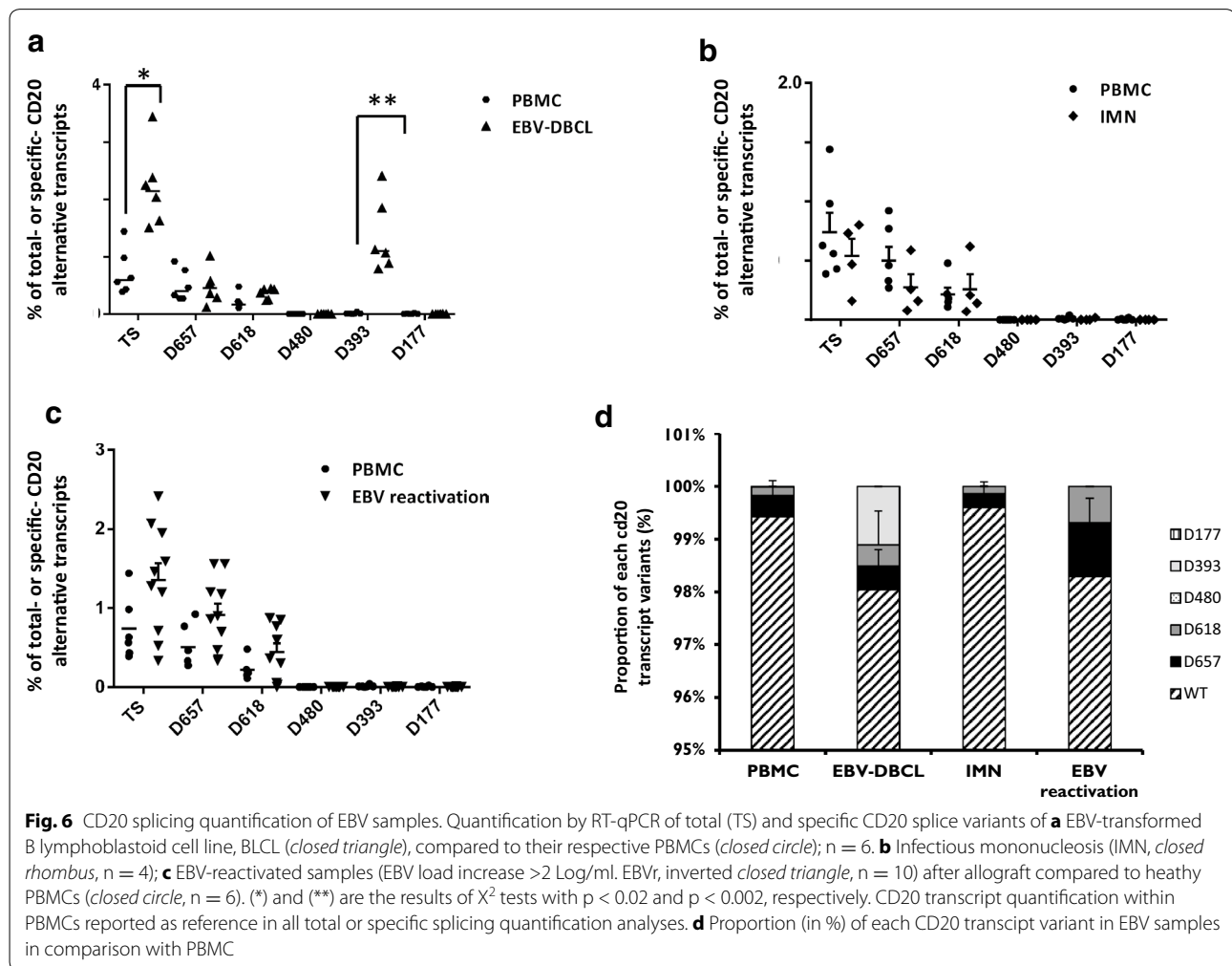
Table S2. Considering the percentage in CLL2007-SA, the median of total CD20 splicing (1.26 ± 1.23 %) was significantly higher than in routine CLL (0.65 ± 0.5 %, $p < 0.02$) or BOMP (0.76 ± 1.02 %, $p < 0.001$) (Figs. 7a, 8). The increase was mainly due to the D657- and D618-CD20 transcript variants and to a lesser degree to the D393-CD20 transcripts (Fig. 7b).

Discussion

We have previously identified a novel alternative CD20 transcript, fully matching the MS4A1 sequence, except for a 501-bp region flanked by cryptic AS and DS [1]. The resulting in-frame cDNA sequence encodes a truncated CD20 protein revealed by a C-terminal CD20 polyclonal antibody. Interestingly, this protein has been observed in malignant or EBV-transformed B cells but not in PBMCs, bone marrow-derived mast cells, or plasmocytes from healthy donors.

Detection of unexpected additional western blot signals with an anti-carboxy terminus CD20 antibody led us to

conduct a deep molecular analysis to characterize potential transcripts that could match the protein signal. Starting from nucleic acid material extracted from B cell lines or, interestingly, from primary samples of patients with B cell hematologic diseases such as CLL, MCL, or DLBCL, we identified and characterized more precisely, in addition to the D393-CD20, four additional CD20 splice variants. Two of these variants are the result of exon skipping (D657- and D480-CD20), and the other two result from the use of alternative splice sites: a canonical DS and a cryptic AS for D618-CD20 and two cryptic splice sites for D177-CD20, by previously well-described mechanisms [10]. In addition to the D393-CD20 transcript, Small et al. [23] have already detected the D618- and D657-CD20 transcripts only in lymphoblastoid B cell lines. In the current work, we detected expression of these two transcripts in primary samples of human B cell diseases and reported for the first time two novel additional D480- and D177-CD20 transcripts. We also demonstrated ex vivo the involvement of canonical sites



associated with cryptic splice sites that produce these transcripts. Although it should be formally demonstrated, except for D177, the lengths of the D393, D618-, D657-, and D480-CD20 transcripts matched the immunoreactive bands on western blot.

We designed quantitative molecular tools for studying alternative CD20 transcript expression in different B autoimmune, malignant B diseases or EBV-infected samples.

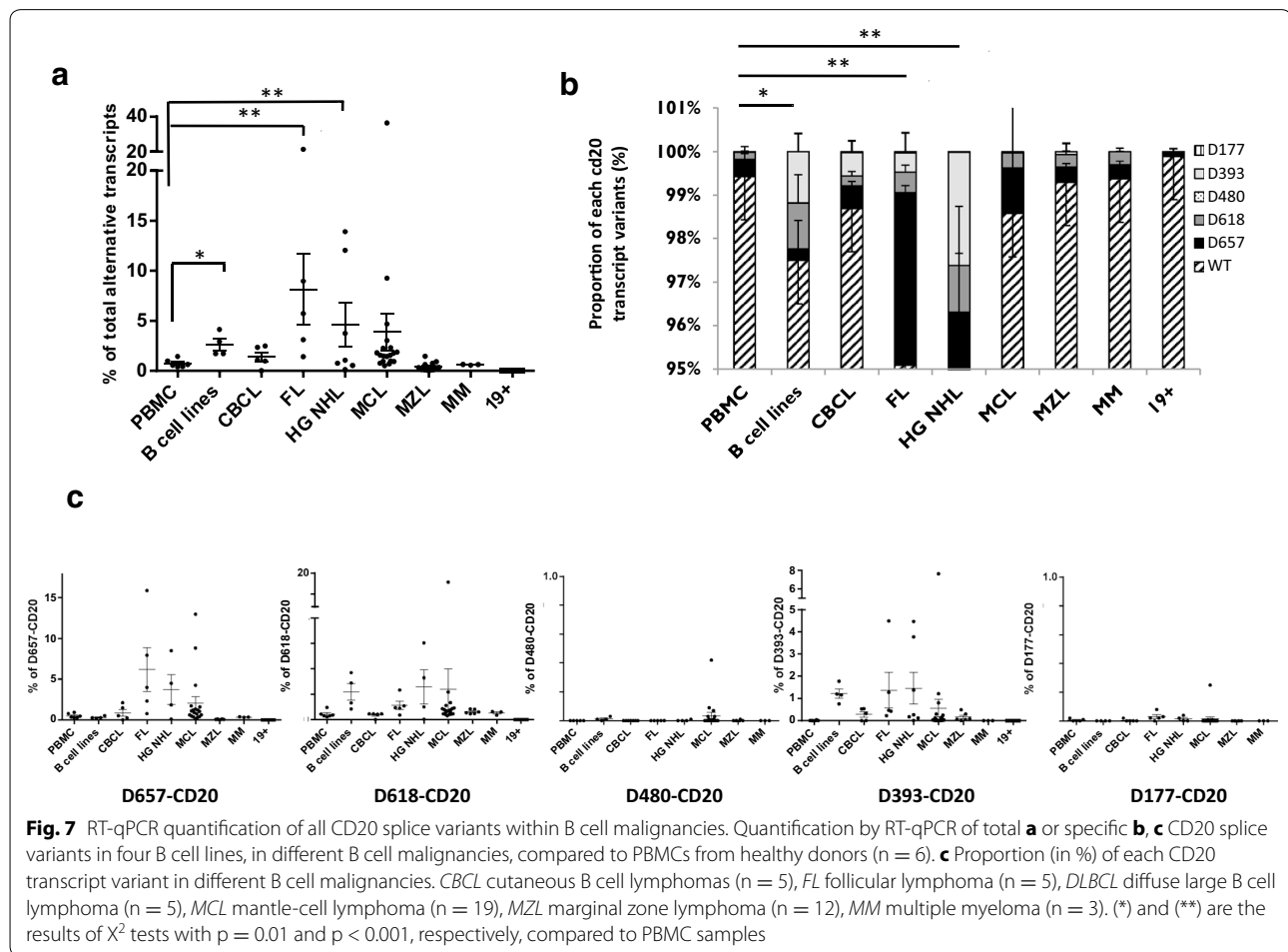
The comparison of splicing profiles revealed a more important CD20 alternative splicing in B diseases compared to healthy donors, suggesting a splicing deregulation in these pathologies.

Whereas a slight increase of CD20 alternative splicing was detected in CBCL, LZM, MM, and some CLL samples, a significantly higher amount of alternative transcripts was observed in FL, HG-NHL, and EBV-transformed B cell lines. In all cases, the increase compared to healthy donors results from a higher proportion of D618- and D657- CD20 transcripts. In addition, this

increase is associated with a D393-CD20 expression induction in lymphomas (FL, DLBCL, Burkitt and MCL) and EBV transformation. Interestingly, in autoimmune diseases (rheumatoid arthritis and pemphigus), we never detected D393-CD20 transcripts [28, 29]. These observations suggest a splicing deregulation during oncogenesis leading to D393-CD20 expression, which could be an interesting molecular marker of B malignancies.

From another side, the slight increase of D657- and D618-CD20 expression could be the result of splicing deregulation associated with an enhanced proliferation and activation [30] during cancer but also during autoimmune disease and virus infection [31].

Increase of D393-CD20 occurs mainly in post-germinal center (GC) lymphomas (FL, Burkitt, and DLBCL). In GC, BCR maturation requires activation-induced cytidine deaminase (AID) intervention to introduce mismatches, which are then repaired by a mismatch repair complex. This process is known to be responsible for genetic abnormalities involved in oncogenesis but could

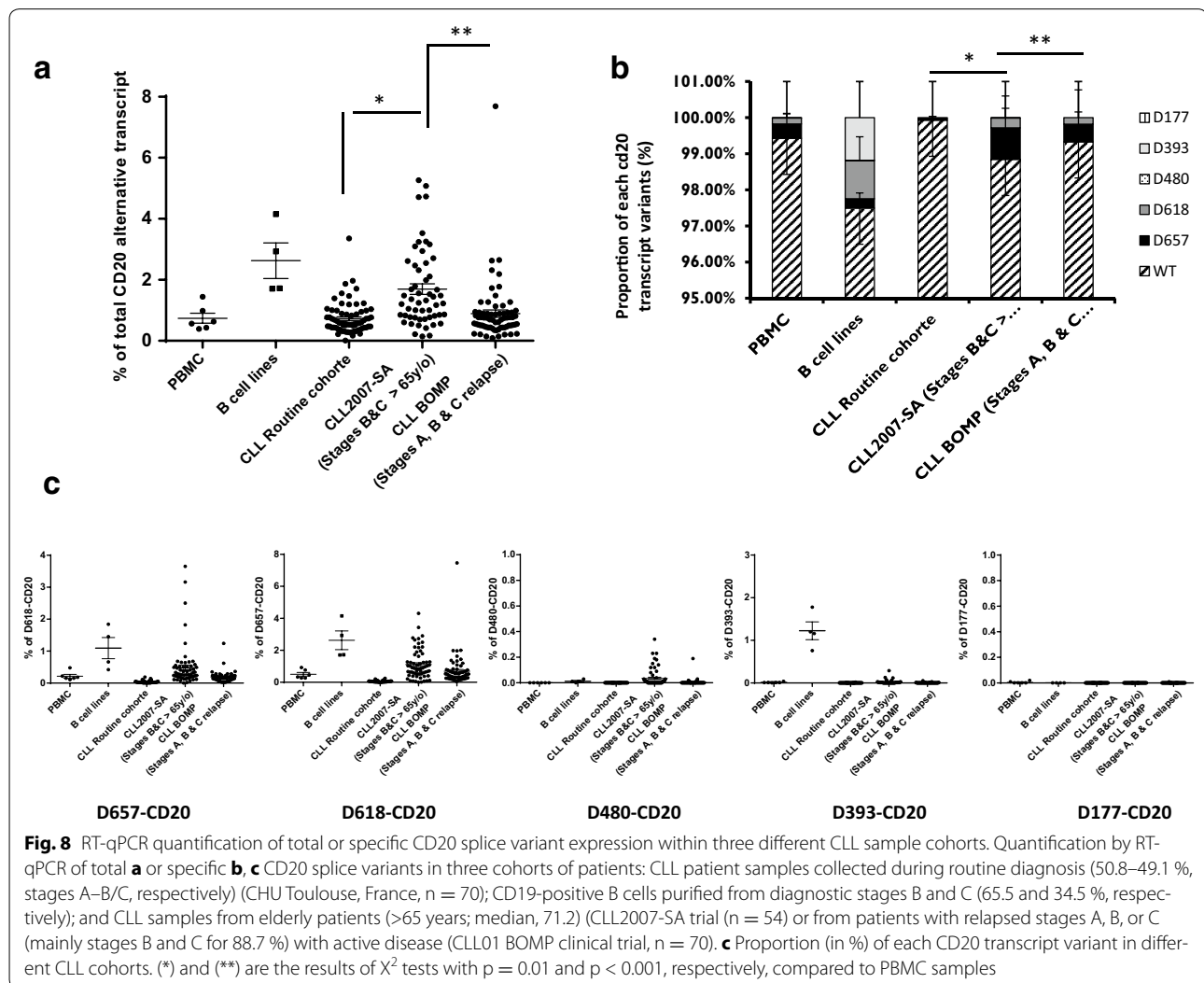


also disturb splicing. Indeed, interactions and associations have been identified between AID and splicing factor SnRNPs such as U2AF65 [32], PTB2, and SRSF2 [33]. This link may explain in part how the AID activation pathway could lead to deregulation of splicing factors that disturb CD20 splicing, thus producing alternative CD20 variant expression in post-GC lymphomas. In post GC CLL, the fact that D393-CD20 increase was not observed may be explained by a lower AID expression [34] and activation.

Splicing pattern of immortalized B cell after EBV virus infection (DBCL) revealed a significantly greater increase in total CD20 splice variants, mainly because of an expression of D393-CD20. Interestingly, CD20 splicing was not statistically increased in IMN or in reactivated EBV samples: although we noted an increase of D618- and D657-, no D393-CD20 expression was measured, contrasting with DBCL. These results suggested a CD20 splicing modulation caused by an oncogenesis process rather than viral infection itself. This strengthens the hypothesis of an association between D393-CD20 and

oncogenesis. It is known that the SM (Mta, EB2, BMLF1) EBV protein, a viral oncogenic nuclear protein bound to RNA, influences RNA stability, splicing, nuclear export, and translation. This influence facilitates virus replication and persistence in vivo [35]. SM protein is associated with three splice regulators, SF2/ASF (SRSF1), 9G8 (SRSF7), and SRp20 (SRSF3), and antagonizes SRSF3 [36]. Thus, the SM EBV protein may be an actor that regulates CD20 cellular gene expression at the level of alternative splicing.

This work shows a deregulated expression of CD20 variant transcripts in B malignancies that may be useful as a molecular marker to study splicing patterns in order to better classify malignancies, predict resolution of disease, or monitor treatment [12]. In this way, we took advantage of the availability of *sf3b1* mutational status of the BOMP relapsed CLL cohort to evaluate if there is a correlation with CD20 splicing. CLL disease is an interesting model because mutations of *sf3b1*, which encode a critical component of the splicing machinery, are associated with progression and



fludarabin-refractoriness [37]. Interestingly, we noticed that patient group with more *cd20* alternative splicing correspond to those with higher *sf3b1* mutation frequency (data not shown). These results should be confirmed with other CLL cohorts, and a potential correlation with other gold standard biomarkers of CLL should be investigated. Moreover, a significant difference of total CD20 splicing between the 2 CLL cohorts at diagnosis (routine CLL cohort vs elderly CLL2007-SA, respectively 50 and 11 % stage A) could make this marker an indicator of the stage of the disease progression, which could be useful for CLL stratification.

Alternative CD20 splicing may have consequences on CD20 protein function that may influence BCR/CD20 cell signaling and finally B cell functions. We previously described that D393-CD20 transcript encoded a truncated CD20 protein [22]. Using CD20 immunoprecipitation with an antibody targeting the extracellular domain

followed by western blot with the C-terminal CD20 specific antibody, we have already demonstrated that D393-CD20 protein is associated with wtCD20. According to the predicted sizes of other putative proteins, they could also be associated with wtCD20 since the sizes match additional bands observed on western blot (Additional file 1: Figure S4). Subcellular division of transfected cells with the D393-CD20 coding sequence revealed that the variant protein is found mainly in the membrane fraction, although the main part of the transmembrane coding sequence is missing. This result strongly suggests an association between wtCD20 and D393-CD20 protein. Finally, lipid raft isolation showed the presence of D393-CD20 and wtCD20 already within the lipid rafts. All of these observations suggest a possible involvement of proteins encoded by *cd20* alternative variants in BCR signaling or calcium flux, both putative functions of CD20 protein [38].

Another consequence of the CD20 splicing is the production of in-frame mRNA that could be translated into new proteins and could thus participate in the tumoral edition by generating neo-epitopes that could be targeted in anti-tumoral vaccine strategies [39, 40]. Concerning CD20 alternative splice variants, we have demonstrated that the 20mer D393-CD20 peptide spanning the splicing site might be targeted by the immune system, and we have shown that D393-CD20—specific CD4 Th1 clones could directly recognize malignant B cell lines and kill autologous lymphoma B cells, indicating that D393-CD20—derived epitopes are naturally processed and presented on tumor cells [41]. Additional CD20 alternative variants may also be new tumoral antigens that could be targeted by a redirected immune system, such as transgenic T cell receptors.

These observations may be useful for the development of new immunotherapies applied to patients refractory to conventional (chemotherapy) or targeted treatments (anti-CD20, Ibrutinib, iBTK).

In conclusion, the discovery of new alternative CD20 transcript variants makes them of interest as molecular indicators to investigate in further studies, particularly given the involvement of some of them in EBV transformation, their association with oncogenesis rather than non-oncogenic B diseases, their differential expression in B malignancies, and correlation with CLL stage and some predictive CLL markers. Overall, these findings need to be confirmed by larger prospective trials in order to fully validate CD20 transcript variant as molecular markers of oncogenesis.

Methods

Patients, biological samples, and cell lines

Master cell banks of human and mouse cell lines were prepared from cells from the DSMZ or ATCC cell banks. Working cell cultures were then established, and cells were cultured in RPMI 1640 or DMEM with 10 % fetal calf serum. STR profiling identification was performed regularly.

Peripheral blood samples were selected from cases of hematologic B cell disease: B-CLL, follicular lymphoma (FL), mantle cell lymphoma (MCL), diffuse large B cell lymphoma (DLBCL) and cutaneous B cell lymphoma (CBCL), multiple myeloma (MM), marginal zone lymphoma, non-Hodgkin lymphoma (NHL), or autoimmune disease (rheumatoid arthritis), as well as infectious mononucleosis (IMN). In addition, EBV-reactivated samples collected from renal, lung, or hematopoietic allografts were screened. Samples were collected from diagnostic assessment or clinical trials or from a blood bank for the healthy PBMCs.

EBV-derived B lymphoblastoid cell lines (BLCLs) were established from healthy donor PBMCs. PBMCs were transformed with EBV supernatant in X-VIVO medium with cyclosporine A at 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ for 2 days and maintained in culture for at least 10 days, until an immortalized B cell line was obtained.

CLL samples were collected from three different cohorts of patients: PBMCs collected at diagnosis for routine analysis (CHU Toulouse, France); CD19+ immunomagnetic-purified B cells (whole human blood CD19 MicroBeads, Miltenyi Biotec) from CLL patient samples, stage B and C, included within the CLL2007-SA (for elderly patients older than 65 years); and patients included in the ICLL01 BOMP clinical trial (relapsed or refractory CLL stages A, B, or C with active disease or after 1–3 previous lines including at least one line with fludarabine), both initiated by the GOELAMS/GCFLC-MW intergroup. Written informed consent was obtained according to institutional protocol and approbation of the Ethic Committee (Comité de protection des personnes: CPP-Est, France).

Western blotting

Cells were lysed in sample buffer (2 % sodium dodecyl sulfate (SDS) in 125 mM Tris HCl, pH 6.8). An equivalent protein amount, extracted from 1×10^7 to 8×10^7 cells, was separated by electrophoresis on 12 % SDS–polyacrylamide gels and transferred to Polyvinylidene difluoride (PDVF) membranes (GE Healthcare).

Blots were then blocked for 1 h in 6 % milk before incubation with specific antibodies as follows: rabbit anti-human CD20 specific to the COOH-terminal region [22] (Thermo Scientific) and rabbit anti-actin (#8457L, Cell Signaling). Blotted proteins were detected and quantified on a bioluminescence imager and BIO-1D advanced software (Vilber-Lourmat) after blots were incubated with a horseradish peroxidase–conjugated appropriate secondary antibody (Beckman Coulter).

Molecular studies: RNA isolation, reverse transcription, cloning, real-time quantification, and Sanger cycle sequencing

Total RNA was extracted using the RNeasy Total RNA Isolation kit (Qiagen, Courtaboeuf, France), following manufacturer protocols. One microgram of total RNA was used as template for cDNA synthesis performed using a high-capacity RNA to cDNA kit (Applied Biosystem, Courtaboeuf, France).

Genomic DNA was extracted using a DNeasy blood or tissue kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) or the salting out method. Briefly, cells were lysed by TES buffer supplemented by SDS 20 % and proteinase K 0.5 mg/

ml. Proteins were then precipitated in a saturated NaCl solution and centrifuged, and DNA then was precipitated using ethanol.

Qualitative RT-PCR was performed using the MyTaq DNA polymerase ready-to-use master mix (Bioline, France) and specific primers. PCR products were analyzed by agarose gel electrophoresis followed by ultraviolet detection. When useful, PCR products were gel purified, cloned within pCR[®] 2.1-TOPO[®] TA vector (Life Technologies), and Sanger forward and reverse sequenced using M13 primers. Purified sequencing products were run on an ABI-3130 DNA analyzer and analyzed using sequencing analysis v5.2 software (Applied Biosystems). Sequences were aligned against the wild-type (wt)CD20 coding sequence using the Bioedit v7.1 software.

Quantitative RT-PCR (RT-qPCR) was performed using splice variant-specific primers and bi-fluorescence probes. cDNA was amplified with TaqMan Universal Master Mix with UNG (Applied Biosystem, Courtaboeuf, France) using a standard two-step amplification program (10 s at 95° and 1 min at 60°).

CD20 variant transcript copy number was assessed by RT-qPCR against a plasmid dilution curve. All PCR samples were normalized to ABL copy number. The proportion of each CD20 transcript variant was calculated against all CD20 isoforms.

PCR conditions, sizes of PCR products, and names and sequences of primers are described in Additional file 1: Table S1. Schematic localizations of all PCR primers and bi-fluorescent probes are provided in Additional file 1: Figure S1.

Cell transfection and packaging cell line production

The wtCD20 coding sequence was first cloned into a pcDNA3.1-GFP (green fluorescent protein) mammalian expression vector. To restore canonical splice sites within the cDNA coding sequence, intron 5 (int5) was previously reintroduced into pcDNA3.1-GFP-wtCD20 to generate pcDNA3.1-GFP-int5-CD20, theoretically producing D618-CD20 transcripts. Intron 6 (int6) was then inserted into pcDNA3.1-GFP-int5-CD20 to generate pcDNA3.1-GFP-int5- and 6-CD20-expressing D657-CD20 transcripts. Finally, reintroduction of introns 3 (int3) and 6 within the wtCD20 sequence allowed expression of D480-CD20 mRNA from pcDNA3.1-GFP-int3 and the 6-CD20 vector. All of these vectors were amplified into JM105 bacteria. The HT1080 cell line was then transfected by these vectors using the Lipofectamine transfection kit (Life Technologies) to produce transiently expressing cell lines.

In addition to the D393-CD20 packaging cell line, previously produced, wtCD20, D657-CD20, and D618-CD20

coding sequences were inserted into the retroviral pBABE-GFP vector (Addgene, UK). The PG13 packaging cell line was transfected by the pBABE-GFP-wtCD20, pBABE-GFP-D657-CD20, and pBABE-GFP-D618-CD20 vectors using the Lipofectamine transfection kit (Life Technologies). Supernatants were then collected at 48, 72, and 96 h to produce HT1080-transduced cells, cultured and selected in puromycin-containing medium. The percentage of stably transduced cells was controlled by assessing GFP expression by flow cytometry.

Splice site prediction and statistical computational analysis

Splicing sites were identified using online splice site prediction tools such as SpliceProt prediction [24] (<http://www.spliceport.org>) or ASSP Prediction [25] (<http://wangcomputing.com/assp/>). Statistical analysis was performed using the X² test.

Additional file

Additional file 1: Table S1. Table of primers used for wtCD20 and transcript variant detection (RT-PCR) as well as realtime PCR quantification (RT-qPCR). Specific annealing temperature and PCR product size in bp are given for RT-PCR. ABL PCR was used for control gene expression quantification. **Table S2:** Characteristics (n, genders, Binet score, biological parameters, mutational status) of the three CLL patient cohorts. NA: not available. **Figure S1:** Schematic representation of wtCD20 and transcript variants. Qualitative PCR primers as well as quantitative primers forward (→) and reverse (←) and bi-fluorescent probes (↔) are localized up and down, respectively, on the different transcripts. **Figure S2:** wtCD20 coding sequence (NCBI-GenBank NM152866.2) given as reference as well as D393-CD20, previously described [22] shown in blue. The 4 new identified coding sequences of the CD20 alternative transcripts are also in blue. **Figure S3:** Alignment of the newly discovered sequences against the wtCD20 coding sequence using the BioEdit v7.1 software, which allowed precise identification of junction sequence regions. **Figure S4:** a/CD20 immunoprecipitation (IP) was performed using an antibody specific to an extracellular epitope of human CD20 (#302302, Biolegend) and western blot detection with the c-terminal human CD20 Rabbit Polyclonal antibody (#E2562, Thermofischer) b/Subcellular fractions (Membrane (M), Cytoplasm (C), Nucleus (N)) obtained from 293 cells transfected with a lentiviral vector pFIV-D393-CD20 or pFIV-wtCD20 were subjected to western blot analysis using c-terminal CD20 or actin (for protein loading control) antibodies. Blotted proteins were detected and quantified on a bioluminescence imager with BIO-1D advanced software (Wilber-Lourmat) after incubation of blots with a horseradish peroxidase-conjugated appropriate secondary antibody (Beckman Coulter). c/Lipid raft isolation by ultra-centrifugation on sucrose density gradient. Fractions 1 to 4 (10 % to 40 % of sucrose density) respectively harvested after centrifugation were subjected to c-terminal anti-CD20 western blotting. Actin and Flotillin-2 antibody staining was used as protein-loading and lipid-raft control, respectively.

Authors' contributions

CG executed all experiments, including cell cultures, cytometry, western blotting, and molecular biology, and wrote the original draft of the manuscript. AD performed all PCR, RT-PCR, and RT-qPCR set-up. EBR helped with cell transfection and retroviral transduction. LY, OT, CD, EVDN, FL, ED, FA, and ET provided biological samples from their respective clinical trials or clinical experience. FGO, YG, PT, PS, and CB contributed to improving the manuscript and gave final approval. CF and MD initiated and designed the study, participated in every step of the study, managed the whole project, and wrote the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Author details

¹ INSERM UMR1098, Établissement Français du Sang Bourgogne Franche Comté, Université de Franche-Comté, SFR FED4234, 25020 Besançon, France. ² EA3181 et Service de Dermatologie, Université de Franche Comté, CHU de Besançon, Besançon, France. ³ CHRU, Department of Rheumatology, Université de Franche-Comté EA 4266, INSERM CIC-1431, 25000 Besançon, France. ⁴ EA 4266, Université de Franche-Comté, Besançon, France. ⁵ Inserm U1037, Université Toulouse 3-ERL CNRS, CHU Purpan, Toulouse, France. ⁶ Hématologie Clinique, CHU Estaing, 1 Place Lucie Aubrac, 63003 Clermont-Ferrand Cedex 1, France. ⁷ Hématologie, CHU Bretonneau, Tours, France. ⁸ Hematology Department, CHU Jean Minjoz, 25020 Besançon, France. ⁹ Laboratoire de Thérapeutique Immuno-Moléculaire et cellulaire des cancers, INSERM UMR1098, Etablissement Français du Sang-Bourgogne/Franche-Comté, 8, rue du Docteur Jean-François-Xavier Girod, 25020 Besançon Cedex, France.

Acknowledgements

The authors thank Dr. Alain Coaquette (Service de virology, CHU Besançon, France) for providing post-transplant EBV samples, Dr. Bernard Royer (INSERM UMR1098) for assistance with statistical analysis, Roselyne Delepine for extracting the biological data from the CLL2007 SA clinical trial, Sarah Odrion for reading the manuscript as well as the scientific committee and clinical investigators of the French cooperative group of CLL/MW.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Received: 20 November 2015 Accepted: 13 February 2016

Published online: 01 March 2016

References

- Algino KM, Thomason RW, King DE, Montiel MM, Craig FE. CD20 (pan-B cell antigen) expression on bone marrow-derived T cells. *Am J Clin Pathol*. 1996;106(1):78–81.
- Tedder TF, Forsgren A, Boyd AW, Nadler LM, Schlossman SF. Antibodies reactive with the B1 molecule inhibit cell cycle progression but not activation of human B lymphocytes. *Eur J Immunol*. 1986;16(8):881–7.
- Li H, Ayer LM, Lytton J, Deans JP. Store-operated cation entry mediated by CD20 in membrane rafts. *J Biol Chem*. 2003;278(43):42427–34.
- Niederfellner G, Lammens A, Mundigl O, Georges GJ, Schaefer W, Schwaiger M, Franke A, Wiechmann K, Jenewein S, Slootstra JW, Timmerman P, Brannstrom A, Lindstrom F, Mossner E, Umana P, Hopfner KP, Klein C. Epitope characterization and crystal structure of GA101 provide insights into the molecular basis for type I/II distinction of CD20 antibodies. *Blood*. 2011;118(2):358–67.
- Buske C, Unterhalt M, Hiddeman W. Therapy of follicular lymphoma. *Der Internist*. 2007;48(4):372–81.
- Coiffier B, Lepage E, Briere J, Herbrecht R, Tilly H, Bouabdallah R, Morel P, Van Den Neste E, Salles G, Gaulard P, Reyes F, Lederlin P, Gisselbrecht C. CHOP chemotherapy plus rituximab compared with CHOP alone in elderly patients with diffuse large-B-cell lymphoma. *N Engl J Med*. 2002;346(4):235–42.
- Czuczman MS, Olejniczak S, Gowda A, Kotowski A, Binder A, Kaur H, Knight J, Starostik P, Deans J, Hernandez-Ilizaliturri FJ. Acquisition of rituximab resistance in lymphoma cell lines is associated with both global CD20 gene and protein down-regulation regulated at the pretranscriptional and posttranscriptional levels. *Clin Cancer Res*. 2008;14(5):1561–70.
- Tedder TF, Klejman S, Schlossman SF, Saito H. Structure of the gene encoding the human B lymphocyte differentiation antigen CD20 (B1). *J Immunol*. 1989;142(7):2560–8.
- Pan Q, Shai O, Lee LJ, Frey BJ, Blencowe BJ. Deep surveying of alternative splicing complexity in the human transcriptome by high-throughput sequencing. *Nat Genet*. 2008;40(12):1413–5.
- Matera AG, Wang Z. A day in the life of the spliceosome. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2014;15(2):108–21.
- Kar SA, Jankowska A, Makishima H, Visconte V, Jerez A, Sugimoto Y, Muramatsu H, Traina F, Afable M, Guinta K, Tiu RV, Przychodzen B, Sakaguchi H, Kojima S, Sekeres MA, List AF, McDevitt MA, Maciejewski JP. Spliceosomal gene mutations are frequent events in the diverse mutational spectrum of chronic myelomonocytic leukemia but largely absent in juvenile myelomonocytic leukemia. *Haematologica*. 2013;98(1):107–13.
- Pajares MJ, Ezponda T, Catena R, Calvo A, Pio R, Montuenga LM. Alternative splicing: an emerging topic in molecular and clinical oncology. *Lancet Oncol*. 2007;8(4):349–57.
- Bonomi S, Gallo S, Catillo M, Pignataro D, Biamonti G, Ghigna C. Oncogenic alternative splicing switches: role in cancer progression and prospects for therapy. *Int J Cell Biol*. 2013;2013:962038.
- Kirschbaum-Slager N, Lopes GM, Galante PA, Riggins GJ, de Souza SJ. Splicing factors are differentially expressed in tumors. *Genet Mol Res*. 2004;3(4):512–20.
- Brinkman BM. Splice variants as cancer biomarkers. *Clin Biochem*. 2004;37(7):584–94.
- Mercatante DR, Mohler JL, Kole R. Cellular response to an antisense-mediated shift of Bcl-x pre-mRNA splicing and antineoplastic agents. *J Biol Chem*. 2002;277(51):49374–82.
- Villemaire J, Dion I, Elela SA, Chabot B. Reprogramming alternative pre-messenger RNA splicing through the use of protein-binding antisense oligonucleotides. *J Biol Chem*. 2003;278(50):50031–9.
- Wan Y, Wu CJ. SF3B1 mutations in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2013;121(23):4627–34.
- Makishima H, Visconte V, Sakaguchi H, Jankowska AM, AbuKar S, Jerez A, Przychodzen B, Bupathi M, Guinta K, Afable MG, Sekeres MA, Padgett RA, Tiu RV, Maciejewski JP. Mutations in the spliceosome machinery, a novel and ubiquitous pathway in leukemogenesis. *Blood*. 2012;119(14):3203–10.
- Li Z, Pan L, Cesarman E, Knowles DM. Alterations of mRNA splicing in primary effusion lymphomas. *Leuk Lymphoma*. 2003;44(5):833–40.
- Verma D, Bais S, Gaillard M, Swaminathan S. Epstein-Barr virus SM protein utilizes cellular splicing factor SRp20 to mediate alternative splicing. *J Virol*. 2010;84(22):11781–9.
- Henry C, Deschamps M, Rohrlisch PS, Pallandre JR, Remy-Martin JP, Calanan M, Traverse-Glehen A, Grandclement C, Garnache-Ottou F, Gressin R, Deconinck E, Salles G, Robinet E, Tiberghien P, Borg C, Ferrand C. Identification of an alternative CD20 transcript variant in B cell malignancies coding for a novel protein associated to rituximab resistance. *Blood*. 2010;115(12):2420–9.
- Small GW, McLeod HL, Richards KL. Analysis of innate and acquired resistance to anti-CD20 antibodies in malignant and nonmalignant B cells. *PeerJ*. 2013;1:e31.
- Dogan RI, Getoor L, Wilbur WJ, Mount SM. SplicePort—an interactive splice-site analysis tool. *Nucleic Acids Res*. 2007;35(Web Server issue):W285–91.
- Wang M, Marin A. Characterization and prediction of alternative splice sites. *Gene*. 2006;366(2):219–27.
- Maciejewski JP, Padgett RA. Defects in spliceosomal machinery: a new pathway of leukaemogenesis. *Br J Haematol*. 2012;158(2):165–73.
- Dartigeas C, Van Den Neste E, Berthou C, Maisonneuve H, Lepretre S, Dilhuydy MS, Bene MC, Nguyen-Khac F, Letestu R, Cymbalista F, De Guibert S, Aurran T, Laribi K, Vilque JP, Tournilhac O, Delmer A, Feugier P, Cazin B, Michallet AS, Levy V, Troussard X, Delepine R, Tavernier E, Colombat P, Leblond V. Evaluating abbreviated induction with fludarabine, cyclophosphamide, and dose-dense rituximab in elderly patients with chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma*. 2015;28:1–7.
- Gamonet C, Deschamps M, Marion S, Herbein G, Chiochia G, Auger I, Saas P, Ferrand C, Toussiot E. The alternative CD20 transcript variant is not a surrogate marker for resistance to rituximab in patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatology*. 2015;54(9):1744–5.
- Gamonet C, Ferrand C, Colliou N, Musette P, Joly P, Girardin M, Humbert P, Aubin F. Lack of expression of an alternative CD20 transcript variant in circulating B cells from patients with pemphigus. *Exp Dermatol*. 2014;23(1):66–7.
- Grigoryev YA, Kurian SM, Nakorchevskiy AA, Burke JP, Campbell D, Head SR, Deng J, Kantor AB, Yates JR 3rd, Salomon DR. Genome-wide analysis of immune activation in human T and B cells reveals distinct classes of alternatively spliced genes. *PLoS One*. 2009;4(11):e7906.
- Moiani A, Paleari Y, Sartori D, Mezzadra R, Miccio A, Cattoglio C, Cocchiarella F, Lidonnici MR, Ferrari G, Mavilio F. Lentiviral vector integration in the human genome induces alternative splicing and generates aberrant transcripts. *J Clin Invest*. 2012;122(5):1653–66.

32. Hu Y, Ericsson I, Doseeth B, Liabakk NB, Krokan HE, Kavli B. Activation-induced cytidine deaminase (AID) is localized to subnuclear domains enriched in splicing factors. *Exp Cell Res*. 2014;322(1):178–92.
33. Kvissel AK, Orstavik S, Eikvar S, Brede G, Jahnsen T, Collas P, Akusjarvi G, Skalhegg BS. Involvement of the catalytic subunit of protein kinase A and of HA95 in pre-mRNA splicing. *Exp Cell Res*. 2007;313(13):2795–809.
34. Pasqualucci L, Guglielmino R, Houldsworth J, Mohr J, Aoufouchi S, Polakiewicz R, Chaganti RS, Dalla-Favera R. Expression of the AID protein in normal and neoplastic B cells. *Blood*. 2004;104(10):3318–25.
35. Verma D, Swaminathan S. Epstein-Barr virus SM protein functions as an alternative splicing factor. *J Virol*. 2008;82(14):7180–8.
36. Juillard F, Bazot Q, Mure F, Tafforeau L, Macri C, Rabourdin-Combe C, Lotteau V, Manet E, Gruffat H. Epstein-Barr virus protein EB2 stimulates cytoplasmic mRNA accumulation by counteracting the deleterious effects of SRp20 on viral mRNAs. *Nucleic Acids Res*. 2012;40(14):6834–49.
37. Rossi D, Bruscazzin A, Spina V, Rasi S, Khiabani H, Messina M, Fangazio M, Vaisitti T, Monti S, Chiaretti S, Guarini A, Del Giudice I, Cerri M, Cresta S, Deambroggi C, Gargiulo E, Gattei V, Forconi F, Bertoni F, Deaglio S, Rabadan R, Pasqualucci L, Foa R, Dalla-Favera R, Gaidano G. Mutations of the SF3B1 splicing factor in chronic lymphocytic leukemia: association with progression and fludarabine-refractoriness. *Blood*. 2011;118(26):6904–8.
38. Walshe CA, Beers SA, French RR, Chan CH, Johnson PW, Packham GK, Glennie MJ, Cragg MS. Induction of cytosolic calcium flux by CD20 is dependent upon B Cell antigen receptor signaling. *J Biol Chem*. 2008;283(25):16971–84.
39. Nakatsugawa M, Hirohashi Y, Torigoe T, Asanuma H, Takahashi A, Inoda S, Kiriya K, Nakazawa E, Harada K, Takasu H, Tamura Y, Kamiguchi K, Shijubo N, Honda R, Nomura N, Hasegawa T, Takahashi H, Sato N. Novel spliced form of a lens protein as a novel lung cancer antigen, Lentsin splicing variant 4. *Cancer Sci*. 2009;100(8):1485–93.
40. Idenoue S, Hirohashi Y, Torigoe T, Sato Y, Tamura Y, Hariu H, Yamamoto M, Kurotaki T, Tsuruma T, Asanuma H, Kanaseki T, Ikeda H, Kashiwagi K, Okazaki M, Sasaki K, Sato T, Ohmura T, Hata F, Yamaguchi K, Hirata K, Sato N. A potent immunogenic general cancer vaccine that targets survivin, an inhibitor of apoptosis proteins. *Clin Cancer Res*. 2005;11(4):1474–82.
41. Vauchy C, Gamonet C, Ferrand C, Daguindau E, Galaine J, Beziaud L, Chauchet A, HenryDunand CJ, Deschamps M, Rohrlisch PS, Borg C, Adotevi O, Godet Y. CD20 alternative splicing isoform generates immunogenic CD4 helper T epitopes. *Int J Cancer J Int du Cancer*. 2015;137(1):116–26.

Submit your next manuscript to BioMed Central
and we will help you at every step:

- We accept pre-submission inquiries
- Our selector tool helps you to find the most relevant journal
- We provide round the clock customer support
- Convenient online submission
- Thorough peer review
- Inclusion in PubMed and all major indexing services
- Maximum visibility for your research

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



Annexe II

Article

Prevention of hepatitis C virus infection by adoptive allogeneic immunotherapy using suicide gene-modified lymphocytes: an in vitro proof-of-concept

Céline Leboeuf, J Roser-Schilder, Mélanie Lambotin, Sarah Durand, Tao Wu, Catherine Fauvelle, Bin Su, **Elodie Bôle-Richard**, Marina Deschamps, Christophe Ferrand, Pierre Tiberghien, Patrick Pessaux, Thomas F Baumert and Eric Robinet

Gene Therapy, 2015

ORIGINAL ARTICLE

Prevention of hepatitis C virus infection by adoptive allogeneic immunotherapy using suicide gene-modified lymphocytes: an *in vitro* proof-of-concept

C Leboeuf^{1,2,9}, J Roser-Schilder^{1,2}, M Lambotin^{1,2}, S Durand^{1,2}, T Wu^{1,2,3}, C Fauvelle^{1,2}, B Su^{1,2}, E Bôle-Richard^{4,5,6}, M Deschamps^{4,5,6}, C Ferrand^{4,5,6}, P Tiberghien^{4,5,6}, P Pessaux^{1,2,7,8}, TF Baumert^{1,2,7} and E Robinet^{1,2,8}

Hepatitis C virus (HCV)-induced, end-stage liver disease is a major indication for liver transplantation, but systematic graft reinfection accelerates liver disease recurrence. Transplantation recipients may be ineligible for direct-acting antivirals, owing to toxicity, resistance or advanced liver disease. Adoptive immunotherapy with liver graft-derived, *ex vivo*-activated lymphocytes was previously shown to prevent HCV-induced graft reinfections. Alternatively, the applicability and therapeutic efficacy of adoptive immunotherapy may be enhanced by 'ready for use' suicide gene-modified lymphocytes from healthy blood donors; moreover, conditional, prodrug-induced cell suicide may prevent potential side effects. Here, we demonstrate that allogeneic suicide gene-modified lymphocytes (SGMLs) could potently, dose- and time-dependently, inhibit viral replication. The effect occurs at effector: target cell ratios that exhibits no concomitant cytotoxicity toward virus-infected target cells. The effect, mediated mostly by CD56+ lymphocytes, is interleukin-2-dependent, IFN- γ -mediated and, importantly, resistant to calcineurin inhibitors. Thus, post-transplant immunosuppression may not interfere with this adoptive cell immunotherapy approach. Furthermore, these cells are indeed amenable to conditional cell suicide; in particular, the inducible caspase 9 suicide gene is superior to the herpes simplex virus thymidine kinase suicide gene. Our data provide *in vitro* proof-of-concept that allogeneic, third-party, SGMLs may prevent HCV-induced liver graft reinfection.

Gene Therapy advance online publication, 13 November 2014; doi:10.1038/gt.2014.99

INTRODUCTION

Chronic hepatitis C virus (HCV) infections are a major public health problem, due to the high prevalence (3% of global population; that is, 170 million people worldwide)¹ and the severity of HCV-related complications, including liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. HCV-induced end-stage liver disease is a major indication for liver transplantation (LT).² However, LT is associated with accelerated recurrence of liver disease due to systematic graft reinfections.³ Currently there is no preventive vaccine for HCV infection. The available treatments, which combine ribavirin and pegylated Interferon- α , are limited by major secondary effects, low effectiveness (50% treatment failure) and high costs.⁴ New treatments for HCV infections are currently under development. Many comprise different combinations of direct-acting antiviral drugs, like a protease and a polymerase inhibitor, which target several viral proteins essential for HCV replication and maturation. Those therapies were tested in treatment-naïve and treatment-experienced patients, with preliminary results, suggesting good efficacy with limited treatment durations. Patients with HCV infection have been reported to be efficiently treated with interferon-free sofosbuvir-based regimens both before⁵ and after⁶ LT, with high rates of sustained virological responses, little resistance development, absence of drug–drug

interactions and virtually no toxicity. Despite these promising results, novel directly antiviral drugs will not prevent recurrent hepatitis C in all patients with LT and a fraction of patients that await LT may be still ineligible for these new compounds, owing to toxicity, resistance or advanced liver disease. Moreover, drug interactions with calcineurin inhibitors still limit their use in patients with LTs,⁷ for whom no authorization for temporary use has been delivered. Thus, new approaches remain mandatory to provide a therapeutic option for preventing HCV reinfection of the liver graft, at least for specific subgroups of patients.

A phase I study conducted by Ohira *et al.*⁸ that included seven patients with HCV infections showed that an injection of activated lymphocytes reduced the HCV viral load after LT. Before transplantation, lymphocytes from the liver graft were recovered by perfusion of the graft; then, they were *ex vivo* activated for 3 days, and re-injected into the patient. A decrease in viral load was observed in five patients, and two of those five exhibited undetectable HCV levels; of the latter two, one relapsed, but the other continued to exhibit persistently HCV-negative serum, which strongly suggested that the chronic infection had healed. The decrease in viral load was more pronounced and persistent when the pre-transplant viral load was low; this finding suggested that the therapeutic effect was limited by reinfection of the graft.

¹Inserm, UMR 1110, Strasbourg, France; ²Université de Strasbourg, Strasbourg, France; ³Department of Hepatobiliary and Pancreatic Surgery, Second Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming, People's Republic of China; ⁴Etablissement Français du Sang Bourgogne/Franche-Comté, UMR 1098, Besançon, France; ⁵Inserm, UMR 1098, Besançon, France; ⁶Université de Franche-Comté, UMR 1098, Besançon, France; ⁷Pôle Hépatodigestif, Nouvel Hôpital Civil, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Strasbourg, France and ⁸Institut Hospitalo-Universitaire de Strasbourg, Strasbourg, France. Correspondence: Dr E Robinet, IHU Strasbourg, Institut Hospitalo-Universitaire de Strasbourg, 1 place de l'Hôpital, Strasbourg cedex 67091, France.

E-mail: eric.robinet@ihu-strasbourg.eu

⁹Present address: Transplantation & Clinical Virology, Department Biomedicine, University of Basel, Switzerland.

Received 2 March 2014; revised 6 August 2014; accepted 30 September 2014

Indeed, when activated lymphocytes were injected into the patient 3 days after transplantation, the graft had already been reinfected.

Consequently, we reasoned that a cell infusion given at the time of transplantation might be more efficient than an infusion performed 3 days after transplantation. This approach would require injecting lymphocytes that had been activated prior to the transplantation. To that end, we propose to produce a bank of 'ready for use' activated lymphocytes from healthy donors that express a suicide gene. With this readily available store, at the time a patient receives a transplant, a batch of suicide gene-modified lymphocytes (SGMLs) could be chosen from the bank and administered immediately, without wasting the time required for SGML production and qualification. However, there is a risk that allogeneic SGMLs might exert alloreactivity toward the patient's cells or the liver graft, which could lead to severe side effects like graft-versus-host disease (GvHD) or liver graft rejection, respectively. To avoid these side effects, a suicide gene could be introduced into the lymphocytes prior to injection. Then, when side effects were detected, the SGMLs could be specifically eliminated by administering a prodrug that targets the suicide gene. These SGMLs are currently being tested as a gene therapy product in a phase III clinical study of patients who received haplo-identical allogeneic hematopoietic stem cell (HSC) transplantation. The SGMLs were successfully and safely infused into dozens of patients without major side effects.^{9–12} Currently, those patients have undergone up to 15 years follow-up^{12–14} (for review, see¹⁵).

In this study, we investigated whether allogeneic SGMLs generated from healthy donors could provide a potent antiviral effect toward HCV-infected cells, as an *in vitro* proof-of-concept that such immunotherapy could be considered in patients with HCV infections that received a LT. Our findings provide perspective on the clinical use of SGMLs for preventing HCV reinfection of a liver graft.

RESULTS

Suicide gene-modified cells inhibit *in vitro* HCV replication

With an HCV replicon-infected cell model, we first evaluated the antiviral activity of SGMLs. The SGMLs were generated after CD3 activation or CD3/CD28 costimulation to induce low and high alloreactivity, respectively.^{16,17} Both SGML preparations produced a similar dose-dependent reduction in HCV replication; they achieved an ~3-log reduction in HCV replication at an effector:target cell ratio of 2:1 (Figure 1a). We confirmed this antiviral effect in a more relevant cell culture model system, where Huh7.5.1 cells were infected with the infectious cell culture produced-HCV (HCVcc) Jc1 strain (Supplementary Figure S1a). In both cell models, the antiviral effect was observed without significant SGML-mediated cytotoxicity toward the target cells (Figure 1b, Supplementary Figure S1b). Previous studies that evaluated various GvHD models¹⁷ found that SGMLs produced after CD3/CD28 costimulation were more aggressive *in vivo* than SGMLs produced after CD3 activation. Therefore, we used only the latter product for subsequent experiments.

The gene transfer process did not affect the antiviral activity of *ex vivo*-expanded lymphocytes; a similar result was obtained when SGMLs were compared with non-transduced expanded control cells (referred to as Co cells) in both the HCV replicon model (Figure 1c) and the HCVcc model (Figure 1d). Again, the antiviral effect was not associated with cytotoxic activity against target cells (Supplementary Figures S1c, d). In accordance with their known interleukin-2 (IL-2) dependence, the antiviral activity of SGMLs was more potent in the presence than in the absence of exogenous IL-2 (Figure 1c and d). Therefore, subsequent *in vitro* experiments were performed in the presence of 500 IU ml⁻¹ IL-2.

The magnitude of inhibition of HCV RNA replication was lower in the HCVcc model than in the replicon model, raising the question of whether this was due to different efficiencies in transfection vs infection or because the HCVcc model constitutes the complete replication cycle of the virus rather than just subgenomic RNA replication. The percentage of transfected vs infected cells in Huh7.5.1 cells, quantified by flow cytometry after staining of the HCV core protein, was similar in both models at D1 of culture, but remained constant at D2 and D3 in the replicon model, whereas it continuously increased in the HCVcc model and was finally higher than in the replicon model (Supplementary Figure S2). These results suggest that such a higher percentage of infected cells may account, at least in part, for a less efficient inhibition of RNA replication by SGMLs.

In the HCVcc model, the antiviral effect of SGMLs was more pronounced when the coculture was initiated on the day of HCV inoculation compared with cocultures initiated 1–3 days later (Figure 1e). This result supported our hypothesis that SGMLs would be more efficient at preventing liver graft reinfection in an administration at the time of LT compared with an administration 3 days later. Cryopreservation did not affect the antiviral activity of SGMLs, as shown by the similar antiviral activity observed between fresh and frozen cells (Figure 1f). This result demonstrated that cryopreserved cells may be adequate for clinical use.

Phenotypical and functional characterization of SGMLs involved in antiviral activity

Although the low effector:target cell ratio facilitated a lack of significant SGML-mediated cytotoxicity against target cells, we could not exclude the possibility that only a few target cells were electroporated in the HCV replicon model or infected in the HCVcc infection model; the specific killing of only a few cells would not be detected in our cytotoxicity assay. Therefore, to exclude direct cell killing, antiviral assays in the HCV replicon system were performed in a transwell configuration, where effector and target cells were cultured in separate chambers, but soluble factors could diffuse between the chambers. Again, SGMLs exhibited strong, IL-2-dependent antiviral activity (Figure 2a). This result indicated that effector-target cell contact was not required for inhibiting HCV replication, and the antiviral effect was not dependent upon receptor-mediated cytotoxicity. These results suggested that the antiviral activity was mediated, at least in part, by soluble factors.

The addition of anti-IFN- γ monoclonal antibodies (mAbs), but not anti-IFN- α or anti-IFN- β mAbs, blocked the antiviral effect of SGMLs on HCV replication. The results were similar in a transwell assay (Figure 2b), in a coculture assay (Supplementary Figure S3a) and in the HCVcc system (Supplementary Figure S3b). The combination of anti-IFN- α , - β and - γ mAbs did not further block the antiviral activity (data not shown).

Most SGMLs are CD3+ CD56- T cells; the remaining cells are CD3+ CD56+ 'NK-like' T cells and CD3- CD56+ NK cells (Figure 2c and Saucé *et al.*¹⁶). To decipher which of these cells were involved in the antiviral activity of SGMLs, CD56+ and CD56- cells were purified by immunomagnetic sorting. We found that both fractions contributed to the antiviral activity, although CD56- cells had a slightly lower antiviral activity than CD56+ cells. The results were similar in the HCV replicon (Figure 2d) and the HCVcc systems (Supplementary Figure S3c), and again, no cytotoxic activity was detected against target cells (Supplementary Figures S3d, e).

The antiviral activity of SGMLs is not inhibited by calcineurin inhibitors

One potential limitation of our approach was the potential for allo-immunization. Indeed, the patient could develop an immune response against SGMLs, and that would result in SGML elimination. This effect would be undesirable for two reasons: (1)

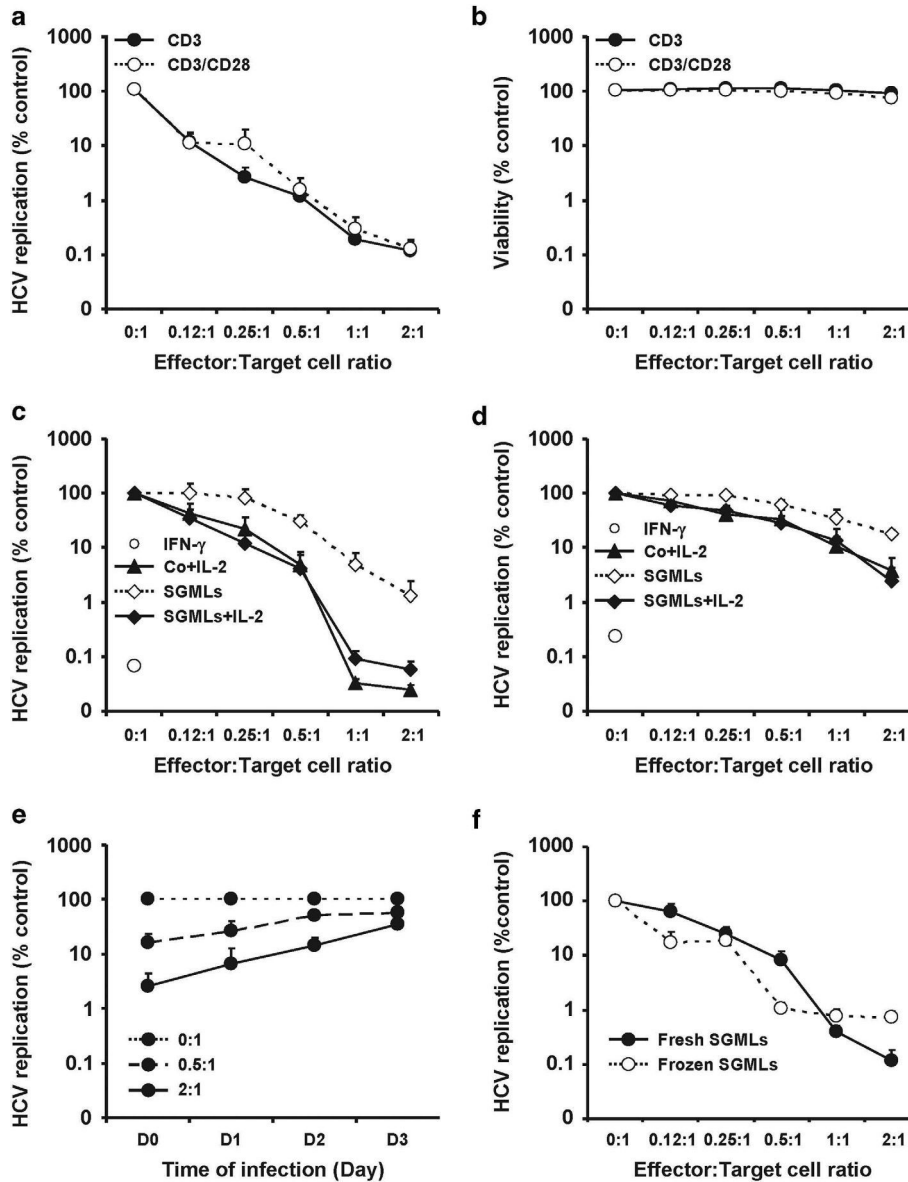


Figure 1. Dose- and time-dependent inhibition of HCV replication by suicide gene-modified lymphocytes (SGMLs) in the absence of cytotoxicity against target cells (a) Inhibition of HCV replication by SGMLs. Fixed amounts of Huh7.5.1 cells were electroporated with a luciferase-expressing hepatitis C virus (HCV) replicon and cocultured with increasing numbers of effector cells (black circles, full line: SGMLs generated after CD3 activation; white circles, dashed line: SGMLs generated after CD3/CD28 costimulation). Data are expressed as the mean \pm s.e. %HCV replication compared with that in control (target cells cultured alone: $6.19 \times 10^6 \pm 0.51 \times 10^6$ relative light units (RLU); $n = 6$). (b) Target cell viability at different effector:target cell ratios. Target cells were stained with crystal violet at the end of the coculture experiments. Data correspond to experiments shown in (a), and cell viability is expressed as the mean \pm s.e. optical density of cells cultured with SGMLs compared with that of control (target cells: 0.51 ± 0.13 ; $n = 6$). (c) Antiviral activity of SGMLs. Huh7.5.1 cells infected with the HCV replicon were cultured in the presence or absence of either varying numbers of effector cells, with or without 500 IU ml^{-1} IL-2 (a cofactor required for effector cell survival and proliferation) or in the presence or absence of 100 ng ml^{-1} IFN- γ (a positive control for antiviral activity, in the absence of effector cells; white circle). SGMLs: white diamonds, dashed line, $n = 4$; non-transduced expanded control lymphocytes (Co) +IL-2: black triangles, full line, $n = 4$; SGMLs+IL-2: black diamonds, full line, $n = 5$. HCV replication was evaluated by quantifying luciferase activity 3 days after HCV infection. Data are expressed as the mean \pm s.e. %HCV replication compared with that in control (target cells alone, cultured without IL-2 or IFN- γ : $5.03 \times 10^6 \pm 3.53 \times 10^6$ RLU; $n = 4$). (d) Effect of IL-2 on antiviral activity in the HCVcc model. Huh7.5.1 cells infected with HCVcc were cultured as described in (c). HCV replication was evaluated by quantifying luciferase activity 3 days after infection. Antiviral activity is expressed as the mean \pm SE %HCV replication compared with that in control (target cells cultured without IL-2: $1.43 \times 10^6 \pm 0.62 \times 10^6$ RLU; $n = 3$). (e) Effect of time on antiviral activity of SGMLs. At different times after infection, effector cells were incubated with Huh7.5.1 target cells infected with HCVcc. The cocultures were maintained for 3 days at effector:target cell ratios of 0:1 (dotted line), 0.5:1 (dashed line) or 2:1 (full line). Data are expressed as the mean \pm SE %HCV replication compared with that in control (target cells alone: $0.44 \times 10^6 \pm 0.11 \times 10^6$ RLU on day 0; $0.98 \times 10^6 \pm 0.29 \times 10^6$ RLU after 1 day; $1.42 \times 10^6 \pm 0.44 \times 10^6$ RLU after 2 days; $1.57 \times 10^6 \pm 1.11 \times 10^6$ RLU after 3 days; $n = 4$). (f) Effect of freezing on antiviral activity of SGMLs. Cryopreservation did not affect the antiviral activity of SGMLs (white circles, dashed line) in the HCV replicon model, compared with fresh SGMLs (black circles, full line). Data are expressed as the mean \pm s.e. % HCV replication compared with that in control (target cells alone: $1.60 \times 10^5 \pm 0.80 \times 10^5$ RLU; $n = 3$).

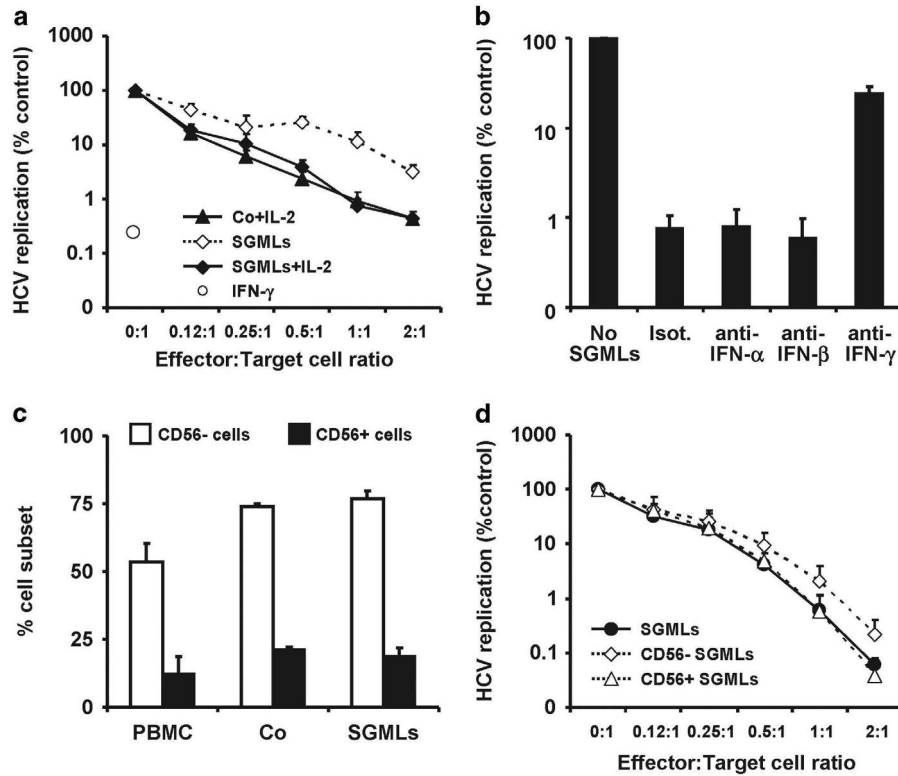


Figure 2. SGML antiviral activity is mediated by IFN- γ , mostly from CD56+ cells. (a) Target cells were cultured as indicated in (Figure 1c), but the target cells were separated from the effector cells in transwells, where the effector cells were placed in the upper chamber, and the target cells were placed in the lower chamber, with a permeable membrane (pore size: 0.4 μm) between the chambers. HCV replication was evaluated by quantifying luciferase activity 3 days later, expressed as the mean \pm s.e. %HCV replication compared with that in control (target cells alone, cultured without IL-2: $3.96 \times 10^6 \pm 2.55 \times 10^6$ RLU; $n = 4$). (b) SGMLs were assessed for antiviral activity in the HCV replicon model at an effector:target cell ratio of 2:1. Effector cells were cultured separate from target cells in transwells in the absence or presence of $5 \mu\text{g ml}^{-1}$ anti-IFN- α , anti-IFN- β , anti-IFN- γ or isotype (isot) control mAbs. Data are expressed as the mean \pm s.e. %HCV replication compared with that in control (target cells cultured without SGMLs: $4.71 \times 10^6 \pm 3.14 \times 10^6$ RLU; $n = 3$). (c) The frequency of CD56-negative cells (white bars) and CD56-positive cells (black bars) was quantified by flow cytometry; PBMC: the initial suspension, Co cells: non-transduced, expanded lymphocytes. Data are expressed as the mean \pm s.e. % cell subsets compared with the total number of cells ($n = 3$). (d) CD56-depleted (CD56-; white diamonds, dashed line) and CD56-enriched (CD56+; white triangles, dashed line) fractions of SGMLs were compared with unsorted SGMLs (black circles, full line) for antiviral activity in the HCV replicon model. Data are expressed as the mean \pm s.e. %HCV replication compared with that in control (target cells alone: $7.62 \times 10^6 \pm 5.96 \times 10^6$ RLU; $n = 4$).

SGML rejection would reduce their therapeutic effect and (2) a cross-reaction could contribute to hepatic graft rejection. The calcineurin inhibitors, Cyclosporin A (CsA) and Tacrolimus (Levallois-Perret, France; FK506), are typically administered to patients with LTs to prevent graft rejection. We previously reported that the alloreactivity of *ex vivo*-expanded lymphocytes was resistant to CsA.¹⁸ Therefore, we reasoned that calcineurin inhibitors might prevent allo-immunization against both the liver graft and the SGMLs, but would not impair SGML antiviral activity. Thus, we evaluated *in vitro* the effects of CsA and FK506 on HCV replication. Electroporated Huh7.5.1 cells were incubated in the absence or presence of fixed amounts of SGMLs with increasing concentrations of CsA or FK506, in the HCV replicon model (Figure 3a and b) or in the HCVcc model (Figure 3c and d). In accordance with previous reports,⁹ a high concentration of CsA (Figure 3a and c), but not FK506 (Figure 3b and d), exhibited an inhibitory *in vitro* effect on HCV replication, and this effect was not due to a toxic effect on cell viability (Supplementary Figure S4). However, neither CsA nor FK506 blocked the antiviral effect of SGMLs (Figure 3), indicating that SGMLs were resistant to the immunosuppressive activity of calcineurin inhibitors. Similar results were observed when exogenous IL-2 was omitted in the culture (Supplementary Figure S5), indicating that a possible reversal of the SGML antiviral activity by calcineurin inhibitors is not overcome by the addition of exogenous IL-2. These results suggested that administration of

calcineurin inhibitors to recipients of LTs as a prophylaxis for liver graft rejection may not prevent the antiviral activity of SGMLs.

SGML depletion is more efficient with the iCasp9 than with the HSV-tk suicide gene

We assessed the ability of the HSV-tk suicide gene to reverse SGML-induced cytotoxicity. We prepared cocultures at low ($\leq 1:1$) and high (2:1 to 8:1) effector:target cell ratios, in the presence or absence of the prodrug, ganciclovir (GCV), added at the initiation of culture. After 3 days of coculture, a slight shift in the viability curve was observed (Figure 4a), indicating that GCV caused a small inhibition in the cytotoxic activity of HSV-tk+ SGMLs against the target cells. This weak GCV-induced depletion of HSV-tk+ SGMLs prompted us to examine SGMLs that expressed the iCasp9 suicide gene. The new-generation, iCasp9 suicide gene was reported to confer more rapid, efficient killing than the HSV-tk suicide gene, when cells were exposed to its prodrug, a chemical inducer of death (CID)²⁰. We found that the addition of the CID at initiation of the culture indeed completely prevented the cytotoxic activity of iCasp9+ SGMLs at high effector:target cell ratios (Figure 4b), up to a 40:1 ratio (data not shown); as expected, GCV had no effect on these iCasp9+ SGMLs. Conversely, also as expected, the CID did not affect the cytotoxic activity of HSV-tk+ SGMLs (Figure 4a). When evaluated in terms of lytic units (calculated as shown in

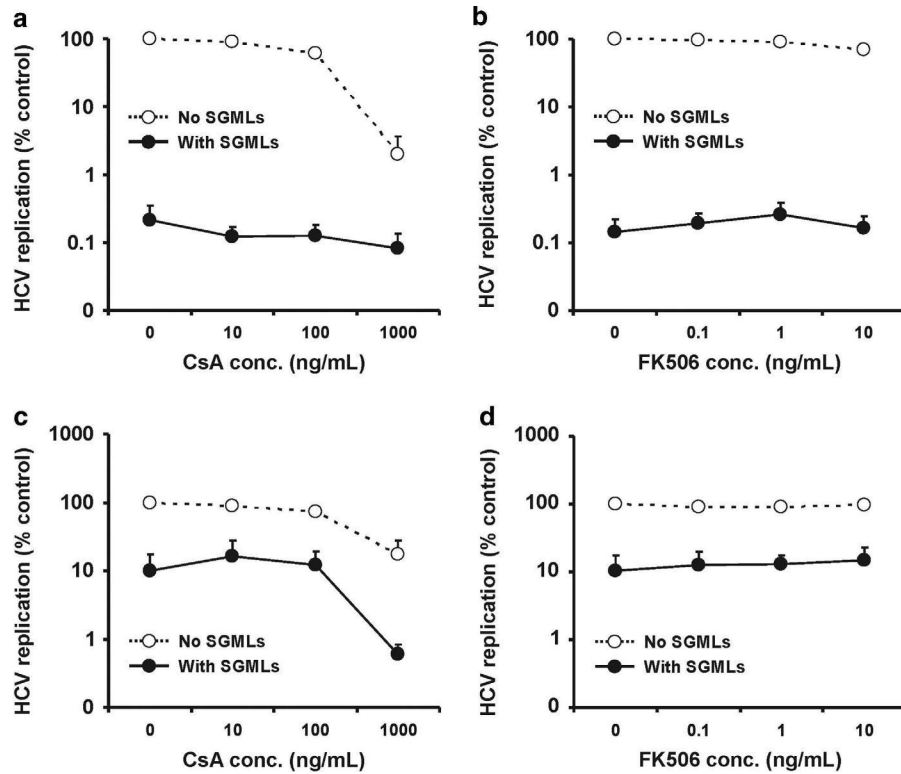


Figure 3. SGML antiviral activity is resistant to calcineurin inhibitors. Huh7.5.1 target cells were incubated in the absence (white circles, dashed lines) or presence (black circles, full lines) of SGMLs at an effector:target cell ratio of 0.5:1 in the HCV replicon model (**a, b**) or at an effector:target cell ratio of 2:1 in the HCVcc infection model (**c, d**). All cultures were performed in the presence of 500 IU ml⁻¹ IL-2 and were exposed to increasing amounts of CsA (**a, c**) or FK506 (**b, d**). HCV replication was evaluated 3 days later. Data are expressed as the mean \pm s.e. %HCV replication compared with that in control (target cells cultured without SGMLs nor calcineurin inhibitor): (**a**) $7.56 \times 10^6 \pm 6.25 \times 10^5$, $n = 4$; (**b**) $6.90 \times 10^6 \pm 5.85 \times 10^5$, $n = 4$; (**c**) $2.64 \times 10^5 \pm 0.93 \times 10^5$, $n = 4$; (**d**) $4.86 \times 10^5 \pm 1.53 \times 10^5$, $n = 4$.

Supplementary Figure S6), GCV had no effect on HSV-tk+ SGMLs, but CID completely prevented the cytotoxicity of iCasp9+ SGMLs (Figure 4c). The greater efficacy of the iCasp9/CID system over the HSV-tk/GCV system may not result from a more pronounced SGML depletion, but rather, from a more rapid depletion. This was suggested by the observation that, after one week of SGML cultures in the presence of their respective prodrugs, both prodrugs caused a similar level of SGML depletion (Figure 4d). To further evaluate the effect of SGML depletion on antiviral activity, iCasp9+ SGMLs were cocultured with target cells in the absence or presence of CID. The antiviral activity, evaluated at noncytotoxic effector:target cell ratios (Figure 4e), was associated with an IFN- γ production (Figure 4f) and the SGML depletion by CID was associated with the abrogation of the antiviral effect (Figure 4e) and of the IFN- γ production (Figure 4f).

DISCUSSION

LT is the treatment of choice for end-stage liver diseases, but the systematic reinfection of the graft, associated with an accelerated recurrence of liver disease after transplantation limits its use in patients with HCV infections. A phase I clinical trial performed by Ohira *et al.*⁸ demonstrated that liver graft-derived, *ex vivo*-activated lymphocytes infused 3 days after transplantation could provide an antiviral effect that could prevent liver graft HCV reinfection. In that study, the activated hepatic lymphocytes had a more potent antiviral effect when the initial viral load was low. Conversely, with a high viral load, the antiviral effect was less potent. Hence, we reasoned that, at 3 days after LT, the liver graft may have already been reinfected; however, at the time of transplantation, the liver graft would be less likely to be reinfected.

Therefore, the activated lymphocytes should be delivered at the time of transplantation. However, this approach requires cell preparation prior to the acquisition of the liver graft; thus, the SGMLs must be produced from other sources. Therefore, we considered the possibility of using third-party allogeneic SGMLs acquired from healthy blood donors. Indeed, this cell therapy product contains *ex vivo*-activated lymphocytes. We previously demonstrated that SGMLs could be safely infused into patients that had received an HSC transplantation. In that study, we showed that SGMLs could specifically control occasional side effects, such as the induction of GvHD.¹² Furthermore, the prior *ex vivo* retroviral-mediated transfer of a suicide gene into the SGMLs allowed their specific *in vivo* killing with the administration of a prodrug, delivered at the time side effects were detected.

In the present study, we showed that SGMLs provided a potent antiviral effect at low effector:target cell ratios that are non-toxic for target cells. We tested SGMLs on two *in vitro* HCV replication models, including the widely used HCVcc infection model. We observed that the SGML-mediated antiviral effect was more efficient when SGMLs were added at time of HCV inoculation, and that the later the time of SGMLs addition, the lower the efficacy. This finding confirmed our hypothesis that activated lymphocytes, such as SGMLs, should be infused at the time of transplantation. The observation that an antiviral effect can be observed at low, non-toxic effector:target cell ratios suggest that the number of cells that need to be activated in order to produce the IFN- γ involved in the antiviral effect is lower than the number of cells required to induce a cytotoxic effect. This interpretation is substantiated by the observation that the CID-induced depletion of SGMLs abrogated completely their cytotoxic activity, but only partially their antiviral effect; at high effector-target cell ratios, few

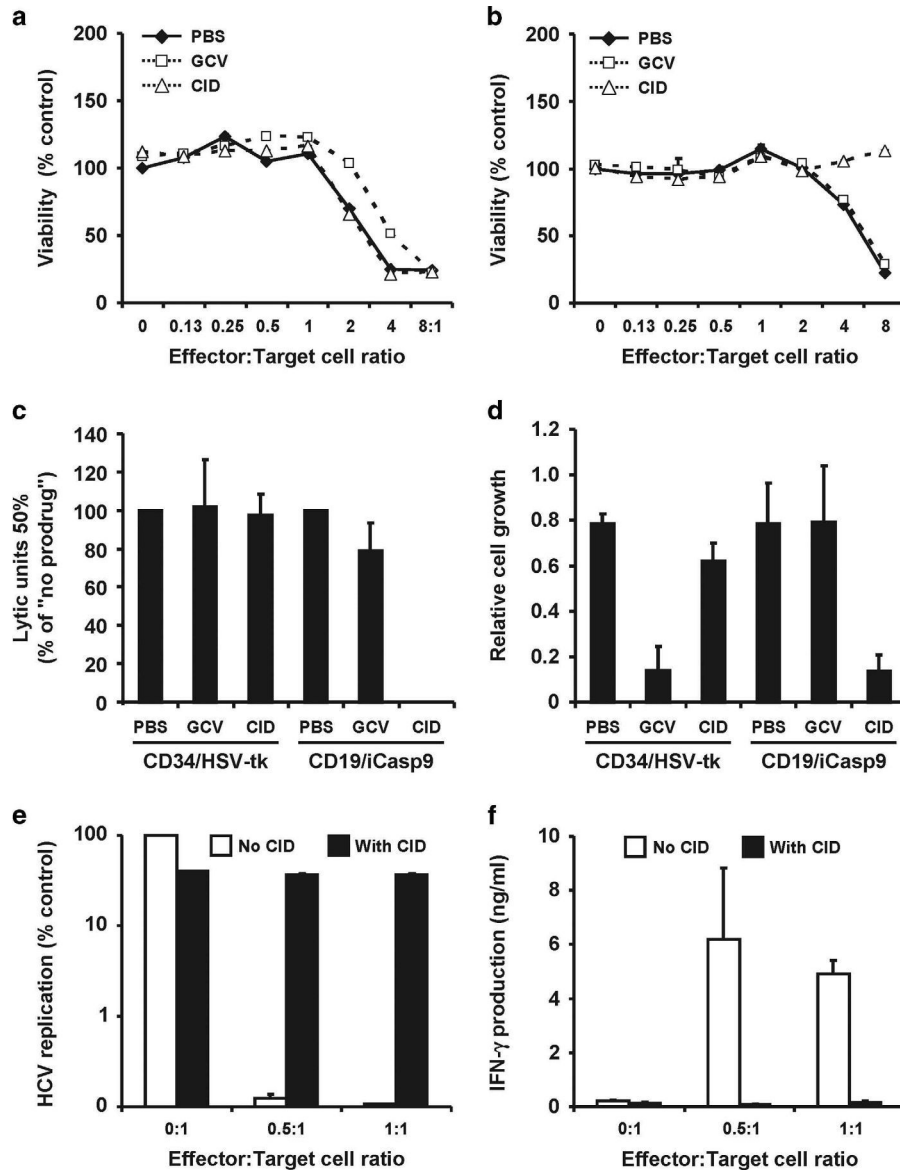


Figure 4. SGML depletion was more efficient with iCasp9/CID than with HSV-tk/GCV. SGMLs that expressed either the HSV-tk (a) or the iCasp9 (b) suicide gene were cocultured with Huh7.5.1 target cells electroporated with the HCV replicon. Cocultures were not exposed (PBS: black diamonds, full line) or exposed to either GCV (white squares, dashed line) or CID (white triangles, dashed line) at the indicated effector:target cell ratios (from 0:1 to 8:1). The target cell viability, evaluated 3 days later, is expressed as the mean \pm s.e. %optical density compared with that of control (target cells alone: optical density = 0.97 ± 0.03 for one donor representative of three). (c) The effect of prodrugs on SGML cytotoxicity. HSV-tk+ SGML (left) and iCasp9+ SGML (right) cytotoxicities were measured after 3 days of coculture with target cells in the presence or absence of prodrugs, CID or GCV. Data are expressed as the mean \pm s.e. %LU50 compared with that of control effector:target cocultures without prodrug (controls = 100%). Control measurements were: CD34/HSV-tk SGMLs: 116 ± 59 LU50 ($n = 3$); CD19/iCasp9 SGMLs: 105 ± 34 LU50 ($n = 4$). (d) The efficiencies of GCV and CID in SGML depletion. SGMLs were expanded for one week in the absence (PBS) or presence of a prodrug. Data are expressed as the mean \pm s.e. relative cell growth during this week ($n = 4$). (e, f) The effects of the CID prodrug on the antiviral activity and IFN- γ production by SGMLs. Huh7.5.1 target cells electroporated with the HCV replicon were cocultured with iCasp9+ SGMLs at the indicated effector:target cell ratios, in the absence (white bars) or presence (black bars) of CID and were evaluated 3 days later for HCV replication (e) and IFN- γ concentration in the culture supernatant (f). Data in (e) are expressed as the mean \pm s.e. %HCV replication compared with that in control (target cells cultured without SGMLs and without CID: $1.09 \times 10^6 \pm 0.02 \times 10^6$ RLU; $n = 3$). Data in (f) are expressed as ng ml $^{-1}$ IFN- γ (mean \pm s.e., $n = 3$).

SGMLs may escape the CID-induced death and may be sufficient to generate an antiviral effect, but not a cytotoxic one.

Similarly to liver lymphocytes⁸, peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) subjected to CD3+IL-2 activation present an IFN- γ -mediated antiviral activity toward HCV and an antitumor activity toward hepatocellular carcinoma, both provided mostly by CD56+ cells, including CD3- CD56+ NKs and CD3+ CD56+ NK-like T cells.²¹ These studies are consistent with our present results and

with our recent report, demonstrating that high concentrations of SGMLs provided NK and NK-like T-cell-mediated antitumor effects in a hepatocellular carcinoma model²². However, as they were generated after short-term (3 days) activation with IL-2, this raises the question of the similitude of such activated lymphocytes, as well as of our SGMLs, with lymphokine-activated killer (LAK) cells. Indeed, the clinical use of LAK cells was limited owing to a massive release of cytokines and subsequent pulmonary edema, requiring

intensive care. Our SGMLs seem to be closer to cytokine-induced killer cells than to LAK cells in terms of protocol of activation (CD3+IL-2 for SGMLs vs CD3+IL-2±IFN-γ ±IL-1 for cytokine-induced killer cells vs IL-2 for LAK cells) and culture duration (2–4 weeks for SGMLs and cytokine-induced killer cells vs 3–5 days for LAK cells). One may hypothesize that this may lead to differences between LAK vs SGML (or cytokine-induced killer cells), as an example in terms of expression of homing molecules (thus, of homing properties) and/or exhaustion (thus, of potential for cytokine release, proliferation and cytotoxicity). Indeed, SGMLs, evaluated in phase I to III clinical trials in patients transplanted with hematopoietic stem cells, induced limited toxicities^{9–12} and, to the best of our knowledge, no pulmonary edema.

Using a humanized hepatocellular carcinoma mouse model, we previously demonstrated that, when infused intravenously, SGMLs preferentially homed to the liver and weakly migrated to the lungs.²² This property is of advantage to improve the efficacy while limiting the peripheral spreading of SGMLs. Indeed, infusing SGMLs could allow reaching high local concentrations of IFN-γ, close to the target cells while leading to low peripheral IFN-γ concentrations. In this respect, this should be of great advantage, in terms of tolerability, over infusing exogenous recombinant IFNs, such as IFN-γ or IFN-α: the IFN-α toxicity is a strong limitation of the current pegylated-IFN-α-based regimen due to the doses required to reach efficient concentrations in the liver, which also lead to high concentrations in peripheral, non-target organs and induce severe side effects. However, the use of allogeneic SGMLs is associated with complex immunological interactions involving three immunological partners: the patient's immune system, the liver graft lymphocytes and the allogeneic SGMLs, generated from a third-party donor. Nevertheless, SGMLs also have the advantage of being resistant to CsA inhibition. Thus, an immunosuppressive regimen with CsA can control the first two partners: (1) the recipient immune system alloreactivity toward the liver graft (prevention of liver graft rejection) and toward SGMLs, and (2) the alloreactivity of grafted liver lymphocytes toward the recipient tissues (hepatic GvHD). Alternatively, the third partner, the SGMLs, can be controlled with the suicide gene approach without affecting the first two partners.

One important issue is to determine whether there is any advantage in using third-party SGMLs, which are genetically different from the liver graft, compared with using autologous liver graft-derived lymphocytes. This hypothesis is technically challenging to investigate, because HCV replication is typically evaluated *in vitro*, with established hepatoma cell lines. Indeed, primary human hepatocytes are mostly refractory to HCV infection *in vitro*. Thus, comparing the antiviral activity of SGMLs toward autologous vs allogeneic primary human hepatocytes remains unfeasible. Indirect observations have suggested that alloreactivity may provide additional benefits. When activated lymphocytes were restimulated with CD3 mAbs 24 h before evaluation of their antiviral activity, their ability to decrease HCV replication improved.²¹ Also, allogeneic HSC transplantation,²³ but not autologous HSC transplantation,²⁴ was reported to lead to loss of detectable HIV, which was temporally correlated with full donor chimerism, but also to the development of GVHD, a complication of HSC transplantation associated with alloreactivity. Although the mechanisms leading to a HIV cure after HSC transplantation remain to be elucidated, and although they may be different from those involved in the prevention of HCV replication, those results suggested that alloreactivity may add benefit to an antiviral effect.

To date, clinical experiences with SGMLs in an allogeneic context have shown that the potential risk of GvHD induction is low, particularly in the liver, and that, even when side effects occur, they can be efficiently controlled with the suicide gene approach.^{9,12,25} Therefore, we propose to produce a bank of 'ready for use' allogeneic SGMLs. Then, when a patient receives a LT, a batch of SGMLs could be selected from the bank and infused into the patient

during transplantation, without wasting the time required for SGML production and qualification. Taken together, our results have provided *in vitro* proof-of-concept that an adoptive immunotherapy can be safely applied to the efficient prevention of liver graft reinfection by HCV. Additional *in vivo* experiments with human liver-chimeric mouse models of HCV infections²⁶ will be required to demonstrate further the feasibility of our approach.

MATERIALS AND METHODS

Production of SGMLs

Allogeneic SGMLs were produced as previously described.²² After informed consent from healthy blood donors, PBMCs were isolated by ficoll centrifugation of donated blood. Harvested PBMCs were activated with a CD3 mAb (10 ng ml⁻¹ OKT3, Jansen-Cilag, Levallois-Perret, France) and human IL-2 (500 IU ml⁻¹, Proleukin, Novartis Pharma, Dorval, Québec). Activated PBMCs were cultured for 3 days, and on day 3, they were transduced with one of two retroviral vectors. One was the MP71-T34FT vector, which encoded a truncated form of the human CD34 sequence fused to the HSV-tk sequence.^{17,27} The other retroviral vector (SFG.iCasp9.2A.ΔCD19; provided by Pr M.K. Brenner, Center for Cell and Gene Therapy, Baylor College of Medicine, Houston, TX) encoded the human CD19 and iCasp9 sequences.²⁵ Transduced cells were immunomagnetically selected on day 5 and expanded until day 14. These transduced and CD34-selected or CD19-selected cells are referred to as SGMLs. In parallel, nontransduced cells were expanded for 14 days to serve as control cells and are referred to as Co cells. Effector cells (SGMLs or, when indicated, Co cells or PBMCs) were qualified for phenotype and prodrug sensitivity. Also, they were functionally characterized *in vitro* for antiviral activity and cytotoxicity.

The percentage of transduced selected cells out of the total numbers of CD34+ or CD19+ cells before immunomagnetic selection (that is, the transduction efficiency) was determined by immunostaining with phycoerythrin-conjugated CD34 mAb or allophycocyanin-conjugated CD19 mAb (Miltenyi Biotec, Paris, France) and flow cytometry analyses (LSRII, Becton Dickinson, San Diego, CA, USA). The transduction efficiency was 13.1±3.1% (*n*=10) for CD34/HSV-tk+ SGMLs and 26.1±8.1% (*n*=6) for CD19/iCasp9+ SGMLs, respectively. The purity of the positive fraction after immunomagnetic sorting was 93.6±0.7% (*n*=10) for CD34/HSV-tk+ SGMLs and 97.2±0.9% (*n*=6) for CD19/iCasp9+ SGMLs, respectively. The sensitivity of SGMLs to the corresponding prodrug was confirmed by culturing HSV-tk+ SGMLs in the absence or presence of 1 μg ml⁻¹ ganciclovir, or GCV (Cymevan; Syntex, Puteaux, France), or by culturing iCasp9+ SGMLs in the presence or absence of 10 nM of CID (BB homodimerizer; Ozyme, St Quentin en Yvelines, France). The relative cell growth was defined as the absolute number of cells obtained at the indicated time of culture to the number of input cells at the initiation of the culture.

Evaluation of SGML antiviral activity

The HCV replicon model. Huh7.5.1 cells were cultured in Dulbecco's Modified Eagle Medium (PAA Laboratories, Vélizy Villacoublay, France) supplemented with 10% fetal bovine serum (PAN Biotech GmbH, Aidenbach, Germany), non-essential amino acids (GIBCO, Invitrogen, Cergy Pontoise, France) and 10 μg ml⁻¹ gentamycin (GIBCO). Huh7.5.1 cells were electroporated with an HCV replicon that comprised RNA corresponding to the HCV genome, genotype 2a, isolate JFH1, which was defective for virus entry, due to deletions of E1 and E2 envelope proteins and the luciferase gene (JFH1ΔE1E2-luc). In the present study, the Huh7.5.1 cells served as 'target cells'.

Different amounts of SGML cells (effectors) were co-incubated with fixed amounts of target cells to produce effector:target cell ratios that ranged from 0.125:1 to 2:1 (cocultures that allowed contact between effector and target cells). The same cell numbers were also cultured in separate compartments (transwell cultures, which did not allow contact between effector and target cells) using transwells with a pore size of 0.4 μm (Sigma, Lyon, France). Unless otherwise indicated, all cultures were performed in the presence of 500 IU ml⁻¹ IL-2. Target cells alone were cultured in the presence of 100 ng ml⁻¹ IFN-γ (Clinisciences, Nanterre, France) to serve as a positive control of viral replication inhibition. After 3 days of culture, SGMLs (non-adherent cells) and dead target cells were removed by washing, and the remaining viable target cells (adherent cells) were lysed with 0.1% w/v SDS in PBS. Luciferin was then added to measure luciferase activity, which reported viral replication within target cells.

We also investigated which soluble factor(s) were involved in SGML antiviral activity. During the co-incubation of SGMLs and target cells, we added antibodies (final concentration of $5 \mu\text{g ml}^{-1}$; eBioscience SAS, Paris, France) that specifically blocked IFN- α , IFN- β and IFN- γ (and an isotype control). The quantification of IFN- γ in culture supernatants was performed using a Legend Max human IFN- γ ELISA kit (BioLegend, San Diego, CA, USA) according to the manufacturer's instructions.

Where indicated, after 14 days of expansion, CD56 $^-$ (T lymphocytes) and CD56 $^+$ (NK and NK-like T cells) populations were isolated from SGMLs with phycoerythrin-conjugated CD56 antibody with the anti-phycoerythrin Multisort kit (Miltenyi Biotec). The separation was performed with the autoMACS Separator (Miltenyi Biotec). The purity of each cell fraction was determined by immunostaining with Pacific Blue-conjugated CD3 mAb (Becton Dickinson) and phycoerythrin-conjugated CD56 mAb (Miltenyi Biotec), and performing flow cytometry (LSRII, Becton Dickinson). The antiviral activities of CD56 $^-$ and CD56 $^+$ fractions were tested at different effector:target cell ratios, as previously described.

We intended to use these SGMLs in an immunosuppressive context; therefore, we tested SGML resistance to calcineurin inhibitors. To that end, Huh7.5.1 and SGMLs were cocultured at an effector:target cell ratio of 0.5:1 in the presence of different concentrations of either CsA or FK506 (Tacrolimus).

The cell culture produced-HCV model: The HCVcc model allowed the production of infectious viral particles. In brief, Huh7.5.1 cells were infected with the recombinant virus, Jc1 HCVcc (genotype 2a/2a chimera), which also expressed luciferase. This laboratory prototype strain, based on JFH1,²⁸ has been used extensively to study virus–host interactions and to evaluate antivirals *in vitro* and *in vivo*.^{28–32} At different days post infection, SGMLs were added to HCVcc-infected Huh7.5.1 cells at effector:target cell ratios of 0.5:1 or 2:1. Three days after adding SGMLs, Huh7.5.1 cells were lysed and tested for luciferase activity. Huh7.5.1 cell viability was evaluated with crystal violet staining, as previously described. The antiviral activities of CD56 $^-$ and CD56 $^+$ subsets of SGMLs were also tested in this system at an effector:target cell ratio of 0.5:1.

Evaluation of SGML cytotoxic activity

In each assay, effector and target cells were cocultured in parallel with the antiviral assays to monitor target cell viability. After 3 days of coculture, non-adherent effector cells and dead target cells were removed by washing with PBS; the remaining viable, adherent, target cells were stained for 15 min at room temperature with crystal violet (Sigma). Cells were then washed three times with tap water and lysed with 1% w/v SDS in PBS for 10 min at room temperature. Viable cell density was determined by the absorbance at 560 nm, measured on a Mithras LB 940 microplate reader (Berthold, Thoiry, France). Cell viability was expressed as the percent optical density of treated cells compared with control cells. We also calculated the inverse of the number of cells per 10^6 effector cells required to detect a 50% decrease in optical density (lytic units 50%; LU50; Supplementary Figure S6). The LU50 values of the experimental groups were normalized to the LU50 values of the corresponding control groups to control for inter-experimental variations. The results are expressed as the mean LU50 \pm s.e.m.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by Inserm, the Fondation pour la Recherche Médicale (Comité Alsace), the Ligue Nationale Contre le Cancer (Conférence de Coordination Inter-Régionale Grand-Est, grant # 1F110005LBKD), the Association pour la recherche sur le Cancer (ARC, grant # SFI20111203529), the Société d'Accélération de Transfert de Technologie (SATT) Conectus Alsace, the Agence Nationale pour la Recherche (ANR, LabEx program) and EU Interreg-IV Program Hepato-Regio-Net. Eric Robinet was supported by the Agence Nationale pour la Recherche sur le SIDA et les Hépatites Virales (ANRS, grant # 2008 059 ULP). Céline Leboeuf received fellowships from the Fondation Transplantation and the Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC, grant # DOC20110603384); and Tao Wu received a fellowship from the Alsace Region. A European Patent application (n° EP12305259.9) related to this study, entitled 'Method for preventing or treating HCV infection by administration of suicide gene-modified lymphocytes', was submitted on the 2 March 2012 by the University of Strasbourg.

REFERENCES

- Global surveillance and control of hepatitis C. Report of a WHO Consultation organized in collaboration with the Viral Hepatitis Prevention Board, Antwerp, Belgium. *J Viral Hepatitis* 1999; **6**: 35–47.
- Skagen C, Lucey M, Said A. Liver transplantation: an update 2009. *Curr Opin Gastroenterol* 2009; **25**: 202–208.
- Gane EJ. The natural history of recurrent hepatitis C and what influences this. *Liver Transpl* 2008; **14**: S36–S44.
- Tai AW, Chung RT. Treatment failure in hepatitis C: mechanisms of non-response. *J Hepatol* 2009; **50**: 412–420.
- Forns MP, Forns X, Chung RT, Terrault N, Brown RS, Fenkel JM *et al*. Pretransplant sofosbuvir and ribavirin to prevent recurrence of HCV infection after liver transplantation. *Hepatology* 2013; **58**: 314A–315A.
- Forns X, Fontana RJ, Moonka D, McHutchinson JG, Symonds WT, Denning JM *et al*. Initial evaluation of the sofosbuvir compassionate use program for patients with severe recurrent HCV following liver transplantation. *Hepatology* 2013; **58**: 732A–733A.
- Charlton M. Telaprevir, boceprevir, cytochrome P450 and immunosuppressive agents—a potentially lethal cocktail. *Hepatology* 2011; **54**: 3–5.
- Ohira M, Ishiyama K, Tanaka Y, Dskali M, Igarashi Y, Tashiro H *et al*. Adoptive immunotherapy with liver allograft-derived lymphocytes induces anti-HCV activity after liver transplantation in humans and humanized mice. *J Clin Invest* 2009; **119**: 3226–3235.
- Bonini C, Ferrari G, Verzeletti S, Servida P, Zappone E, Ruggieri L *et al*. HSV-TK gene transfer into donor lymphocytes for control of allogeneic graft-versus-leukemia. *Science* 1997; **276**: 1719–1724.
- Ciceri F, Bonini C, Stanghellini MTL, Bondanza A, Traversari C, Salomoni M *et al*. Infusion of suicide-gene-engineered donor lymphocytes after family haploidentical haemopoietic stem-cell transplantation for leukaemia (the TK007 trial): a non-randomised phase I-II study. *Lancet Oncol* 2009; **10**: 489–500.
- Zhou X, Di Stasi A, Tey SK, Krance RA, Martinez C, Leung KS *et al*. Long-term outcome after haploidentical stem cell transplant and infusion of T cells expressing the inducible caspase 9 safety transgene. *Blood* 2014; **123**: 3895–3905.
- Tiberghien P, Ferrand C, Liou B, Milpied N, Angonin R, Deconinck E *et al*. Administration of herpes simplex-thymidine kinase-expressing donor T cells with a T-cell-depleted allogeneic marrow graft. *Blood* 2001; **97**: 63–72.
- Mercier-Letondal P, Deschamps M, Sauce D, Certoux JM, Milpied N, Liou B *et al*. Early immune response against retrovirally transduced herpes simplex virus thymidine kinase-expressing gene-modified T cells coinfecting with a T cell-depleted marrow graft: an altered immune response? *Hum Gene Ther* 2008; **19**: 937–950.
- Deschamps M, Mercier-Letondal P, Certoux JM, Henry C, Liou B, Pagneux C *et al*. Deletions within the HSV-tk transgene in long-lasting circulating gene-modified T cells infused with a hematopoietic graft. *Blood* 2007; **110**: 3842–3852.
- Maily L, Leboeuf C, Tiberghien P, Baumert T, Robinet E. Genetically engineered T-cells expressing a ganciclovir-sensitive HSV-tk suicide gene for the prevention of GvHD. *Curr Opin Investig Drugs* 2010; **11**: 559–570.
- Sauce D, Tonnelier N, Duperrier A, Petracca B, de Carvalho Bittencourt M, Saadi M *et al*. Influence of *ex vivo* expansion and retrovirus-mediated gene transfer on primary T lymphocyte phenotype and functions. *J Hematother Stem Cell Res* 2002; **11**: 929–940.
- Mercier-Letondal P, Montcuquet N, Sauce D, Certoux JM, Jeanningros S, Ferrand C *et al*. Alloreactivity of *ex vivo*-expanded T cells is correlated with expansion and CD4/CD8 ratio. *Cytotherapy* 2008; **10**: 275–288.
- Contassot E, Robinet E, Angonin R, Laithier V, Bittencourt M, Pavy JJ *et al*. Differential effects of cyclosporin A on the alloreactivity of fresh and *ex vivo*-expanded T lymphocytes. *Bone Marrow Transplant* 1998; **22**: 1097–1102.
- El-Farrash MA, Aly HH, Watashi K, Hijikata M, Egawa H, Shimotohno K. *In vitro* infection of immortalized primary hepatocytes by HCV genotype 4a and inhibition of virus replication by cyclosporin. *Microbiol Immunol* 2007; **51**: 127–133.
- Marin V, Crioli E, Philip B, Tettamanti S, Pizzitola I, Biondi A *et al*. Comparison of different suicide-gene strategies for the safety improvement of genetically manipulated T cells. *Hum Gene Ther Methods* 2012; **23**: 376–386.
- Dskali M, Tanaka Y, Ohira M, Ishiyama K, Tashiro H, Chayama K *et al*. Possibility of adoptive immunotherapy with peripheral blood-derived CD3(–)CD56+ and CD3+CD56+ cells for inducing antihepatocellular carcinoma and antihepatitis C virus activity. *J Immunother* 2011; **34**: 129–138.
- Leboeuf C, Maily L, Wu T, Bour G, Durand S, Brignon N *et al*. *In vivo* proof of concept of adoptive immunotherapy for hepatocellular carcinoma using allogeneic suicide gene-modified killer cells. *Mol Ther* 2014; **22**: 634–644.
- Henrich TJ, Hu Z, Li JZ, Sciaranghella G, Busch MP, Keating SM *et al*. Long-term reduction in peripheral blood HIV type 1 reservoirs following reduced-intensity conditioning allogeneic stem cell transplantation. *J Infect Dis* 2013; **207**: 1694–1702.
- Cillo AR, Krishnan A, Mitsuyasu RT, McMahon DK, Li S, Rossi JJ *et al*. Plasma viremia and cellular HIV-1 DNA persist despite autologous hematopoietic stem cell transplantation for HIV-related lymphoma. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2013; **63**: 438–441.

- 25 Di Stasi A, Tey SK, Dotti G, Fujita Y, Kennedy-Nasser A, Martinez C *et al*. Inducible apoptosis as a safety switch for adoptive cell therapy. *N Eng J Med* 2011; **365**: 1673–1683.
- 26 Mercer DF, Schiller DE, Elliott JF, Douglas DN, Hao C, Rinfret A *et al*. Hepatitis C virus replication in mice with chimeric human livers. *Nat Med* 2001; **7**: 927–933.
- 27 Fehse B, Kustikova OS, Li Z, Wahlers A, Bohn W, Beyer WR *et al*. A novel 'sort-suicide' fusion gene vector for T cell manipulation. *Gene Ther* 2002; **9**: 1633–1638.
- 28 Wakita T, Pietschmann T, Kato T, Date T, Miyamoto M, Zhao Z *et al*. Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nat Med* 2005; **11**: 791–796.
- 29 Lindenbach BD, Evans MJ, Syder AJ, Wolk B, Tellinghuisen TL, Liu CC *et al*. Complete replication of hepatitis C virus in cell culture. *Science* 2005; **309**: 623–626.
- 30 Lindenbach BD, Meuleman P, Ploss A, Vanwolleghem T, Syder AJ, McKeating JA *et al*. Cell culture-grown hepatitis C virus is infectious *in vivo* and can be recultured *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; **103**: 3805–3809.
- 31 Pietschmann T, Kaul A, Koutsoudakis G, Shavinskaya A, Kallis S, Steinmann E *et al*. Construction and characterization of infectious intragenotypic and intergenotypic hepatitis C virus chimeras. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; **103**: 7408–7413.
- 32 Zhong J, Gastaminza P, Cheng G, Kapadia S, Kato T, Burton DR *et al*. Robust hepatitis C virus infection *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; **102**: 9294–9299.

Supplementary Information accompanies this paper on Gene Therapy website (<http://www.nature.com/gt>)

Annexe III

Poster

Recherche biomédicale : ETUDE CLINIQUE Side by CIDE

Utilisation de lymphocytes T génétiquement modifiés, exprimant le gène inductible de la caspase 9 humaine et le gène de sélection Δ CD19 dans la greffe hématopoïétique allogénique : étude de phase I

Elodie Bôle-Richard, Jean-Marie Certoux, Idir Idirène, Fabrice Larosa, Eric Deconinck, Anne-Marie Mosseley, Fabienne Pouthier, Pierre Tiberghien, Christophe Ferrand & Marina Deschamps.

Inauguration des salles blanches, EFS Bourgogne/Franche-Comté, Besançon, 24 novembre 2015

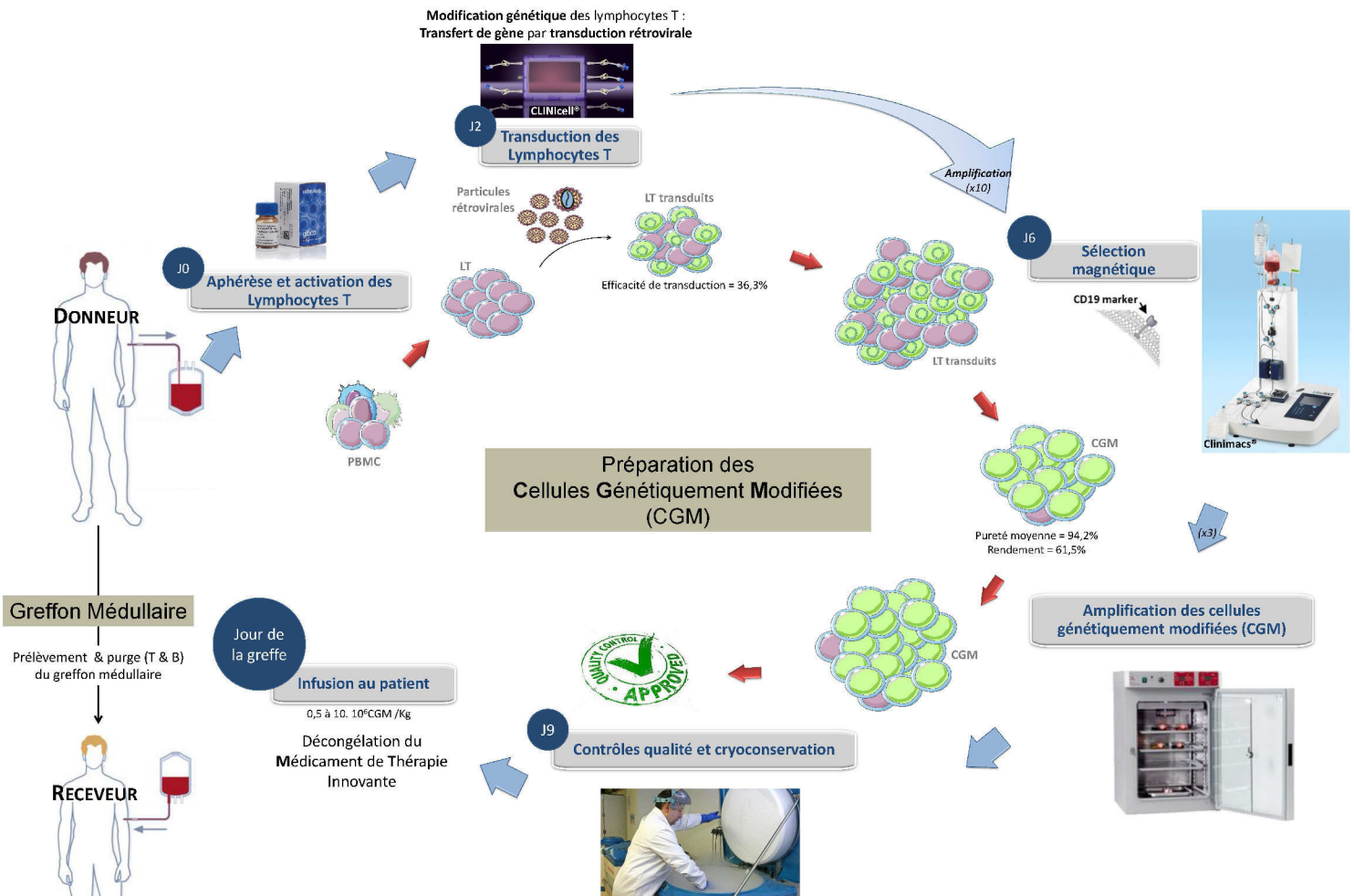
Recherche biomédicale : *ETUDE CLINIQUE Side by CIDE*

Utilisation de lymphocytes T génétiquement modifiés, exprimant le gène inducible de la caspase 9 humaine et le gène de sélection ΔCD19 dans la greffe hématopoïétique allogénique : étude de phase I

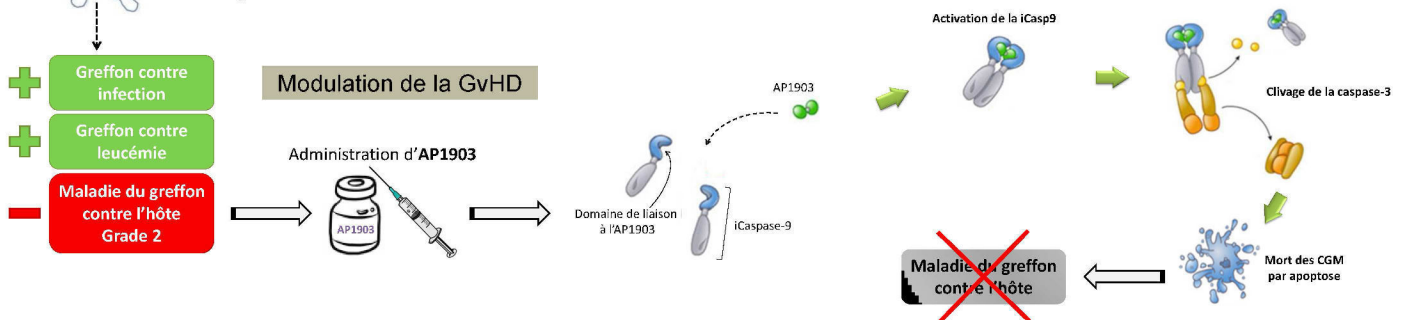
BÔLE-RICHARD E¹., CERTOUX J-M¹., IDIRENE I¹., LAROSA F^{1,2}., DECONINCK E^{1,2}., MOSSELEY A-M³., POUTHIER F⁴., TIBERGHEN P¹., FERRAND C¹., DESCHAMPS M¹.

¹INSERM UMR1098, EFS B/FC, Besançon, France; ²CHU Jean Minjoz, Hématologie, Besançon, France; ³Bellicum pharmaceuticals, Houston, USA; ⁴AICT, EFS B/FC, Besançon, France.

La greffe hématopoïétique est une thérapie cellulaire adoptive très utilisée dans le traitement des cancers hématologiques. Cependant, elle est associée à une complication redoutable : la maladie du greffon contre l'hôte (GvHD).



L'administration de lymphocytes T (LT) exprimant un « gène suicide » avec la greffe de cellules souches hématopoïétiques, peut permettre, en cas de maladie du greffon contre l'hôte, une élimination conditionnelle et sélective de ces lymphocytes grâce à l'utilisation d'un traitement ciblé.



Le transfert du « gène suicide » iCasp9/ΔCD19 est un moyen sécuriser la thérapie cellulaire. Il permet l'élimination spécifique et rapide des cellules génétiquement modifiées (CGM) en cas de survenu d'effets indésirables. L'injection d'AP1903 induit l'activation de la iCasp9 ce qui conduit au déclenchement de l'apoptose de la cellule génétiquement modifiée.

Annexe IV

Posters

Ciblage de l'antigène EGFRvIII, exprimé dans les glioblastomes, par une approche d'immunothérapie anti-tumorale, utilisant des lymphocytes T génétiquement modifiés pour exprimer un récepteur antigénique chimérique (CAR).

Elodie Bôle-Richard, Alizée Jenvrin, Jean-Marie Certoux, Idir Idirène, Marina Deschamps & Christophe Ferrand

L'exposition à un agent hypo-méthylant, 5-azacytidine améliore l'induction d'apoptose de lymphocytes T génétiquement modifiés exprimant iCasp9/ Δ CD19 après traitement à l'AP1903.

Elodie Bôle-Richard, Jean-Marie Certoux, Idir Idirène, Eric Deconinck, Fabrice Larosa, Pierre Tiberghien, Christophe Borg, Christophe Ferrand & Marina Deschamps.

*14ème Congrès de la Société Française de Greffe de Moelle et de Thérapie Cellulaire (SFGM-TC),
Toulouse, 13-14 novembre 2014*

Ciblage de l'antigène EGFRvIII, exprimé dans les glioblastomes, par une approche d'immunothérapie anti-tumorale, utilisant des lymphocytes T génétiquement modifiés pour exprimer un récepteur antigénique chimérique (CAR)

Elodie Bôle-Richard, Alizée Jenvrin, Jean-Marie Certoux, Idir Idirène, Christophe Borg, Marina Deschamps & Christophe Ferrand
EFSBFC-UMR1098- 8 rue du Dr Girod, 25020 Besançon cedex



INTRODUCTION – OBJECTIFS

Incurable, le **glioblastome** est le cancer du cerveau le plus courant (2400 cas / an en France). Un antigène tumoral, variant du récepteur du facteur de croissance épidermique (EGFRvIII) est exprimé à la surface des cellules dans **30% des gliomes** et constitue une **cible antigénique idéale**. Une approche d'immunothérapie cellulaire utilisant des **lymphocytes T (LT) génétiquement modifiés, reprogrammés** pour exprimer un récepteur antigénique chimérique (CAR) reconnaissant l'antigène EGFRvIII permettrait d'activer le LT et de lyser la cellule cible. L'approche CAR permet de combiner la spécificité antigénique d'un anticorps et la fonction effectrice de la cellule T.

RESULTATS

Nous avons développé un **récepteur chimérique de 3^{ème} génération** couplant une simple chaîne d'immunoglobulines (musculus epidermal growth factor receptor antibody MR1scFv, Genebank U76382.1) aux molécules de co-stimulation **CD28** et **4-1BB** ainsi qu'à la chaîne **CD3 ζ** . L'ensemble de ces séquences a été intégré dans un squelette rétroviral pSFG. Une cassette portant un **gène suicide** (caspase 9 inducible : iCasp9) et un gène de sélection (Δ CD19) a également été incorporée, afin de sécuriser l'approche de thérapie cellulaire ; **pSFG-CAR-EGFRvIII : LTR-TagHA-MR1scFv-CD28-4.1BB-CD3 ζ -IRES-iCasp9-2A- Δ CD19-LTR** (fig 1).

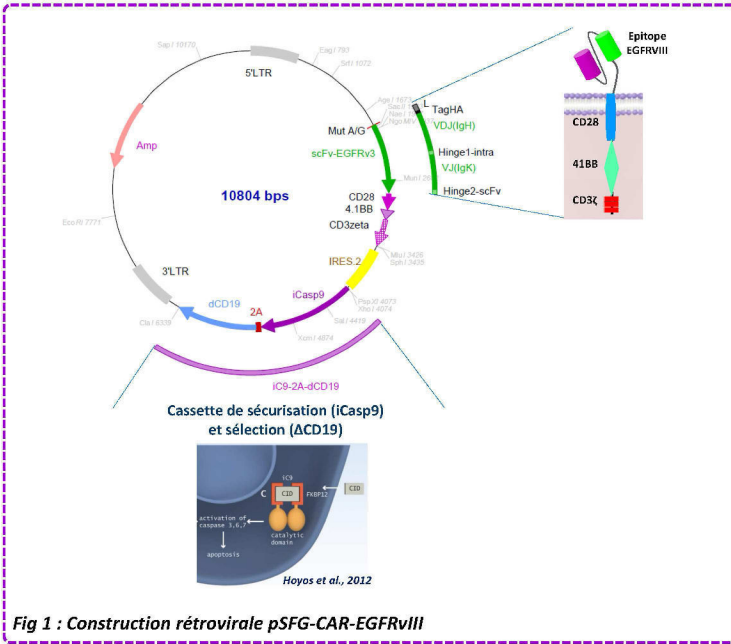


Fig 1 : Construction rétrovirale pSFG-CAR-EGFRvIII

Nous avons généré une **lignée d'empaquetage PG13** (98.8 % Δ CD19 positive). Les lymphocytes T primaires obtenus par **transduction rétrovirale** montrent une efficacité de transduction de 8,3% +/- 3,71% (n=3) (fig 2).

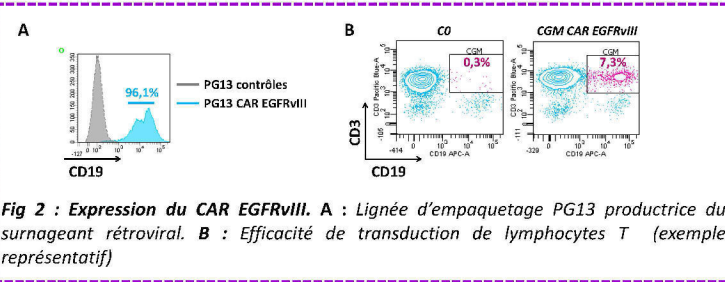


Fig 2 : Expression du CAR EGFRvIII. A : Lignée d'empaquetage PG13 productrice du surnageant rétroviral. B : Efficacité de transduction de lymphocytes T (exemple représentatif)

L'analyse par western blot (WB) avec un anticorps anti-CD3 ζ sur la lignée d'empaquetage, montre l'**expression du récepteur chimérique** (fig 3).

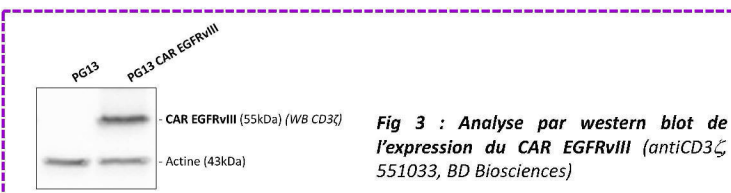


Fig 3 : Analyse par western blot de l'expression du CAR EGFRvIII (antiCD3 ζ 551033, BD Biosciences)

Après fractionnement des compartiments subcellulaires : membrane, cytosol et noyau puis analyse par WB avec un Ac anti-Tag-HA, nous avons mis en évidence que la protéine CAR était localisée dans le **compartiment membranaire** (fig 4).

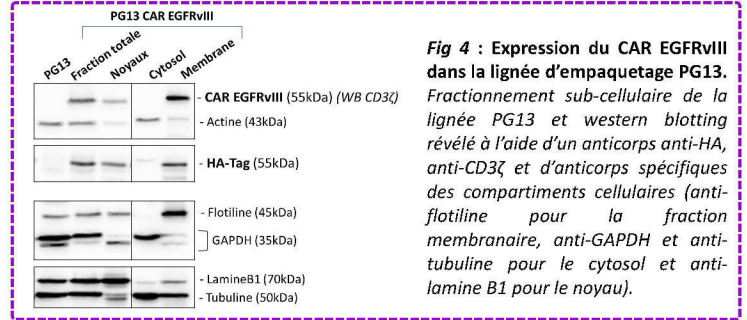


Fig 4 : Expression du CAR EGFRvIII dans la lignée d'empaquetage PG13. Fractionnement sub-cellulaire de la lignée PG13 et western blotting révélé à l'aide d'un anticorps anti-HA, anti-CD3 ζ et d'anticorps spécifiques des compartiments cellulaires (anti-flotiline pour la fraction membranaire, anti-GAPDH et anti-tubuline pour le cytosol et anti-lamine B1 pour le noyau).

Nous disposons au laboratoire du **peptide immunogène PEP3** (LEEKKNYVVDHC) correspondant **spécifiquement à la zone de jonction** du variant EGFRvIII (séquence absente de la séquence EGFR sauvage), couplé à la Biotine. De manière intéressante, le marquage spécifique des cellules CAR+ par cytométrie de flux démontre la **reconnaissance de l'antigène EGFRvIII** par le récepteur antigénique chimérique CAR (fig 5).

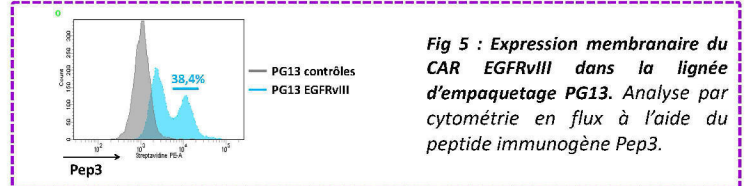


Fig 5 : Expression membranaire du CAR EGFRvIII dans la lignée d'empaquetage PG13. Analyse par cytométrie en flux à l'aide du peptide immunogène Pep3.

Enfin, nous avons évalué la **fonctionnalité des LT-CAR+** face à une lignée de glioblastome surexprimant EGFRv3 (**U87-EGFRvIII**) dans un modèle *in-vitro* alloréactif. De manière intéressante, nous avons mis en évidence une production d'**IFN γ** par les LT reprogrammées CAR+ lorsqu'ils sont en co-culture (rapport de 10 :1 effecteurs/cibles) avec les cellules U87-EGFRvIII+. L'absence d'**IFN γ** en présence de U87 WT témoigne de la spécificité de la réponse médiée par le CAR (fig 6).

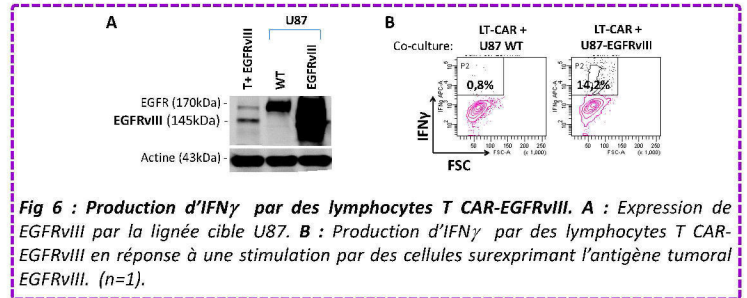


Fig 6 : Production d'IFN γ par des lymphocytes T CAR-EGFRvIII. A : Expression de EGFRvIII par la lignée cible U87. B : Production d'IFN γ par des lymphocytes T CAR-EGFRvIII en réponse à une stimulation par des cellules surexprimant l'antigène tumoral EGFRvIII. (n=1).

CONCLUSION

A travers le ciblage de l'antigène tumoral EGFRvIII, exprimé dans les glioblastomes, nous avons développé, un **squelette rétroviral CAR de 3^{ème} génération** et possédons la **maîtrise de la technologie des récepteurs chimériques à l'antigène**, qui peut être adaptée au ciblage d'antigènes tumoraux exprimés spécifiquement à la surface des cellules tumorales.

Qui plus est, cette **construction** est **sécurisée** par le système suicide iCasp9/AP1903 et permet la **sélection** des cellules génétiquement modifiées (CGM) par tri **immunomagnétique** CD19.

PERSPECTIVES

La suite de ce travail sera de valider l'approche dans un **modèle murin** avec injection des LT CAR+ dans **1/** un modèle de tumeur **sous cutanée** puis **2/** **intra-cranien** (fig 7).



Fig 7 : Modèle murin d'injection sous cutanée de cellules tumorales U87-EGFRvIII-Luc+

L'exposition à un agent hypo-méthylant, 5-azacytidine améliore l'induction d'apoptose de lymphocytes T génétiquement modifiés exprimant iCasp9/ Δ CD19 après traitement à l'AP1903

Elodie Bôle-Richard¹, Jean Marie Certoux¹, Idir Idirène¹, Eric Deconinck², Fabrice Larosa², Pierre Tiberghien¹, Christophe Borg¹, Christophe Ferrand¹ & Marina Deschamps¹
¹UMR1098-EFS B/FC-SFR FED 4234-Besançon – ²Service Hématologie-CHU Jean Minjot, Besançon, France



INTRODUCTION - OBJECTIFS

La modulation de l'alloréactivité post allogreffe de moelle osseuse utilisant des lymphocytes T génétiquement modifiés (GMTC) exprimant un système suicide permet de limiter les effets indésirables (Graft versus Host Disease, GvHD) tout en conservant les effets bénéfiques (Graft versus Leukemia, GvL). Dans un essai clinique de greffe haplo-identique, l'utilisation du gène caspase 9 inducible (iCasp9) (*Di Stasi et al, NEJM 2011*) et le traitement par un agent dimérisant (CID, Chemical Inducer of Dimerization: AP1903, Bellium Pharmaceuticals) a permis l'élimination de plus 90% des GMTC en 30 minutes conduisant à une diminution significative des signes de GvHD. Néanmoins, il a été montré la persistance d'un faible nombre de GMTC post traitement par CID. Nous nous sommes intéressés à cette population de GMTC persistante post exposition au CID, afin de caractériser la perte de sensibilité de ces cellules et proposer un moyen d'amélioration de la réponse.

RESULTATS:

Au laboratoire, nous avons produit par transduction rétrovirale avec un surnageant de grade clinique, différentes lignées cellulaires T iCasp9/ Δ CD19+ (Jurkat, CEM, **fig 1**).



Fig 1 : Vecteur rétroviral, SFG.iCasp9.2A.ACD19.

Nous avons confirmé qu'un faible pourcentage de cellule [$1,47\% \pm 0,67\%$ (n=5)] persiste après traitement au CID. L'exposition répétée à des doses croissantes de CID (0,1 nM à 10 nM), nous a permis de générer des lignées T génétiquement modifiées faibles répondantes (GMTC_{LR}) (**fig 2**).

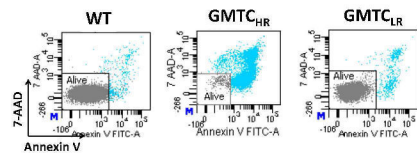


Fig 2 : Etablissement de lignées cellulaires résistantes au CID.

Nous avons montré, par cytométrie en flux et par western blot, respectivement que, comparativement aux lignées fortes répondantes (GMTC_{HR}), les GMTC_{LR} présentent une plus faible expression membranaire de Δ CD19 (RFI = $9,75 \pm 0,21$ vs $222,4 \pm 104$ (n=2)) et intracellulaire de iCasp9 (**fig 3**).

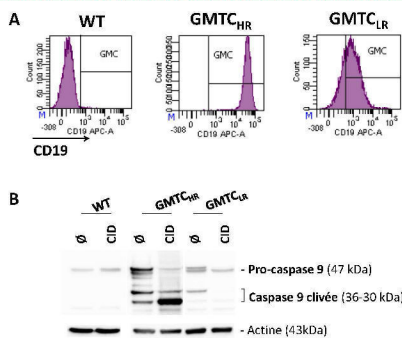


Fig 3 : Corrélation de l'expression du transgène iCasp9/ Δ CD19 et de la réponse au CID. A : Analyse de l'expression de CD19 par cytométrie en flux et **B :** Analyse de l'expression de la iCaspase 9 par western blot (CID 10 nM, 24h)

Concernant les variations des niveaux d'expression des transgènes, nous avons émis l'hypothèse d'une hyper-méthylation du promoteur LTR dans les lignées GMTC_{LR}. Le statut de méthylation a été étudié par séquençage Sanger de l'ADN extrait des populations GMTC_{HR} et GMTC_{LR} après conversion au bisulfite.

L'analyse avec le logiciel BISMA, a montré que le statut de méthylation est plus important dans les GMTC_{LR}, et ce, que l'on considère les séquences présentant au moins un îlot CpG méthylé (16% vs 51,5%) ou les îlots CpG méthylés individuellement (1,2% vs 8,9%) (**fig 4**). Nous avons montré qu'une exposition au 5-aza (1 μ M), durant 4 jours, réduisait le taux de méthylation de 2,06 fois (51,5% à 25%) et 2,49 fois (8,9% à 3,57%) si l'on considère respectivement le nombre de séquences ou le nombre d'îlots CpG analysés (**fig 4**). Ces résultats montrent une hyper-méthylation des LTR dans les GMTC_{LR} et une absence de toxicité du traitement sur les cellules.

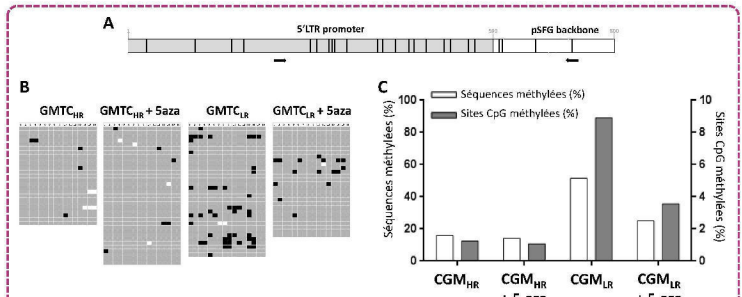


Fig 4 : Analyse de la méthylation du promoteur LTR. A : Localisation des îlots CpG et des amorces utilisées, **B :** Analyse de la méthylation avec le logiciel BISMA, les îlots CpG méthylés sont en noir, **C :** Représentation graphique du statut de méthylation du promoteur LTR.

Ainsi, nous avons montré que le traitement par un agent hypo-méthylant, 5-azacytidine, permettait de réduire la méthylation du promoteur et donc d'induire une augmentation de l'expression des transgènes. De manière intéressante, le traitement par 5-aza augmente l'expression de Δ CD19 membranaire (cytométrie de flux) et de la protéine intracellulaire iCasp9 (western Blot) (**fig 5**).

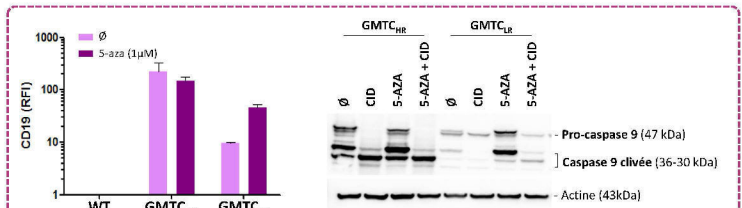


Fig 5 : Augmentation de l'expression du transgène iCasp9/ Δ CD19 par cytométrie en flux et western blot.

Sur le plan fonctionnel, l'augmentation des niveaux d'expression après déméthylation des LTR des GMTC_{LR} suffit à restaurer leur sensibilité à l'AP1903 de 24,6 fois (1,8% à 43,8%) et reste sans effet sur les GMTC_{HR} (1,05 fois : 88,1% vs 92,8%) (**fig 6**).

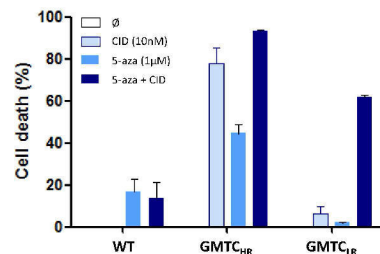


Fig 6 : Amélioration de la réponse au CID des GMTC_{LR} après traitement par l'agent déméthylant 5-aza. Analyse de mort cellulaire par marquage Annexine V - 7AAD

CONCLUSION:

Ces travaux ont montré que la méthylation du promoteur LTR d'une partie des GMTC iCasp9+/ Δ CD19+ est à l'origine d'une faible expression des transgènes et donc d'une diminution de la capacité de réponse au CID. Le traitement par un agent hypo-méthylant (5-aza) permet de restaurer la sensibilité des GMTC_{LR} au CID et d'optimiser la fonctionnalité du « système suicide iCasp9/AP1903 ». Ce traitement, compatible avec les approches d'allogreffe, pourra être évalué dans notre prochain essai clinique d'allogreffe de CSH de phase I/II : Side by Side.

Annexe V

Poster

Hypomethylating agent 5-azacytidine exposure to improve AP1903 treatment for apoptosis induction of iCasp9/ Δ CD19 gene modified T cells

Elodie Bôle-Richard, Jean-Marie Certoux, Idir Idirène, Laurent Josso, Eric Deconinck, Fabrice Larosa, Etienne Daguindau, Christophe Borg, Pierre Tiberghien, Christophe Ferrand & Marina Deschamps.

American Society of Gene & Cell Therapy (ASGT), 16th annual meeting, Salt Lake City, 15-18 mai 2013

Hypomethylating agent 5-azacytidine exposure to improve AP1903 treatment for apoptosis induction of iCasp9/ Δ CD19 gene modified T cells

Elodie Bole-Richard¹, Jean Marie Certoux¹, Idir Idirène¹, Laurent Jossot¹, Eric Deconinck², Fabrice Larosa², Etienne Daguidau², Christophe Borg¹, Pierre Tiberghien¹, Christophe Ferrand¹ & Marina Deschamps¹
¹UMR1098-EFSBFC-SFR FED 4234-Besançon - ²Hematology department - CHU Jean Minjoz, Besançon, France

Grant: EFS - APR 2013-02

BACKGROUND:

Haematopoietic transplantation may result in serious complications, notably graft versus host disease (GvHD). T-lymphocyte depletion of the bone marrow graft is able to prevent GvHD, while increasing the risk of rejection and reducing the anti-leukemic effect. An alternative issue is to use a suicide gene system that allows *in-vivo* conditional T cell depletion. Based on our experience reporting drawbacks of the suicide gene HSV-tk expressing donor T cells, we investigate the use of human derived inducible caspase 9 (iCasp9/iC9) and truncated CD19 (Δ CD19) expressing T-cell. This allows rapid apoptosis after exposure to a Chemical Inducer of Dimerization (CID; AP1903, Bellicum Pharmaceuticals).

OBJECTIVES:

As reported *in-vivo* by others, we found a drug responsiveness of some iC9/ Δ CD19+ gene modified cells (GMC) after CID *in-vitro* exposure. Such findings are also described with other suicide gene approaches (HSV-tk/GCV or CD20/Rituximab). The aims of this work were 1/ to better characterize the CID responsiveness and 2/ to evaluate a new means to improve the treatment.

RESULTS:

We generated, by retroviral transduction (SFG,iCasp9.2A, Δ CD19, Di Stasi *et al*; NEJM 2011; Fig 1), iC9/ Δ CD19+ Jurkat, CEM and HUT cell lines. Transduction efficiency was 57.7 ± 13.6 (n=3, Fig 2). After induction of apoptosis with CID, GMC were efficiently eliminated. However, we found that $1.47\% \pm 0.67\%$ (n=5) of Δ CD19+ MACS-selected escaped after CID *in-vitro* exposure (10nM, Fig 3).

Fig1: Retroviral vector, SFG,iCasp9.2A, Δ CD19

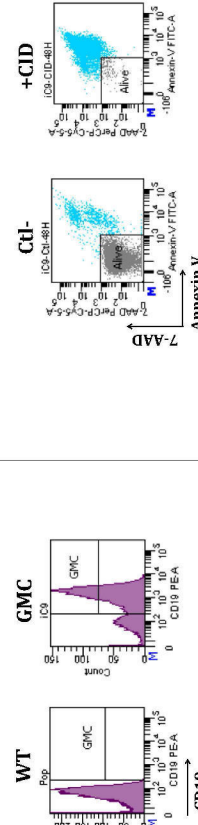


Fig2: T Cell line transduction efficiency (CEM is a representative example).

Fig3: Responsiveness of iC9/ Δ CD19+ GMC -CEM after CID *in-vitro* exposure (10nM, CEM)

GMC were serially exposed to increase the doses (0.1nM to 10nM) of CID to generate resistant cell lines (GMC_R). Drug response was assessed by 7-AAD/Annexin V staining and surviving GMC were cloned to isolate GMC_R. Compared to sensitive GMC (GMC_S), we showed that GMC_R are lower Δ CD19 expressers (10nM, MFI= 30 fold less, Fig 4).

While retroviral vector is based on 2A system, allowing stoichiometric iC9/ Δ CD19 proteins production, we hypothesize that GMC_R are also the lower iC9 expressers. This has been confirmed by western blot (WB) for both full length and cleaved iC9, Fig 5.

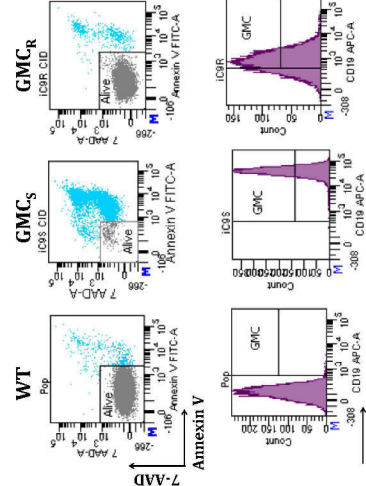


Fig 4: Correlation between drug response, assessed by 7-AAD/Annexin V staining, and Δ CD19 expression level, CEM.

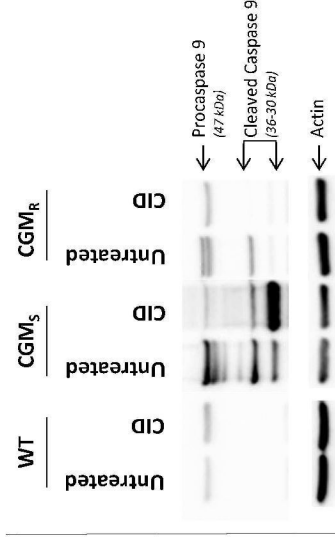


Fig 5: Western blot for both full length and cleaved iC9. Positive control was performed by actin detection on all CEM samples.

A hypomethylating agent could increase transgenes expression in order to improve iC9 GMC response. A good candidate could be the 5-aza. To assess this hypothesis, GMC_S and -GMC_R were treated 4 days with 5-aza (1 μ M).

We have shown by cytometry that 5-aza exposure of GMC_R increase the Δ CD19 expression (MFI= 5 fold more, Fig 6A). Moreover, WB analysis confirms the increase of the iC9 protein expression (Fig 6B). As expected, drug response is improved after 5-aza treatment. The percentage of CEM-GMC_R mortality induced by CID vs 5-aza+CID was 3.8% vs 62.5% respectively (Fig 6C). Stable CD4 or CD3 expression suggests that transgenes expression has been mainly targeted. These experiences were confirmed on JURKAT clone.

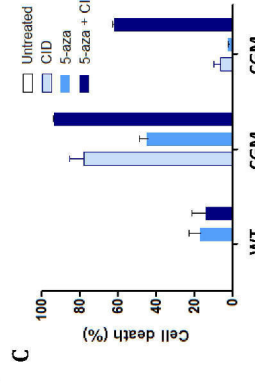
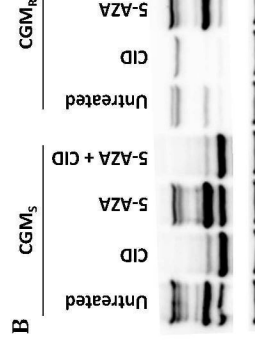
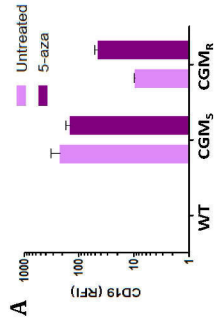


Fig 6: Hypomethylating agent 5-azacytidine exposure improve CID treatment of iCasp9/ Δ CD19 gene modified CEM cells. A: Δ CD19 expression, B: iC9 protein expression, western blot (\pm 10nM CID); and C: CID drug response (\pm 1 μ M 5-aza)

CONCLUSION:

We have generated CID resistant T cell lines and determined that low responders are iC9/ Δ CD19 low expressers. Moreover, we have shown that 5-aza treatment improves the expression of transgenes and leads to restore the CID killing. This approach can be applied in further clinical trials in order to improve killing of iC9 expressing T cells used in hematopoietic transplantation or to secure cell therapies.

Annexe VI

Communications orales

Liste des communications orales

Elodie Bôle-Richard, Jean-Marie Certoux, Idir Idirène, Marina Deschamps & Christophe Ferrand, *Développement d'une approche d'immunothérapie anti-tumorale utilisant des lymphocytes T reprogrammés avec un CAR dirigé contre un antigène du glioblastome*. Réunion annuelle de la SBB, Besançon, 10 décembre 2014.

Elodie Bôle-Richard, Jean-Marie Certoux, Idir Idirène, Marina Deschamps & Christophe Ferrand, *Ciblage de l'antigène EGFRvIII, exprimé dans les glioblastomes, par une approche d'immunothérapie anti-tumorale, utilisant des lymphocytes T génétiquement modifiés pour exprimer un récepteur antigénique chimérique (CAR)*. 15^{èmes} Journées du GPCO, Besançon, 4-5 décembre 2014.

Elodie Bôle-Richard, Jean-Marie Certoux, Idir Idirène, Eric Deconinck, Fabrice Larosa, Etienne Daguindau, Christophe Borg, Pierre Tiberghien, Christophe Ferrand, Marina Deschamps, *Développement d'outils innovants de thérapie cellulaire sécurisée*. 20^{ème} Forum des Jeunes Chercheurs, Besançon, 23-24 juin 2014.

Elodie Bôle-Richard, Jean-Marie Certoux, Idir Idirène, Laurent Josso, Eric Deconinck, Fabrice Larosa, Etienne Daguindau, Christophe Borg, Pierre Tiberghien, Christophe Ferrand, Marina Deschamps, *Hypomethylating agent 5-azacytidine exposure to improve AP1903 treatment for apoptosis induction of iCasp9/ Δ CD19 gene modified T cells*. 3^{ème} colloque inter-régional Grand-Est de recherche translationnelle en oncologie (ONCOTRANS), Reims, 27-28 juin 2013.

Annexe VII

Soutenance de thèse

Développement d'outils innovants et sécurisés de thérapie cellulaire et génique basés sur la reprogrammation de lymphocytes T dans un contexte d'immunothérapie anti-tumorale

Développement d'outils innovants et sécurisés de thérapie cellulaire et génique basés sur la reprogrammation de lymphocytes T dans un contexte d'immunothérapie anti-tumorale

Elodie BÔLE-RICHARD

Sous la direction du Dr Marina DESCHAMPS et du Dr Christophe FERRAND

UMR1098 EFS-B/FC SFR FED 4234 Besançon, France

1



Plan de la présentation

INTRODUCTION

- Immunosurveillance des tumeurs
- Stratégies d'immunothérapies

PARTIE 1 : SÉCURISATION DE LA THÉRAPIE CELLULAIRE

- Contexte
- Publication : *5-azacytidine improves iCaspase-9 suicide system*
- Protocole clinique : *Side by CIDE*
- Conclusion

PARTIE 2 : REPROGRAMMATION DES LYMPHOCYTES T PAR LES CAR

- Contexte
- Résultats
- Conclusion

PARTIE 3 : MODULATION DU MICROENVIRONNEMENT TUMORAL

- Contexte
- Résultats
- Conclusion

CONCLUSIONS & PERSPECTIVES

Cancer et immunothérapie

Selon l'OMS : (*World Cancer Report 2014*)

14 millions de nouveaux cas de cancer / an dans le monde en 2012

8,2 millions de décès par cancer par an en 2012

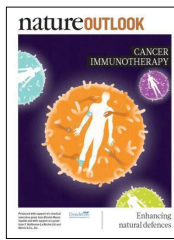
Wang et al., Immunother 2014



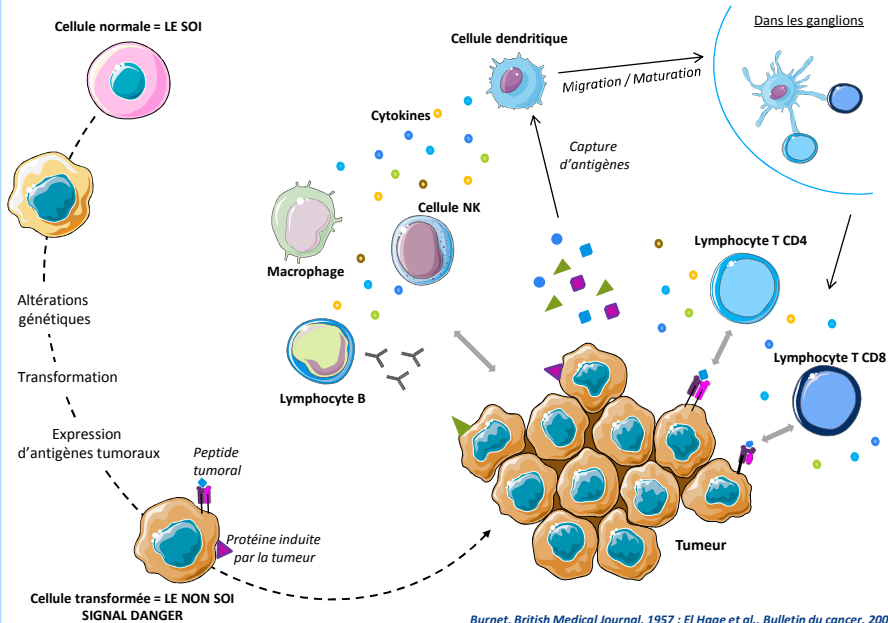
Nécessité de développer de nouvelles approches ciblées
Traitements spécifiques pour éviter les effets secondaires

Immunothérapie anti-tumorale : mobiliser le système immunitaire pour qu'il s'attaque aux cellules tumorales
avancée scientifique de l'année en 2013 selon *Science*

Couzin-Frankek et al., Science 2013

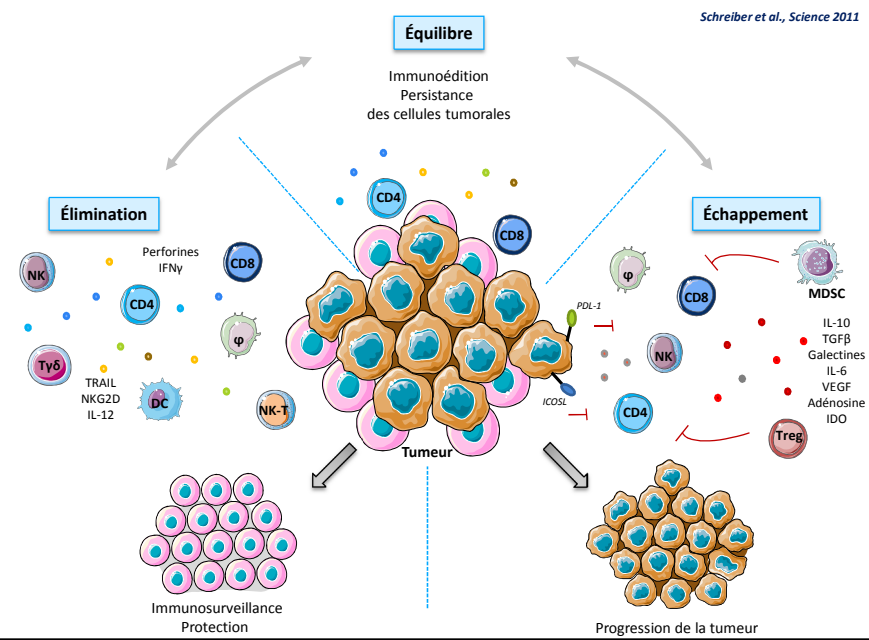


Immunosurveillance des cancers

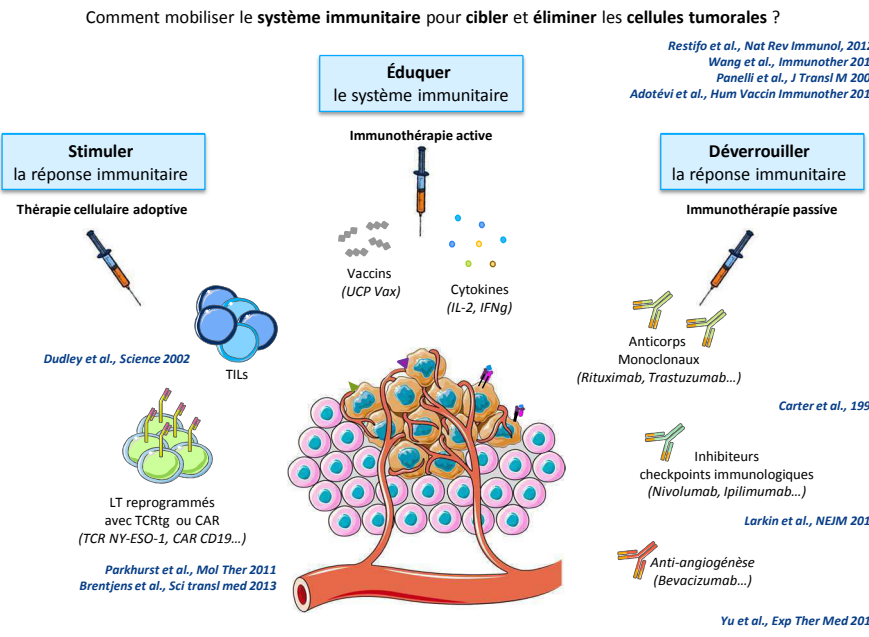


Burnet, British Medical Journal, 1957 ; El Hage et al., Bulletin du cancer, 2008

Immunosurveillance des cancers : théorie des 3E

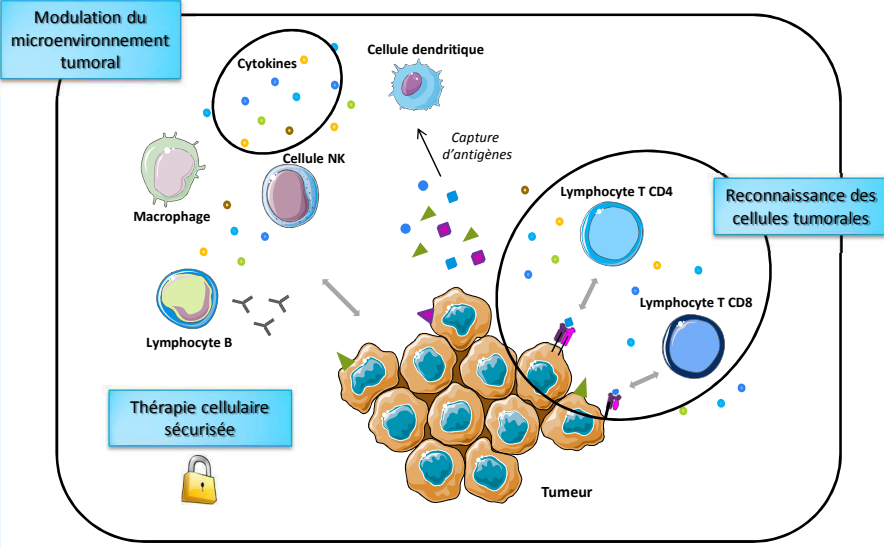


Stratégies d'immunothérapie anti-tumorale



Objectifs de la thèse

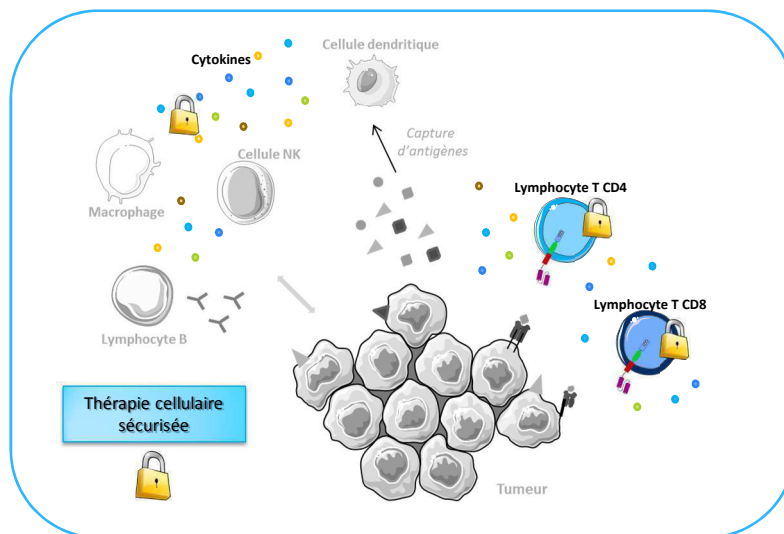
Développement et caractérisation d'outils innovants de thérapie génique
dans un contexte d'immunothérapie anti-tumorale



7

Partie 1 : Sécurisation de la thérapie cellulaire

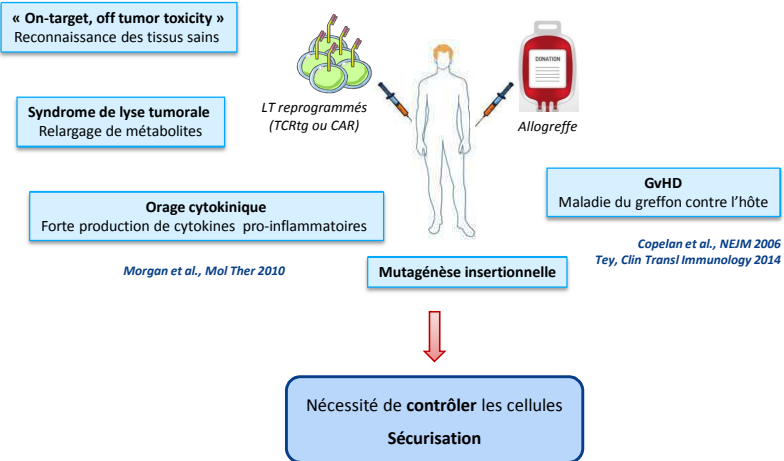
Développement et caractérisation d'outils innovants de thérapie génique
dans un contexte d'immunothérapie anti-tumorale



8

La sécurisation des thérapies cellulaires et géniques

Thérapies cellulaires adoptives = Risques et effets secondaires



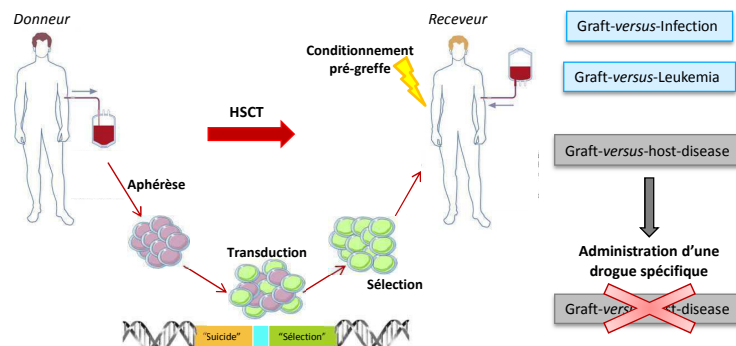
L'expression d'un « gène suicide » par les cellules génétiquement modifiées permet, en cas d'effets indésirables, une élimination conditionnelle et sélective de ces cellules grâce à l'utilisation d'un traitement ciblé.

La greffe allogénique de cellules souches hématopoïétiques (HSCT)

Une des approches d'immunothérapie adoptive la plus développée

Place essentielle en onco-hématologie

LT du donneur d'une allo-greffe $\begin{cases} \text{Avantages : médiés la GvL et contrôle des infections} \\ \text{Responsable d'une complication grave : GvHD} \end{cases}$

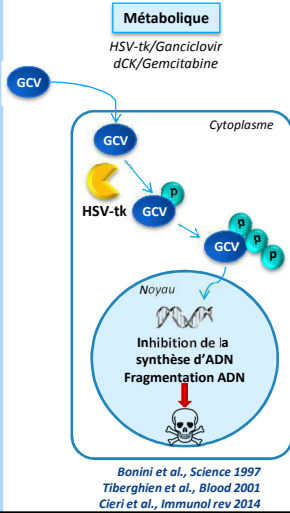


Sécurisation par transfert de gènes suicides

Le transfert de gène « suicide » est un moyen de **sécuriser la thérapie cellulaire**

Élimination spécifique des **cellules génétiquement modifiées** en cas de survenue d'**effets indésirables**

Différentes **familles de gènes suicides** en fonction de leur **mécanisme d'action** :



- Le plus évalué en clinique
- Cycle cellulaire dépendant
- Immunogénicité de la protéine HSV-tk
- Interaction avec le traitement du CMV

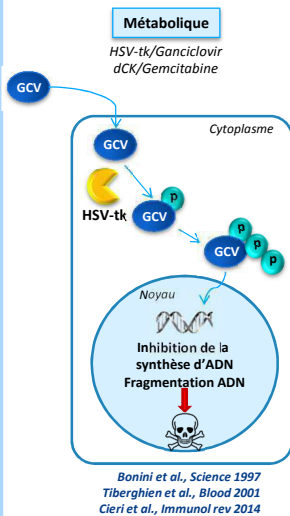
11

Sécurisation par transfert de gènes suicides

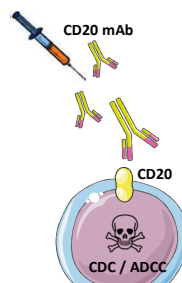
Le transfert de gène « suicide » est un moyen de **sécuriser la thérapie cellulaire**

Élimination spécifique des **cellules génétiquement modifiées** en cas de survenue d'**effets indésirables**

Différentes **familles de gènes suicides** en fonction de leur **mécanisme d'action** :



Médié par un anticorps
CD20/Rituximab
EGFR/Cetuximab



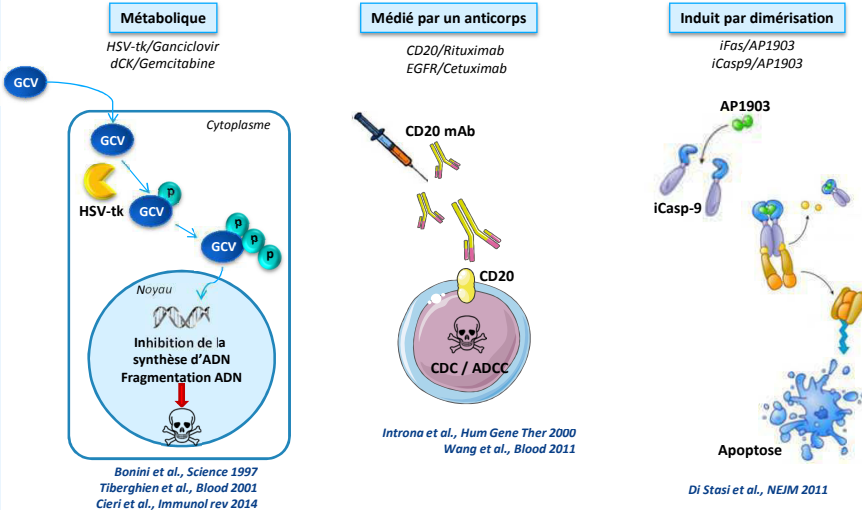
- Non immunogène
- Gène de sélection et gène suicide
- Nécessite une forte expression

*Introna et al., Hum Gene Ther 2000
Wang et al., Blood 2011*

12

Sécurisation par transfert de gènes suicides

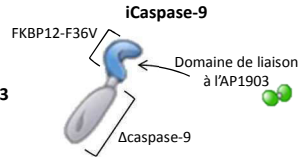
Le transfert de gène « suicide » est un moyen de **sécuriser la thérapie cellulaire**
Élimination spécifique des cellules génétiquement modifiées en cas de survenue d'effets indésirables
 Différentes familles de gènes suicides en fonction de leur mécanisme d'action :



L'apoptose inducible en thérapie adoptive

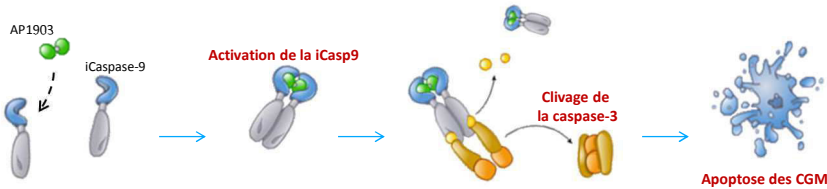
La Caspase-9 Inductible (iCasp9) :

- Molécule humaine inductible iCasp9
- Dimérisation par injection d'une molécule spécifique = AP1903
- AP1903 = CID = Chemical Inducer of Dimerization

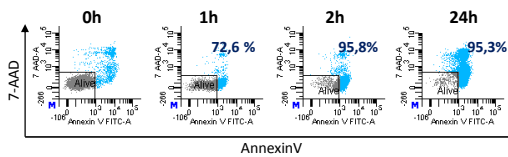


- Activation d'un phénomène physiologique : l'apoptose

Spencer et al., Science 1993
Di Stasi et al., NEJM 2011

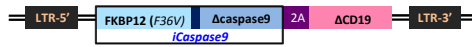


- Réponse rapide à l'AP1903



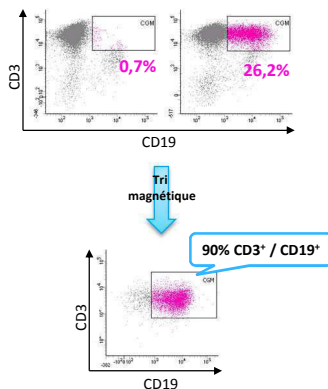
Validation de la production de cellules génétiquement modifiées (CGM) :

Transduction J2 :
3.10⁶ cell/ml
SN_{GMP}

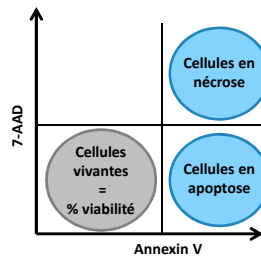


Collaborations :
Pr Brenner, Houston, USA
Bellicum Pharmaceuticals , Houston, USA

Efficacité de transduction J7 :



Étude de la mort cellulaire des CGM :

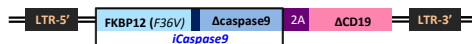


Pourcentage de mort cellulaire :

$$\left(1 - \frac{\% \text{viabilité des cellules traitées à l'AP1903}}{\% \text{viabilité des cellules non traitées}}\right) \times 100$$

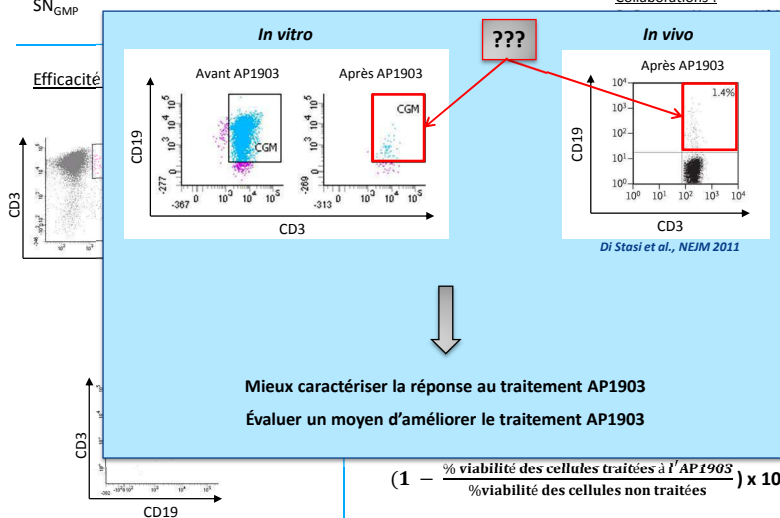
Validation de la production de cellules génétiquement modifiées (CGM) :

Transduction J2 :
3.10⁶ cell/ml
SN_{GMP}



Collaborations :
Houston, USA

Efficacité



$$\left(1 - \frac{\% \text{viabilité des cellules traitées à l'AP1903}}{\% \text{viabilité des cellules non traitées}}\right) \times 100$$

Gene
Therapy

Gene Therapy (2016), 1–9
 © 2016 Macmillan Publishers Limited All rights reserved 0969-7128/16
 www.nature.com/gt



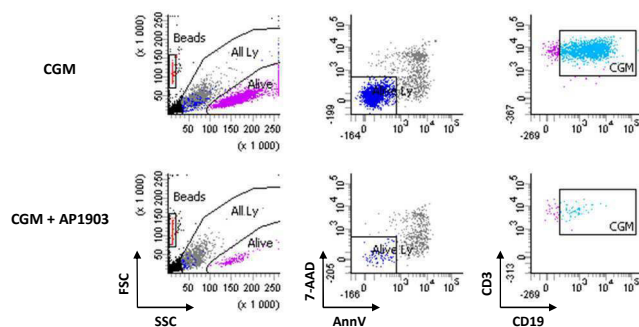
ORIGINAL ARTICLE

Exposure to hypomethylating agent, 5-azacytidine, may improve iCasp9 suicide gene therapy for treating GvHD in allografts

E Böle-Richard¹, C Gamonet¹, J-M Certoux¹, I Idirene¹, F Larosa^{1,2}, E Deconinck^{1,2}, A-M Mosseley³, P Tiberghien¹, C Borg¹, C Ferrand¹ and M Deschamps¹

Méthode : quantification de la mort cellulaire

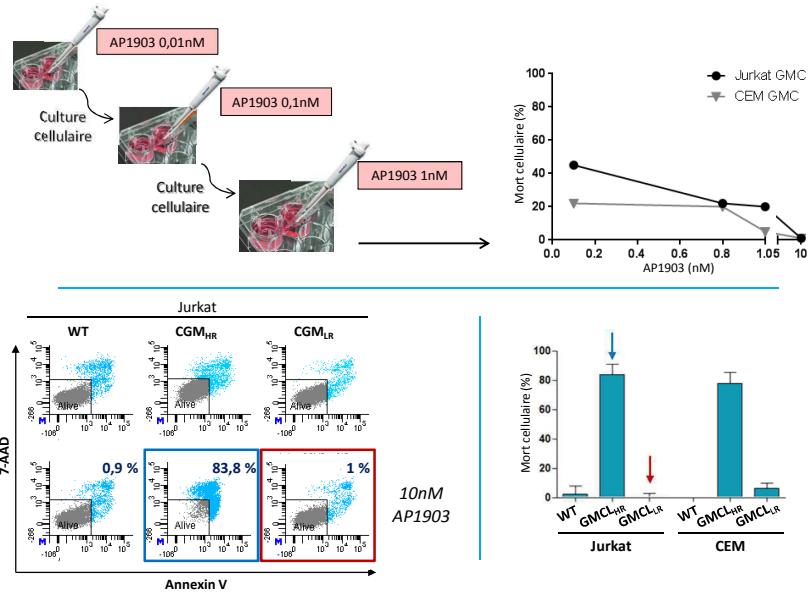
Pour mieux définir le pourcentage de mort cellulaire → BD TruCount™ tube (Becton Dickinson)



- Meilleure discrimination cellules mortes / débris cellulaires
- Meilleure appréciation du % de mort cellulaire

$$\text{Mort cellulaire} = \left(1 - \frac{\text{Nombre de cellules vivantes après traitement AP1903}}{\text{Nombre de cellules vivantes sans traitement}} \right) \times 100 \text{ pour } 10\,000 \text{ billes}$$

Établissement de lignées T faibles répondeuses à l'AP1903

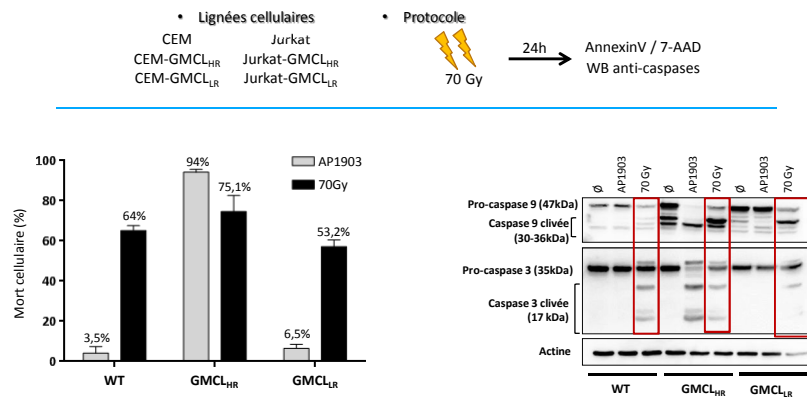


Exemple représentatif, n=3

Bôle-Richard et al., Gene Therapy 2016

La faible réponse à l'AP1903 est directement liée à la fonctionnalité de la iCasp9

Réponse incomplète à l'AP1903 \rightarrow liée à la Caspase 9 inducible ?
 \rightarrow liée à une anomalie de l'apoptose ?



\rightarrow GMCL_{LR} répondent faiblement à l'AP1903 mais ne présentent pas d'anomalie de l'apoptose

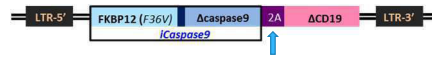
Exemple représentatif, n=3

Bôle-Richard et al., Gene Therapy 2016

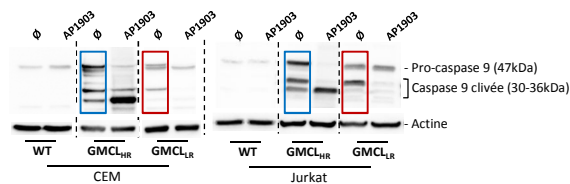
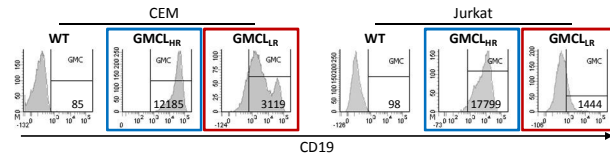
Réponse partielle à l'AP1903 = faible expression du transgène iCasp9/ Δ CD19

Pas d'anomalie au niveau de l'apoptose

La réponse partielle est liée à l'expression du transgène, qu'en est-il de son expression ?



Système 2A = expression stoichiométrique des protéines iC9 et Δ CD19



Exemple représentatif, n=3

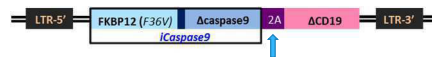
Bôle-Richard et al., Gene Therapy 2016

21

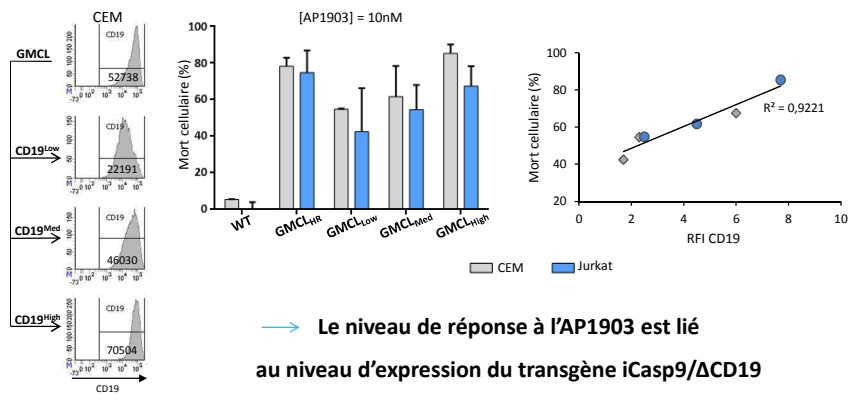
Réponse partielle à l'AP1903 = faible expression du transgène iCasp9/ Δ CD19

Pas d'anomalie au niveau de l'apoptose

La réponse partielle est liée à l'expression du transgène, qu'en est-il de son expression ?



Système 2A = expression stoichiométrique des protéines iC9 et Δ CD19



→ Le niveau de réponse à l'AP1903 est lié au niveau d'expression du transgène iCasp9/ Δ CD19

Exemple représentatif, n=3

Bôle-Richard et al., Gene Therapy 2016

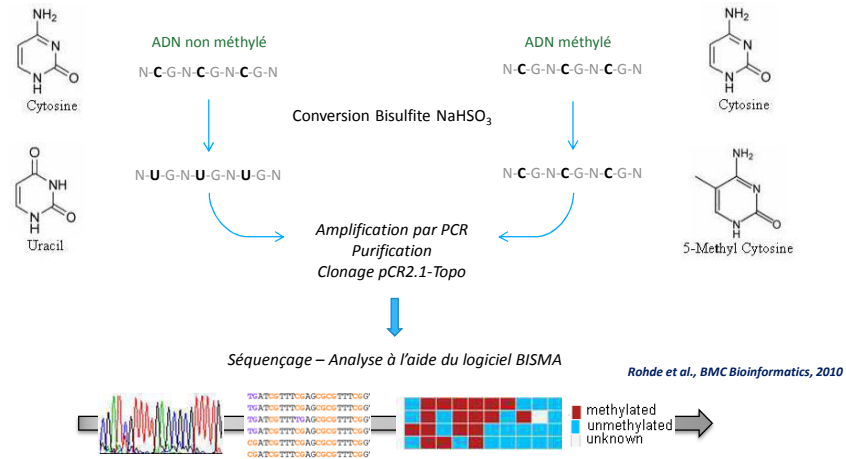
22

Étude de la méthylation de l'ADN

Thérapie génique : mécanisme de défense qui diminue la transcription du transgène

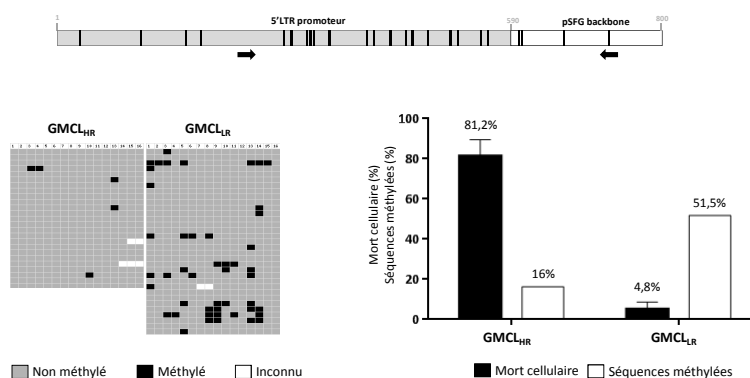
Méthylation de l'ADN au niveau des cytosines des îlots CpG

Conduit à l'extinction du gène par remodelage de la chromatine



La faible expression du transgène iCasp9/ Δ CD19 est liée à une méthylation du promoteur LTR

Analyse du statut de méthylation de 16 îlots CpG sur les 20 présents sur le promoteur LTR



➔ Plus fort statut de méthylation dans les GMCL_R que dans les GMCL_{HR}

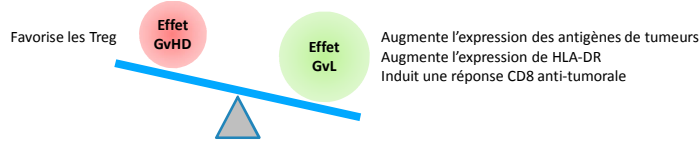
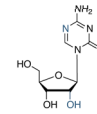
Le fort pourcentage de méthylation est corrélé à une faible mortalité des cellules

Déméthylation de l'ADN par le 5-azacytidine

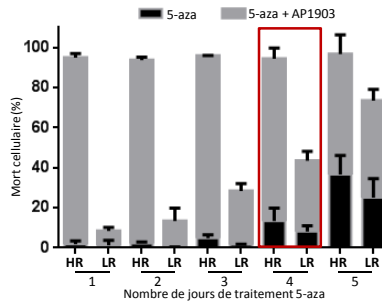
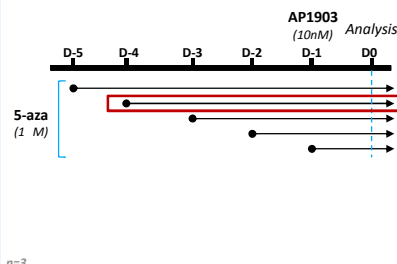
Agent hypométylant

Conduit à l'inhibition des DNA methyltransferase

Utilisation en clinique dans le traitement des syndromes myélodysplasiques et des LAM



Jabbour et al., Cancer 2009 ; Choi et al., Blood 2010 ; De Lima et al., Cancer 2010 ; Goodyear et al., Blood 2012

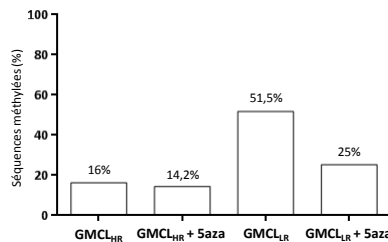
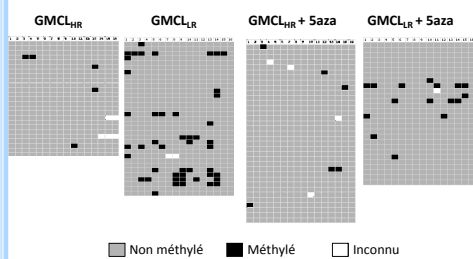
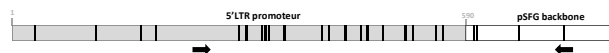


n=3

Bôle-Richard et al., Gene Therapy 2016

La faible expression du transgène iCasp9/ΔCD19 est liée à une méthylation du promoteur LTR

Analyse du statut de méthylation de 16 îlots CpG sur les 20 présents sur le promoteur LTR

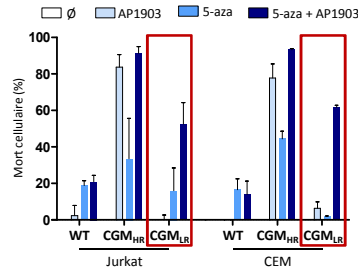


→ Le 5-aza permet une déméthylation du transgène iCasp9/ΔCD19

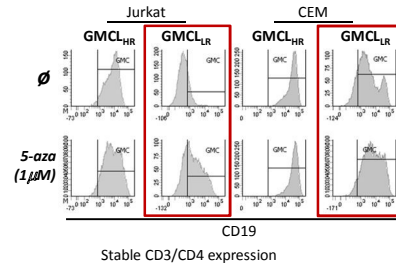
Bôle-Richard et al., Gene Therapy 2016

Amélioration du traitement AP1903 par un agent hypométhylant

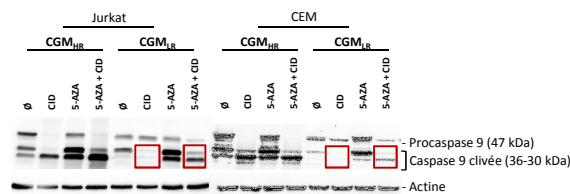
Mort cellulaire :



Expression du CD19 :



Expression de la iCaspase 9 :



→ Le 5-aza augmente l'expression du transgène iCasp9/ Δ CD19

Bôle-Richard et al., Gene Therapy 2016

27

Le 5-aza : un moyen d'amélioration du système suicide iCasp9

Conclusion et perspectives

- ✓ Lignées faibles répondeuses à l'AP1903 = faible expression du transgène iCasp9/ Δ CD19
- ✓ Mise en évidence d'une méthylation du promoteur LTR du transgène iCasp9/ Δ CD19
- ✓ 5-aza augmente l'expression du transgène iCasp9/ Δ CD19
- ✓ 5-aza permet de restaurer la réponse à l'AP1903

Gene
Therapy

ORIGINAL ARTICLE

Exposure to hypomethylating agent, 5-azacytidine, may improve iCasp9 suicide gene therapy for treating GvHD in allografts

E Bôle-Richard¹, C Gamonet¹, J-M Certoux¹, I Idirene¹, F Larosa^{1,2}, E Deconinck^{1,2}, A-M Mosseley³, P Tiberghien¹, C Borg¹, C Ferrand¹ and M Deschamps¹

Bôle-Richard et al., Gene Therapy 2016

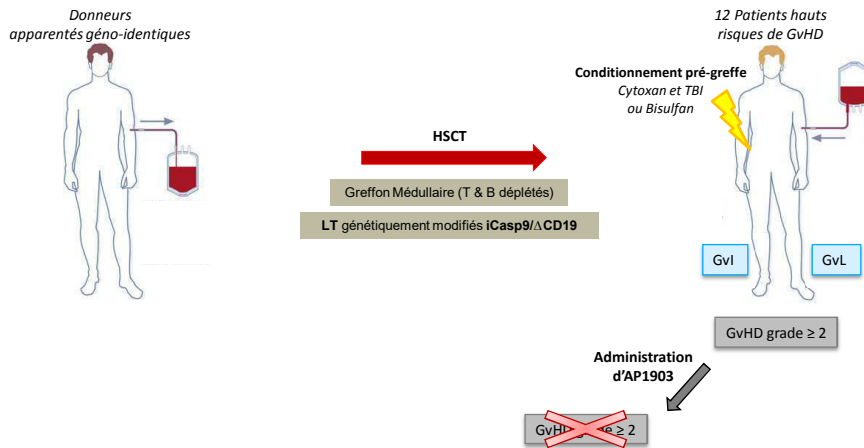
28

Recherche biomédicale : Étude clinique Side by CIDE

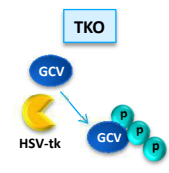
Sicuide T cell gene therapy by using a Chemical Inducer of Dimerization of iCaspase-9

Utilisation de **LT génétiquement modifiés** exprimant le **gène inductible de la caspase-9 humaine** et le gène de sélection **ΔCD19** dans la **greffe hématopoïétique allogénique** : étude de **phase I**

Numéro EudraCT : 2013-003154-24

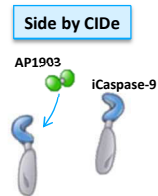


Étude clinique Side by CIDE



Tibberghien et al., Blood 2001

VS



*Di Stasi et al., NEJM 2011
Zhou et al., Blood 2014*

	TKO (1996-1999)	Side by CIDE (2016)
Donneurs apparentés	Donneurs apparentés génoïdentiques	Donneurs apparentés génoïdentiques
Système suicide	HSV-tk/Ganciclovir	iCasp9/AP1903
Vecteur rétroviral	G1 Tk1SvNa HS-tk wt + NeoR	SFG-iCasp9-2A-ΔCD19
Activation des LT	OKT3 + IL-2	CD3/CD28 + IL-2
Sélection des CGM	Culture en G418	Tri immuno-magnétique ΔCD19
Temps de culture	12 jours	9 jours
Préparation de la moelle	Sélection positive CD34+	Déplétion CD3+/CD19+
Conditionnement pré-greffe	Thiotepa, Cytoxin et TBI	Cytoxin et TBI ou Bisulfan
Dose de CGM administrée / kg	2.10 ⁵ (n=5), 6.10 ⁵ (n=5), 2.10 ⁶ (n=5)	2.10 ⁶ (n=3), 5.10 ⁶ (n=3), 10.10 ⁶ (n=6)
Prophylaxie post greffe	Ciclosporine	Pas de prophylaxie

Mort cellulaire rapide

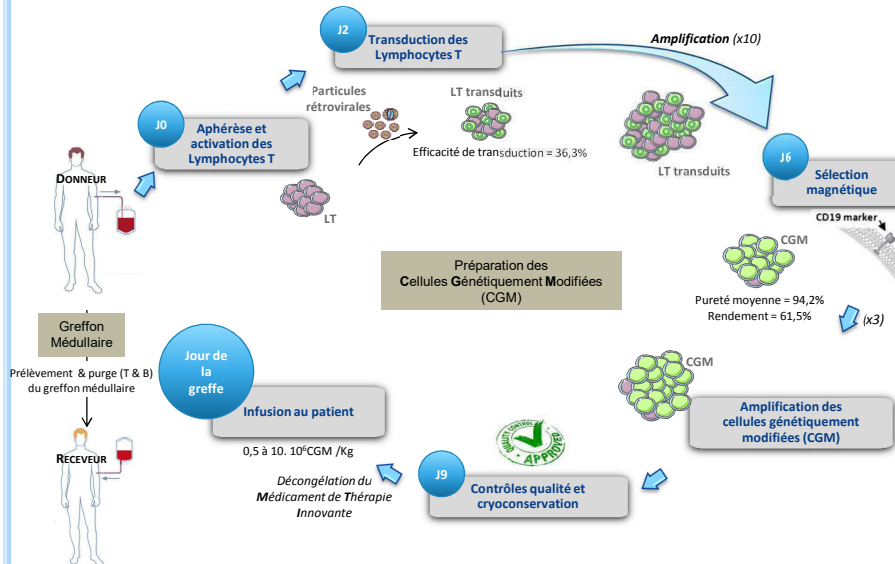
↘ **Immunogénicité**

↗ **Amélioration des fonctions immunes des CGM**

↗ **Confort du patient**

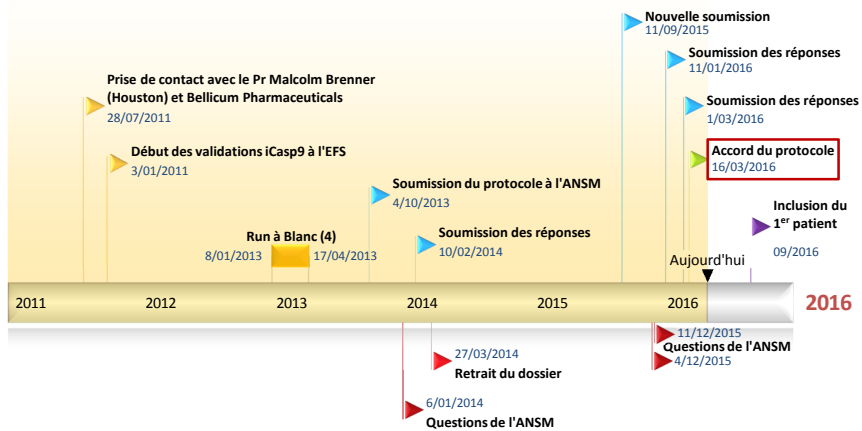
Recherche biomédicale : Étude clinique Side by CIDE

Production d'un Médicament de Thérapie Innovante régi par le règlement européen n°1394/2007
Conditions Bonnes Pratiques de Fabrication



31

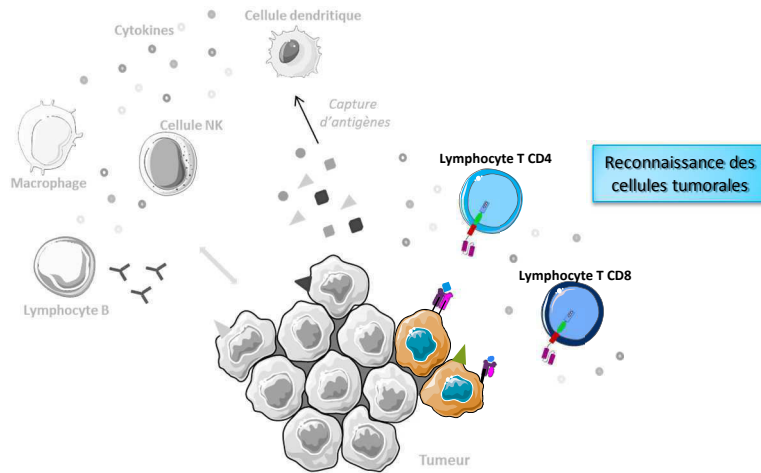
Recherche biomédicale : Étude clinique Side by CIDE



32

Partie 2 : Reprogrammation des lymphocytes T

Développement et caractérisation d'outils innovants de thérapie génique dans un contexte d'immunothérapie anti-tumorale

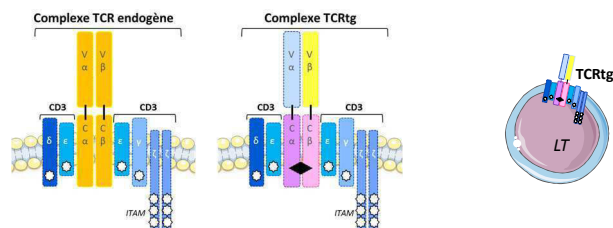


33

Reprogrammation des lymphocytes T

Moyen d'obtention de lymphocytes T génétiquement modifiés :

→ TCR transgénique (TCRtg) : Identification et clonage des chaînes α et β d'un TCR spécifique d'un antigène tumoral



→ CAR (ou T-body) : Récepteur chimérique à l'antigène



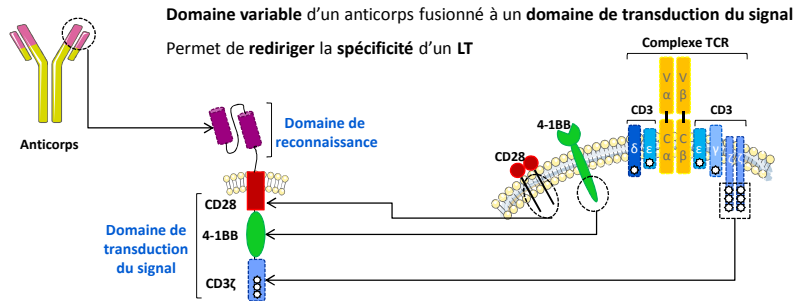
Rosenberg and Restifo, Cancer Immunol Immunother 2015

34

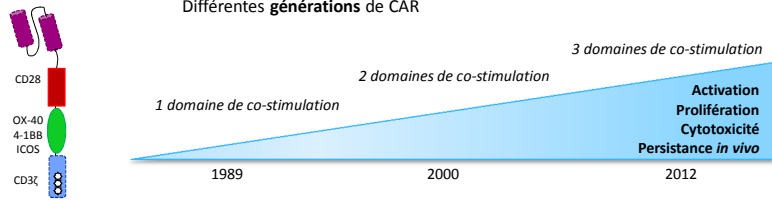
Développement de lymphocytes T génétiquement modifiés avec un CAR

Moyen d'obtention de lymphocytes T génétiquement modifiés :

→ CAR (ou T-body) : Récepteur chimérique à l'antigène / 1 seule chaîne protéique

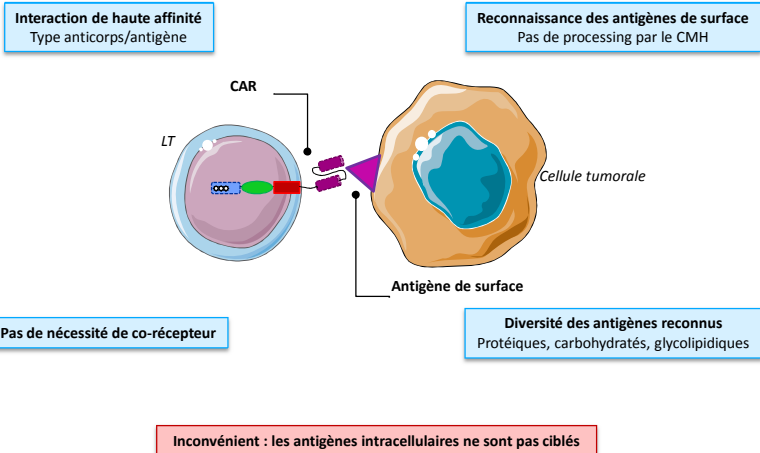


Différentes générations de CAR



Ramos and Dotti, Expert Opi 2011 ; Sadelain et al., Cancer Discov 2013

Lymphocytes T génétiquement modifiés avec un CAR : avantages/inconvénients

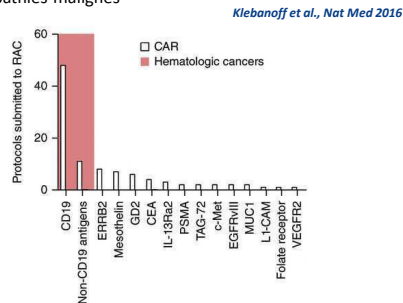
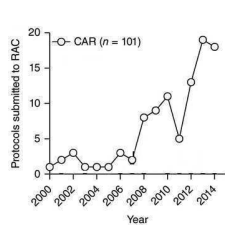


Restifo, Nat Rev Immuno 2012 ; Rosenberg and Restifo, Cancer Immunol Immunother 2015

Les lymphocytes T génétiquement modifiés avec un CAR en clinique

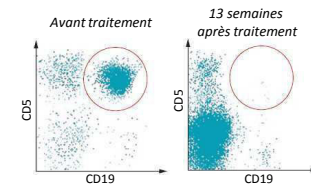
Plus de 100 essais cliniques basés sur l'utilisation de LT CAR+ recensés (clinicaltrials.gov)

Pathologies ciblées variées : 50% des CAR ciblent des hémopathies malignes



Résultats prometteurs dans les hémopathies malignes

Patients	Résultats (rémission complète)	Référence
5 adultes	100%	<i>Brentjens et al., Sci Trans Med 2013</i>
2 enfants	100%	<i>Grupp et al., NEJM 2013</i>
16 adultes	88%	<i>Davila et al., Sci Trans Med 2014</i>
20 enfants	70%	<i>Lee et al., Lancet 2015</i>
25 enfants	90%	<i>Maude et al., NEJM 2014</i>
5 adultes	100%	<i>Maude et al., NEJM 2014</i>



Kochenderfer and Rosenberg, Nat Rev Clinical Oncology 2013
Qasim et al., ASH 2015

Développement de l'outil en appui sur le modèle tumoral du glioblastome

Glioblastome : tumeur du système nerveux central

La plus fréquente, la plus agressive (médiane de survie < 2 ans)

Traitements : non satisfaisants, nombreux effets secondaires

30 à 53% des glioblastomes présentent un récepteur à l'EGF muté : **EGFRvIII**

Li et al., Neuro-Oncology 2008



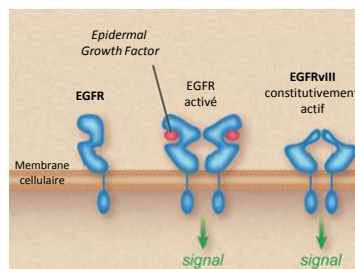
EGFRvIII : Délétion des exons 2-7

Yamazaki et al., Jpn J Cancer Res 1990

Perte du domaine de liaison de l'EGF

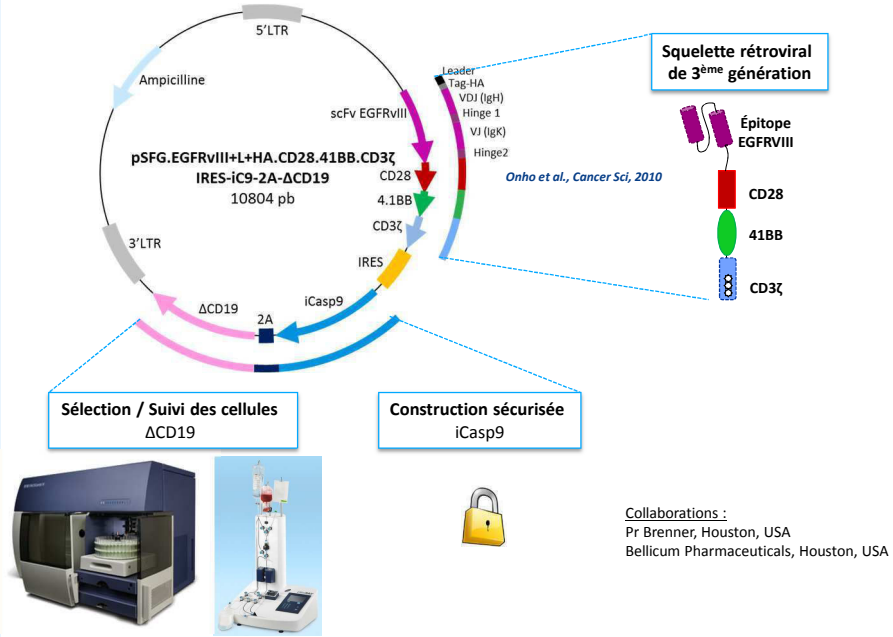
Activation constitutive du récepteur : pouvoir carcinogène (augmentation de la prolifération)

Chu et al., Biochemical Journal 1997
Lal et al., Cancer Res 2002

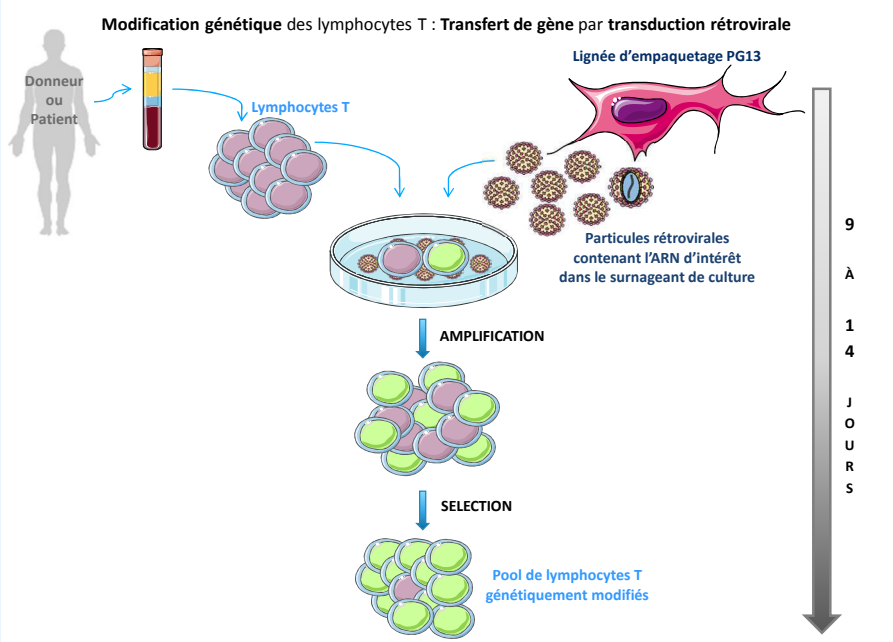


→ Intérêt du développement d'un CAR EGFRvIII

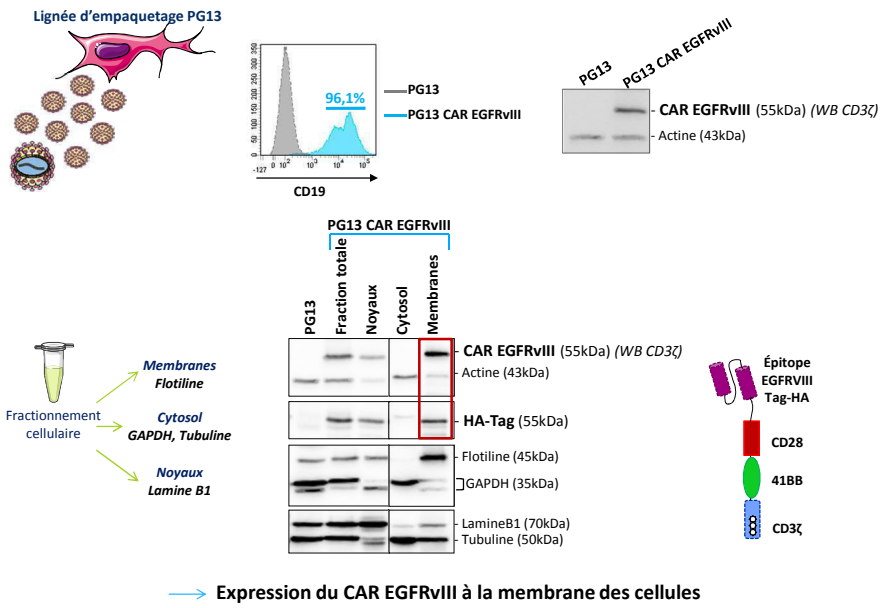
Développement d'une stratégie d'immunothérapie : CAR EGFRvIII



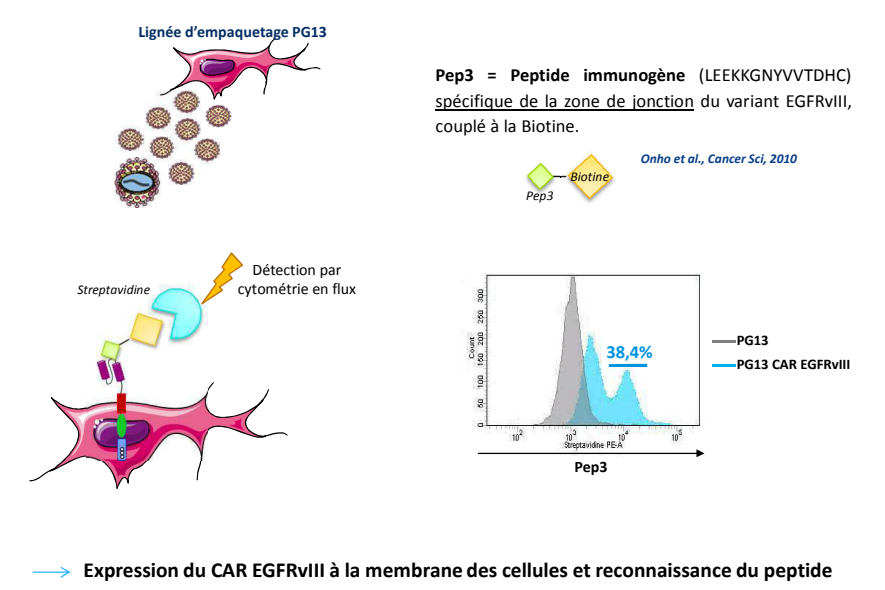
Reprogrammation des lymphocytes T



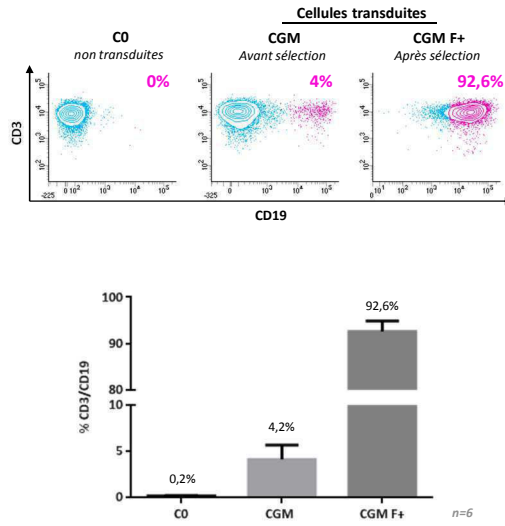
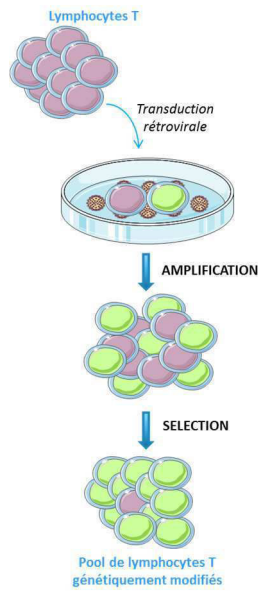
Établissement et caractérisation de la lignée d'emballage



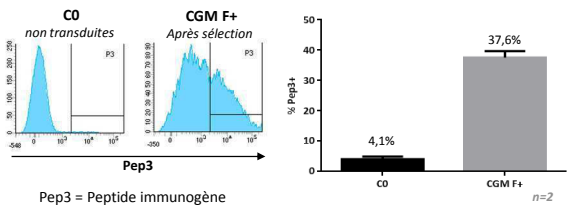
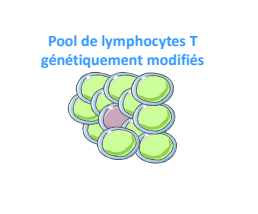
Établissement et caractérisation de la lignée d'emballage



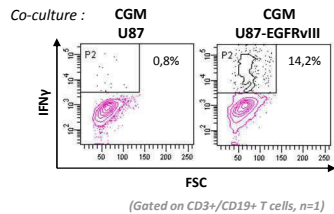
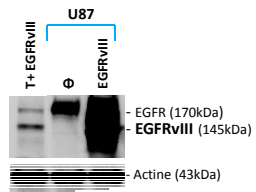
Obtention de lymphocytes T génétiquement modifiés



Fonctionnalité du CAR EGFRvIII



Lignée U87 = lignée de glioblastome
 Collaboration : Dr Furnari, La Jolla, USA



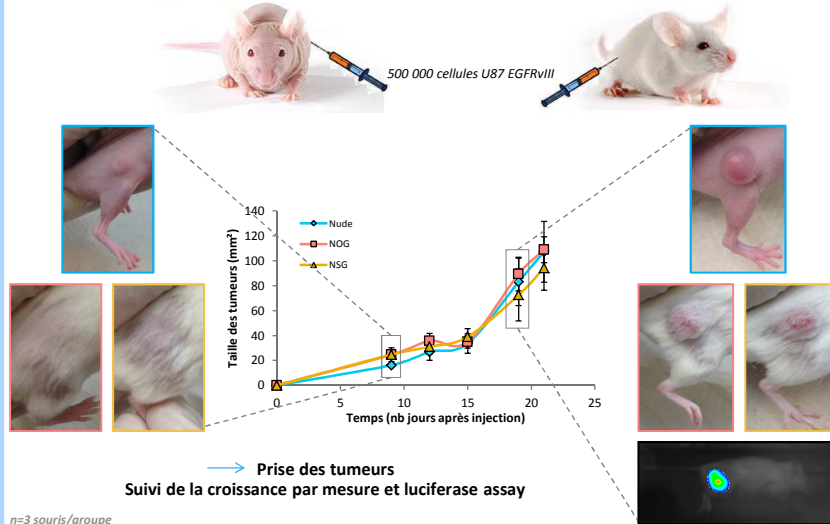
→ Reconnaissance de l'antigène, transmission du signal et activation lymphocytaire

Fonctionnalité du CAR EGFRvIII : Mise en place d'un modèle murin

Modèles murins de souris immunodéficientes

Souris **Nude**
→ Absence de thymus, pas de LT

Souris **NSG** et souris **NOG**
→ Dépourvues de cellules T, B, NK

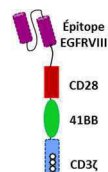


45

Développement d'une stratégie d'immunothérapie : CAR EGFRvIII

Conclusions et perspectives

✓ Validation d'un outil de thérapie cellulaire : développement d'un CAR EGFRvIII



- Expression à la membrane des cellules
- Reconnaissance de la cible
- Transmission du signal
- Activation des lymphocytes

✓ Perspectives :

Consolider la démonstration de la **fonctionnalité *in vitro*** (*IFN γ* , *TNF α* , *CD107*...)

Validation dans un **modèle murin** (*Protocole d'injection en intracrânien*)

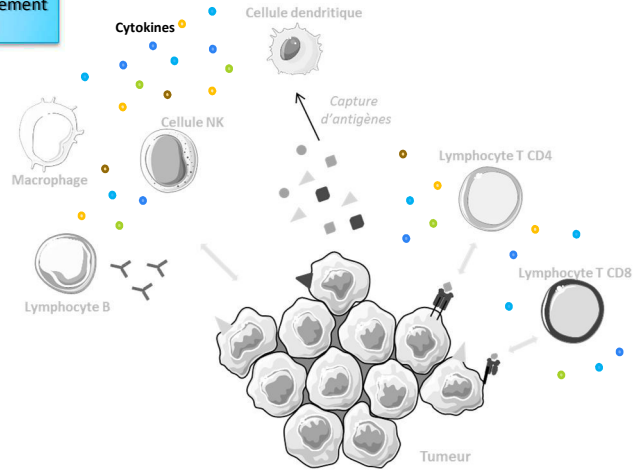
Combinaison avec une construction de **modulation du microenvironnement**
(*Sécrétion conditionnelle d'IL-12*)

46

Partie 3 : Modulation du microenvironnement tumoral

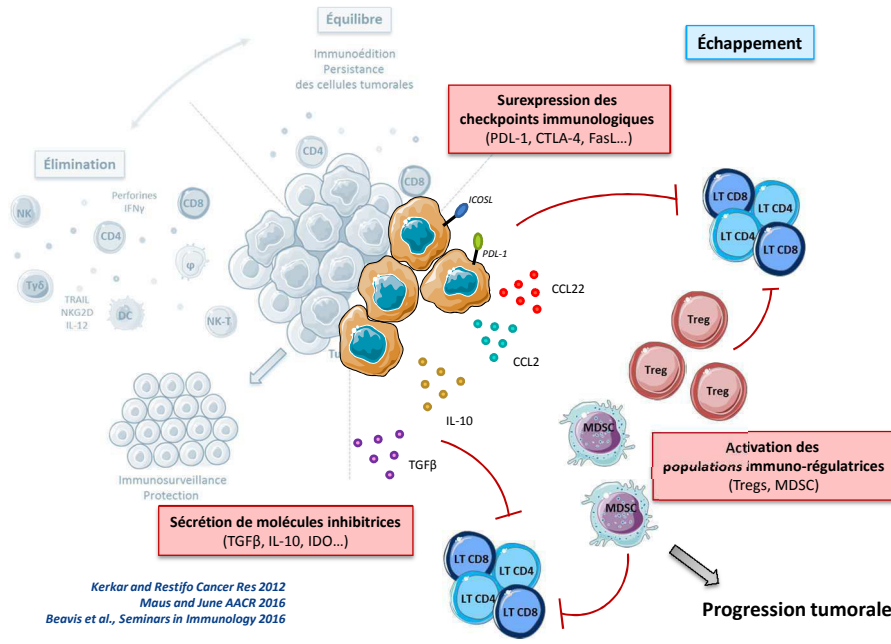
Développement et caractérisation d'outils innovants de thérapie génique dans un contexte d'immunothérapie anti-tumorale

Modulation du microenvironnement tumoral



47

Immunosurveillance des cancers



48

MODULATION IL-12 CONTEXTE

L'interleukine-12, acteur de la modulation du microenvironnement tumoral

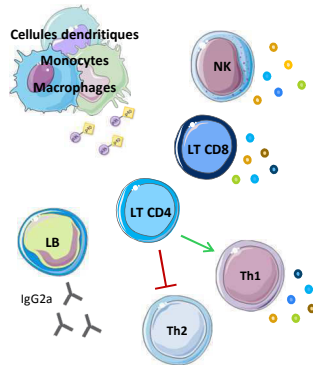
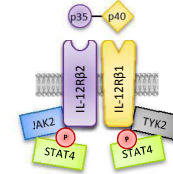
Cytokine de type I



Lien entre **immunité innée** et **immunité adaptative**

Augmentation de la **production d'IFN γ , granzyme et perforine** par les lymphocytes T et les cellules NK

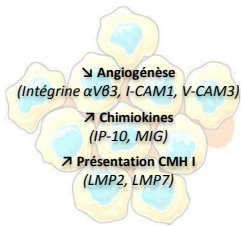
Stimulation de la **croissance** et de la **cytotoxicité** des NK, T CD4 et CD8



Cytotoxicité
Prolifération



Propriétés anti-tumorales



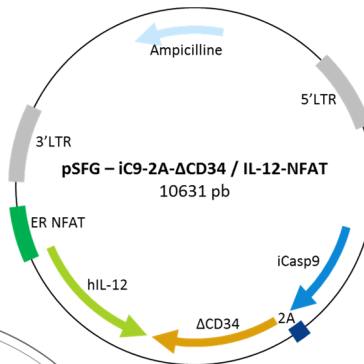
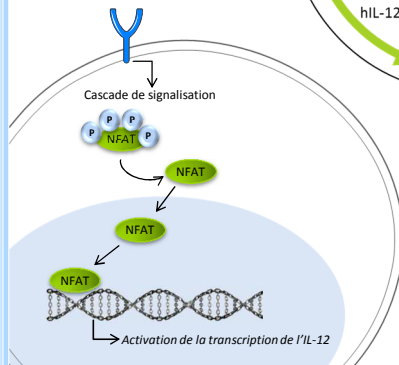
Administration IL-12 limitée par sa **toxicité**

Otani et al., Cell Immunol 1999
Parihar et al., J Clin Invest 2002
Trinchieri, Nat Rev Immunol 2003
Zhang et al., Mol Ther 2011
Lasek et al., Cancer Immunol Immunother 2014

Stratégie pour délivrer l'IL-12 au niveau de la tumeur de façon contrôlée

Zhang et al., J Immunother 2012

Promoteur conditionnel
Activation du LT
Sécrétion d'IL-12



Construction sécurisée
iCasp9

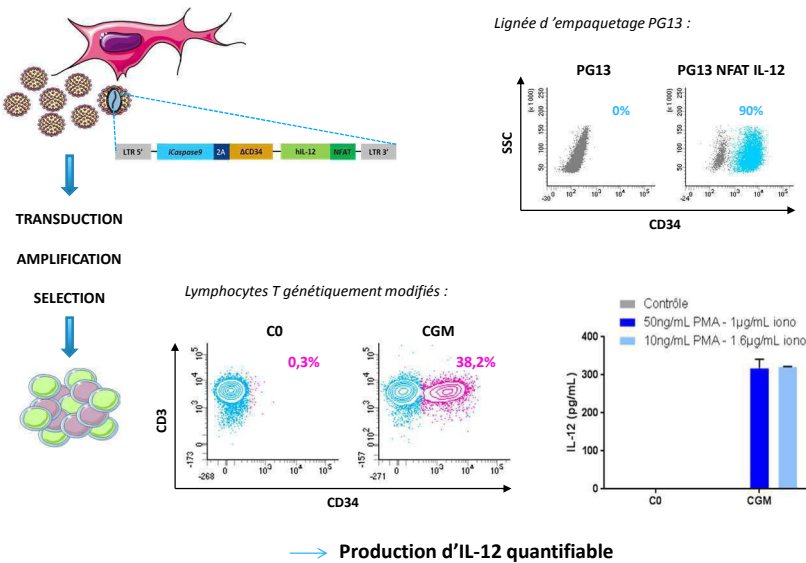


Suivi des cellules
ΔCD34



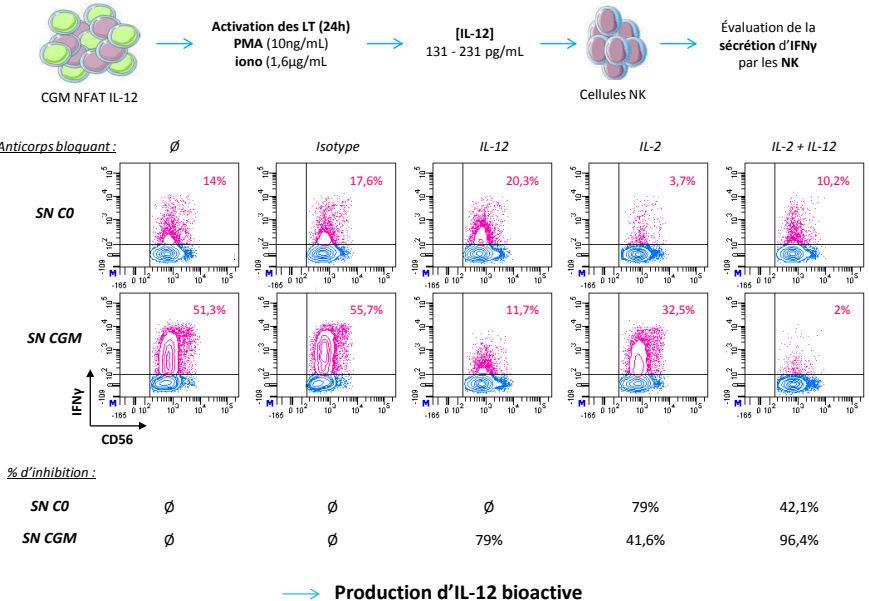
Collaborations :
Pr Brenner, Houston, USA
Bellicum Pharmaceuticals, Houston, USA
Pr Morgan, Bethesda, USA

Modulation du microenvironnement par l'IL-12



Exemple représentatif, n=4

Analyse de la bioactivité de l'IL-12

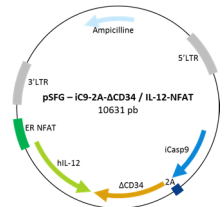


Exemple représentatif, n=4

Modulation du microenvironnement par l'IL-12

Conclusions et perspectives

- ✓ Validation d'un outil de thérapie cellulaire : modulation du microenvironnement tumoral



- Construction rétrovirale
- Sécrétion conditionnelle d'IL12
- Activation des cellules de l'immunité

- ✓ Perspectives :

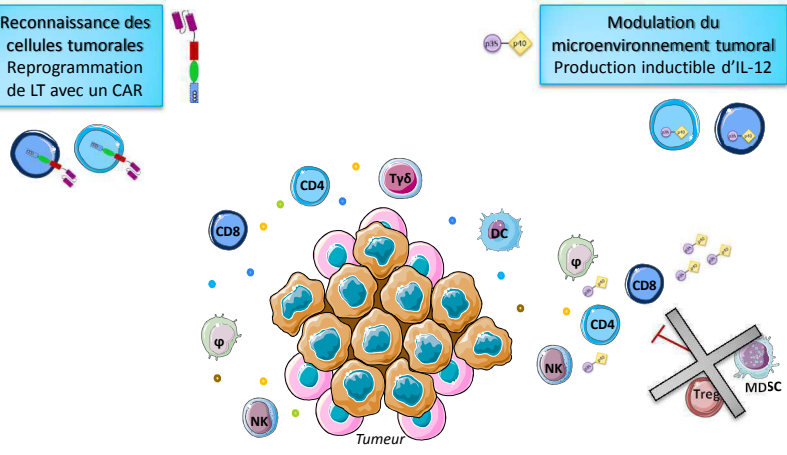
Application dans d'autres projets en cours (CAR, TILs)

Adaptation à d'autres molécules ou cytokines

Conclusion générale

Reconnaissance des cellules tumorales
Reprogrammation de LT avec un CAR

Modulation du microenvironnement tumoral
Production inducible d'IL-12



- | | |
|---|--|
| <ul style="list-style-type: none"> • Mise en place d'outils de thérapie cellulaire • Poursuivre la validation fonctionnelle • Adaptation à d'autres antigènes au laboratoire | <ul style="list-style-type: none"> • Mise en place d'outils de thérapie cellulaire • Outil prêt à être utilisé • Transduction de TILs |
|---|--|

Conclusion générale

Reconnaissance des cellules tumorales
Reprogrammation de LT avec un CAR



Modulation du microenvironnement tumoral
Production inducible d'IL-12

Thérapie cellulaire sécurisée
Gène suicide de la iCasp9

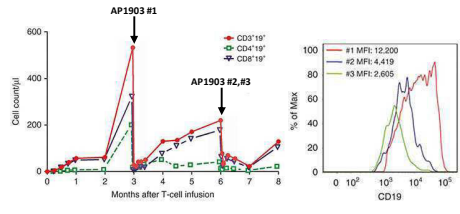
- Système suicide rapide et efficace
- 5-aza augmente l'expression du transgène
- 5-aza permet de restaurer la réponse à l'AP1903 en cas de faible réponse

- Mise en place d'outils de thérapie cellulaire
- Poursuivre la validation fonctionnelle
- Adaptation à d'autres antigènes au laboratoire
- Mise en place d'outils de thérapie cellulaire
- Outil prêt à être utilisé
- Transduction de TILs

Perspectives

- 
Combinaison 5-aza +/- AP1903 à valider sur des **LT primaires** et dans un **modèle murin**
 - Modèle murin en cours de développement
 - Pas de réponse partielle observée sur les LT primaires (activation)
 - Monitoring des patients (Protocole Side by Side)
- 
Cas d'un patient (Protocole DOTTI, NCT01494103) *Zhou et al., Mol Ther 2016*

Garçon de 8 ans
1.10⁵ cellules T iC9/kg
GvHD à 3 mois traitée par AP1903



- Différents **mécanismes** responsables de la **résistance à l'AP1903** :
- > Site d'intégration du transgène
 - > Niveau d'activation des cellules
 - > Méthylation du promoteur
 - > Expression constitutive de molécules anti-apoptotiques

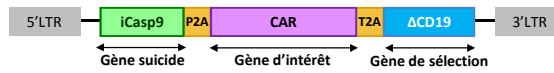
Perspectives



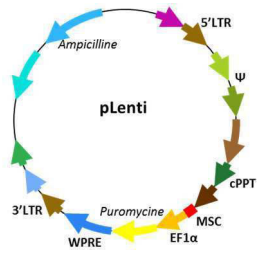
□ Fonctionnalité de la iCasp9

- Vecteurs rétroviraux de grande taille (> 10kb) / Faible expression des transgènes
- Nouveau design des vecteurs : Gène suicide en 5'

Budde et al., PloS one 2013 ; Valton et al., Mol Ther 2015



- Utilisation de lentivirus

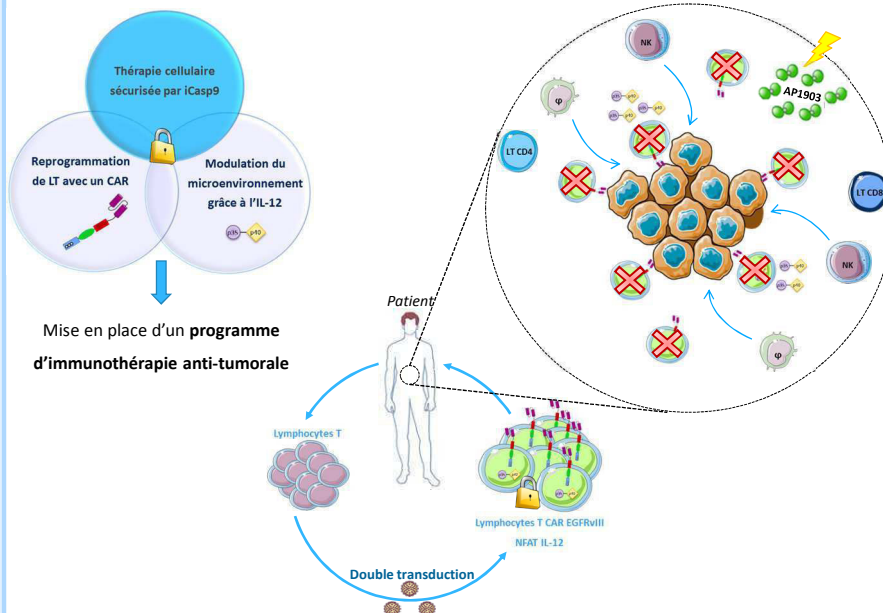


- > Meilleure expression du transgène
- > Meilleur transport du transgène dans le noyau pour intégration
- > Risque de mutagenèse insertionnelle plus faible

57

PERSPECTIVES

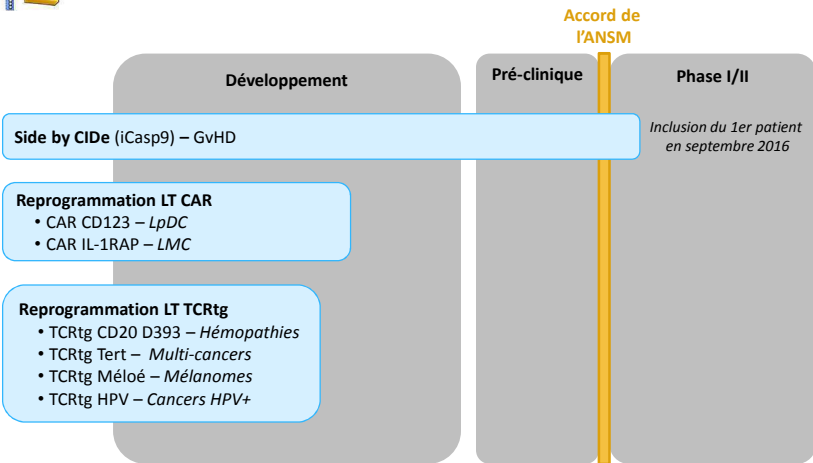
Perspectives



58

PERSPECTIVES

Projets en cours au sein de l'UMR1098



Groupe TRANSFERT / UMR1098

Dr Marina DESCHAMPS
Dr Christophe FERRAND
Jean-Marie CERTOUX
Idir IDIRENE

Et l'ensemble de l'équipe TRANSFERT et du groupe de travail MTI

UMR1098

Pr Christophe BORG
Pr Olivier ADOTEVI
Pr Philippe SAAS

Dr Clémentine GAMONET (Allez la France !)
Dr Jean-René PALLANDRE
Dr Francis BONNEFOY

Et l'ensemble des équipes ATI & TIM-C de l'UMR1098

**Merci à vous
pour votre attention**

Collaborations

Pr Malcolm BRENNER
Bellicum Pharmaceuticals
Dr Franck FURNARI
Pr Richard MORGAN
Dr Éric ROBINET

Membres du jury

Pr Danièle BENSOUSSAN
Dr Els VERHOYEN
Dr Bruno LIOURE

Famille et amis

**Toutes les personnes qui
m'ont entourée tout au
long de ces années...**

