



**HAL**  
open science

# Ciblage de la cellule souche leucémique exprimant la protéine IL-1RAP : Approche d'immunothérapie anti-tumorale utilisant des lymphocytes T génétiquement modifiés pour exprimer un récepteur chimérique à l'antigène(CAR)

Walid Warda

## ► To cite this version:

Walid Warda. Ciblage de la cellule souche leucémique exprimant la protéine IL-1RAP : Approche d'immunothérapie anti-tumorale utilisant des lymphocytes T génétiquement modifiés pour exprimer un récepteur chimérique à l'antigène(CAR). Cancer. Université Bourgogne Franche-Comté; Université Libanaise, 2018. Français. NNT : 2018UBFCE002 . tel-02000943

**HAL Id: tel-02000943**

**<https://theses.hal.science/tel-02000943>**

Submitted on 1 Feb 2019

**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.

**THESE EN COTUTELLE**

Présentée pour obtenir le grade de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE BOURGOGNE/FRANCHE-COMTE  
ET DE L'UNIVERSITE LIBANAISE**

Spécialité : Médecine, cancérologie, génétique, hématologie, immunologie

par

**WARDA Walid**

**Ciblage de la cellule souche leucémique exprimant la protéine IL-1RAP  
Approche d'immunothérapie anti-tumorale  
utilisant des lymphocytes T génétiquement modifiés  
pour exprimer un récepteur chimérique à l'antigène (CAR)**

Soutenue le **24 Janvier 2018** devant le jury composé de :

Professeur **Ibrahim YAKOUB-AGHA**, CHRU Hôpital Huriez, Lille, France.

**Président**

Professeur **Stéphane DEPIL**, Université de Claude Bernard, Lyon 1, France.

**Rapporteur**

Professeur **Rihab NASR**, Université Américaine à Beyrouth, Liban.

**Rapporteur**

Docteur **Delphine REA**, Hôpital Saint Louis, Paris, France.

**Examineur**

Docteur **Christophe FERRAND**, UMR1098/EFS/UBFC, Besançon, France.

**Directeur de thèse**

Professeur **Ziad FAJLOUN**, Université Libanaise, EDST, Tripoli, Liban.

**Co-directeur de thèse**

Docteur **Marina DESCHAMPS**, UMR1098/EFS/UBFC, Besançon, France.

**Co-directrice de thèse**

## Remerciements

*J'exprime ma plus sincère reconnaissance au Pr Stéphane DEPIL et le Pr Rihab NASR pour avoir accepté de rapporter mon travail de thèse et de faire partie de mon jury. Je tiens également à remercier le Pr Ibrahim YACOUB-AGHA et le Dr Delphine REA, en tant qu'examineurs et pour avoir accepté de faire partie de mon jury.*

*Plus particulièrement, je ne je ne pourrais tirer ma révérence sans penser aux personnes qui m'ont accompagnées et soutenus durant ces dernières années. Ce travail n'est que le produit de toutes ces bonnes intentions :*

*Au Pr Philippe SAS, le directeur du laboratoire UMR1098. Merci de m'avoir accueilli dans votre laboratoire. Merci pour vos conseils, et votre gentillesse.*

*Au Pr Olivier ADOTEVI, directeur de l'équipe TIMC. Merci de m'avoir accueilli dans votre équipe, pour vos conseils, votre encouragement et votre enthousiasme.*

*Au Dr Christophe FERRAND mon directeur de thèse. Je vous remercie de m'avoir donné ma chance et fait confiance. Merci pour vos conseils, votre enthousiasme inépuisable, la liberté de recherche que vous m'avez accordé. Ainsi que les expériences d'encadrement des stagiaires qui m'ont permis de m'épanouir. Je suis très fière d'avoir été votre étudiant!*

*Au Pr Ziad FAJLOUN mon co-directeur de thèse. Je vous remercie de m'avoir donné votre confiance, votre encouragement. Merci pour vos conseils, de m'avoir guidé durant mon apprentissage du métier de chercheur.*

*Au Dr Marina DESCHAMPS, ma co-directrice de thèse. Je vous remercie de vos conseils, vos expertises. Vous m'avez apporté beaucoup de connaissances et des astuces dans les expériences de thérapie génique.*

*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 :*

*A Mathieu NETO DA ROCHA. C'était très sympa et inoubliable les moments qu'on a passé ensemble au laboratoire. Un grand merci pour ton aide dans les expériences, la relecture et correction de mon manuscrit. Ainsi que dans la préparation de ma soutenance.*

*A Alizée JENVRIN, merci pour ta solidarité apportée, tes conseils, ta gentillesse et ton soutien, merci pour ton aide dans la correction de mon manuscrit.*

*A Jean-Marie CERTOUX, on a partagé le même PSM pendant mon travail au laboratoire. Merci pour ta gentillesse, tes conseils, et ta bonne humeur.*

*Merci à l'ensemble des chercheurs de l'unité pour leurs conseils avisés durant toutes ces années: Pr Francine GARNACHE-OTTOU, Dr Fanny DELETTRE, Dr Yann GODET, Dr Sylvain PERRUCHE, et Pr Christophe BORG.*

*A Idir, Sabeha, Dr Francis, Dr Jean-René, Dr Kamal, Dr Jeanne, Jérémy, Clémentine, Anne, Patricia, Virginie, pour toutes les réponses qu'ils ont apportés à toutes les questions que je me suis posées, pour leur disponibilité mais aussi pour leurs compétences scientifiques et techniques qui sont d'un grand secours pour tous les étudiants du laboratoire.*

*A Kiki, Laurie, Sindy, Dr Emilie, Dr Thierry, Dr Mélanie, Laura, Eléonore, Adeline, Charline, Christelle. Merci pour vos encouragements qui m'ont accompagné tout au long de ces années.*

*Une pensée spéciale pour le Pr Bruno DEGANO et sa femme le Pr Séverine VALMARY-DEGANO et leurs enfants Gaspar et Paola. Merci de m'avoir invité chez-vous, votre accueil chaleureux pendant ma première visite à Besançon!*

*Sans les amis proches, la vie n'aurait pas de sens!*

*Merci à chacun d'entre vous pour votre amitié sincère et réciproque : Badreddine, Abdallah, Mamdouh et Omar.*

*Enfin, le plus important, merci à ma famille :*

*Cette aventure n'aurait pas été possible sans mes très chers parents et mes frères et sœurs. Vous avez toujours été à mes côtés pour m'encourager, me soutenir... Si j'en suis là aujourd'hui, c'est grâce à vous! Je vous suis infiniment reconnaissant de l'éducation et des valeurs que vous m'avez transmises.*

*Je tiens également à remercier mes grands-parents pour leur amour et leur bienveillance.*

*walid*

## Sommaire

Liste des figures .....	7
Liste des tableaux .....	9
Liste des abréviations .....	10
Introduction .....	13
Chapitre 1 : La Leucémie Myéloïde Chronique (LMC) .....	13
I. Physiopathologie de la LMC .....	13
A. Les signalisations de l'oncogène (BCR-ABL) .....	15
B. Diagnostic .....	18
II. Historique du traitement .....	20
A. Thérapies non-ciblées .....	21
1. L'arsénite de potassium .....	21
2. L'irradiation splénique .....	21
3. Le busulfan et l'hydroxyurée .....	21
4. Greffe allogénique de la moelle osseuse .....	22
5. Les traitements associant l'INF $\alpha$ (Interféron $\alpha$ ) .....	22
B. Thérapies ciblées : l'ère des ITKs .....	23
1. ITK de première génération : Imatinib (IM) .....	23
2. ITK de deuxième génération : Nilotinib, Dasatinib, Bosutinib .....	25
3. ITK de troisième génération : Ponatinib .....	25
C. Modes de résistance au traitement par ITKs .....	27
D. Effets secondaires des ITKs .....	28
III. Stratégie d'arrêt du traitement par des ITKs .....	29
IV. Rechute de patients après arrêt de traitement par des ITKs .....	31
A. Ciblage de la CSL par des inhibiteurs de voies de signalisations .....	33
B. Evidence de l'intervention du système immunitaire .....	34
1. Antigènes tumoraux de la LMC .....	35
C. Caractéristiques des cellules souches hématopoïétiques .....	35
D. Identification des CSL exprimant la protéine IL-1RAP .....	36
E. Protéine accessoire au récepteur de l'interleukine-1 (IL-1RAP) .....	38
1. Définition d'IL-1RAP .....	38
2. Fonction d'IL-1RAP .....	38
Chapitre 2 : Immunothérapie cellulaire du cancer par des «CART -cells» .....	40

I.	Historique de l'immunothérapie.....	40
A.	La théorie de l'immunosurveillance des tumeurs.....	40
1.	Phase d'élimination.....	41
2.	Phase d'équilibre.....	41
3.	Phase d'échappement.....	41
B.	Types d'immunothérapie.....	42
1.	Immunothérapie active spécifique.....	43
2.	Immunothérapie active non spécifique.....	44
3.	Immunothérapie passive spécifique.....	45
II.	Historique de développement de CAR.....	50
III.	Structure de CAR.....	51
A.	Domaine extracellulaire.....	52
1.	La génération de scFv.....	52
2.	Caractéristiques de scFv.....	53
3.	Immunogénicité de scFv.....	54
B.	Région Hinge.....	55
C.	Domaine transmembranaire.....	56
D.	Région intracellulaire.....	57
IV.	Les outils du transfert de gène.....	58
A.	Définition.....	58
B.	Les vecteurs utilisés en thérapie génique.....	59
C.	Les lentivirus.....	60
1.	Production des particules lentivirales.....	60
V.	Stratégie de traitement de patient par des CART-cells.....	61
VI.	Essais clinique par des CART-cells.....	63
A.	Cancer solide.....	64
B.	Cancer hématologique.....	66
VII.	Toxicités liées au traitement par des CART-cells.....	68
A.	Toxicité on-target / on-tumor (sur la cible / dans la tumeur).....	69
B.	Toxicité on-target / off-tumor (sur la cible / en dehors de la tumeur).....	70
C.	Toxicité neurologique.....	71
VIII.	Stratégies de sécurisation et de régulation de la fonction de CAR.....	71
A.	Outils d'édition de génome.....	72
B.	Diminuer le risque d'auto-immunité contre les CART-cells.....	72
C.	Approches pour augmenter la spécificité de CART-cell.....	75

1. Dual CAR.....	75
2. Switchable CAR.....	76
3. CAR inhibitrice .....	78
4. CAR bispécifiques : TanCAR .....	78
D. Approches pour induire la mortalité des cellules modifiées par le CAR .....	79
1. Système HSV-TK/ganciclovir :.....	80
2. Système médié par un anticorps monoclonal .....	80
3. Système médié par dimérisation : iCasp9/AP1903: .....	81
<b>Objectif de ce travail de thèse.....</b>	<b>83</b>
<b>Résumé de l'article .....</b>	<b>84</b>
<b>Résultats (Article soumis).....</b>	<b>87</b>
<b>Discussion et perspectives .....</b>	<b>126</b>
A. IL-1RAP est une cible potentielle dans la LMC et la LAM.....	126
B. Étapes de la stratégie de développement de CAR anti-IL-1RAP .....	129
C. Possibilité d'utilisation de notre CART-cells en allogreffe.....	135
<b>Conclusion.....</b>	<b>137</b>
<b>Références bibliographiques.....</b>	<b>138</b>
<b>Annexe.....</b>	<b>151</b>

## Liste des figures

Figure 1 : Hématopoïèse normale des cellules souches hématopoïétiques. ....	13
Figure 2 : Translocation réciproque t(9;22) et formation du Chromosome Philadelphie. ....	15
Figure 3 : Structure protéique de la protéine de fusion BCR-ABL, en forme inactive et active. ....	16
Figure 4 : Détection du gène BCR-ABL par la technique de FISH. ....	19
Figure 5 : Représentation schématique des différents types de transcrits BCR-ABL1 retrouvés dans la LMC. ....	20
Figure 6 : Historique des traitements de la LMC. ....	21
Figure 7 : Mode d'action de l'imatinib. ....	23
Figure 8 : Probabilité de survie globale de patients de LMC. ....	24
Figure 9 : Activité des inhibiteurs de tyrosine kinase sur les mutants BCR-ABL les plus fréquemment détectés dans le cadre de résistance. ....	26
Figure 10 : Mécanismes de résistance aux ITKs ....	27
Figure 11 : Courbe de Kaplan-Meier. ....	31
Figure 12 : Niveau de détection de BCR-ABL chez 13 patients. ....	32
Figure 13 : Suivi de la prolifération des cellules souches après le traitement par l'IM. ....	32
Figure 14 : Voies de signalisation alternatives ciblées pour palier à la résistance de la CSL aux ITKs. ....	34
Figure 15 : Expression de CD34 et de CD38 par les cellules hématopoïétiques durant les différents stades de différenciation cellulaire. ....	36
Figure 16 : L'expression d'IL-1RAP distingue les cellules souches CD34+CD38- normales (BCR/ABL) des cellules souches leucémiques (BCR/ABL+), sur des prélèvements de la moelle osseuse de patients atteints de la LMC. ....	37
Figure 17 : Expression d'IL-1RAP par les CSL de patients atteints de LMC. ....	37
Figure 18 : Production et signalisation de l'IL-1. ....	39
Figure 19 : la théorie de l'immunosurveillance de la tumeur. ....	41
Figure 20 : Types d'immunothérapie. ....	43
Figure 21 : Mode d'action des inhibiteurs de <i>checkpoints</i> immunitaire. ....	45
Figure 22 : Comparaison entre un TCR transgénique et un CAR. ....	49
Figure 23 : Historique de développement de CAR. ....	50
Figure 24 : Structure d'un CAR. ....	51
Figure 25 : Formation de scFv de CAR. ....	52
Figure 26 : Production d'un anticorps monoclonal. A droite, technique d'hybridome. A gauche, technique de « Phage display ». ....	53
Figure 27 : Seuils de sensibilité pour divers anticorps ou modalités thérapeutiques à base de LT .....	54
Figure 28 : Activation du TCR ou CAR. ....	56
Figure 29 : Générations des CAR T-cells. ....	57
Figure 30 : Structure d'une particule lentivirale. ....	60
Figure 31 : Production des particules lentivirales. ....	61
Figure 32 : Stratégie de production de CART-cells en clinique. (Davila and Sadelain, 2016) ....	62
Figure 33 : Système clos, appelé « Prodigy » pour la production des CART-cells en grade GMP. (Société Milteny) ....	63
Figure 34 : Nombre des essais cliniques de CAR entre l'année 1997 et 2016. ....	64



Figure 35 : Nombre des essais de CAR selon le type de la tumeur (A); l'âge de patient traité (B) et la génération de CAR utilisé (C). .....	64
Figure 36 : Types des antigènes cibles et les nombres de patients traités par des CART-cells dans les cas des tumeurs solides.....	65
Figure 37 : Barrières des tumeurs solides qui réduisent l'efficacité de CART-cell.....	66
Figure 38 : Nombre des essais cliniques de CAR selon le type d'antigène cible de tumeur liquide.....	67
Figure 39 : Types de toxicité liée au traitement par des CART-cells.....	69
Figure 40 : Effet indésirables de Syndrome de libération cytokinique. ....	70
Figure 41 : Stratégies pour limiter les effets indésirables du traitement par des CART-cells.....	72
Figure 42 : CAR universel. ....	73
Figure 43 : Ingénierie des génomes par les TALEN.....	74
Figure 44 : vecteur de CD19.UCAR.....	75
Figure 45 : Système Dual CAR.....	76
Figure 46 : Système switchable CAR. ....	77
Figure 47 : Système Switchable CAR/FITC.....	77
Figure 48 : Système iCAR. ....	78
Figure 49 : Système CAR en Tandem. ....	79
Figure 50 : Mécanismes d'action d'induction de la mort cellulaire de gène suicide HSV-tk (a) ; iCasp9 (b) et tEGFR (c). ....	80
Figure 51 : iCaspase9/AP1903. ....	81
Figure 52 : Expression d'IL-1RAP à la surface des lignées de LAM.. ....	128
Figure 53 : Test de cytotoxicité d'IL-1RAP CAR T-cells sur les cellules de la lignée HL-60.. ....	128
Figure 54 : Phénotype et fonction de LT en fonction de cytokines utilisés pendant l'activation par des billes CD3/CD28. ....	134
Figure 55 : Stratégie et modalité du traitement du patient par un CAR universel. ....	136
Figure 55 : Schéma récapitulatif des principaux résultats. ....	137

## Liste des tableaux

Tableau 1: Niveau de réponse au traitement de la LMC.....	.29
Tableau 2: Réponses hématologiques, cytogénétiques et moléculaires au cours du traitement par ITKs.....	30
Tableau 3: Anticorps monoclonaux agréés par la FDA et autorisés dans le traitement du cancer.....	46
Tableau 4: Pourcentage de RC (Rémission complète) des patients (adultes ou enfants) traités par des CAR-T cells.....	68

## Liste des abréviations

### A

**7-AAD:** 7-Amino actinomycin D  
**AAV:** Virus adéno-associés  
**ABL:** Abelson  
**ASH:** American society of hematology  
**ADCC:** Cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps  
**AICD:** Activation Induced Cell Death  
**ADN:** Acide désoxyribonucléique  
**ACE:** Antigène carcino-embryonnaire  
**ANSM:** Agence National de la Sécurité des Médicaments  
**ARN:** Acide ribonucléique  
**Akt:** Protéine Kinase B  
**Alox5:** Arachidonate 5-lipoxygénase  
**AP-1:** Activator Protein-1  
**ATP:** Adenosine tri-phosphate

### B

**BCR:** Breakpoint Cluster Region  
**BCL-XL:** B-cell lymphoma-extra large  
**BCMA:** B-cell maturation antigen  
**BCR-ABL:** Protéine de fusion BCR-ABL  
**BELA:** Bosutinib Efficacy and Safety in Newly Diagnosed Chronic Myeloid Leukemia

### C

**C7:** Complément 7  
**CAR:** Chimeric antigen receptor  
**CARD:** Caspase recrutement domain  
**CCR:** Chimeric costimulatory receptor  
**CD:** Cluster of differentiation

**CHU:** Centre hospitalier universitaire  
**CXCR4:** C-X- Chemokine Receptor type 4  
**CPA:** Cellule présentatrice d'antigène  
**CRISPR/Cas9:** Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/CRISPR associated protein 9  
**CMH:** Complexe majeur d'histocompatibilité  
**CSH:** Cellule souche hématopoïétique.  
**CSL:** Cellule souche leucémique  
**CTLA-4:** Cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4  
**CY:** Cyclophosphamide

### D

**DASISION:** Dasatinib Versus Imatinib Study In Treatment-Naïve Chronic Myeloid Leukemia

### E

**EGFR:** Epidermal Growth Factor Receptor  
**ELN:** European Leukemia Net  
**ELISA:** Enzyme-linked immunosorbent assay  
**ELA2:** Elastase  
**ENESTnd:** Evaluating Nilotinib Efficacy and Safety in Clinical Trials-Newly Diagnosed Patients  
**ErbB2:** Receptor Tyrosine Kinase 2  
**EUROSKI:** European stop kinase inhibitor.

### F

**FACS:** Fluorescence-activated cell sorting  
**FAP:** Protéine d'activation de fibroblaste  
**FC:** Fragment cristallisable

**FDA:** Food and drug administration

**FISH:** Fluorescent in-situ hybridization

**FITC:** Fluorescein isothiocyanate

## G

**GAG:** Group specific antigen

**GD2:** Disialoganglioside

**GMP:** Good Manufacturing Process

**GMTC:** Gene-modified T cell

**GvHD:** Graft versus host disease

**GvL:** Graft versus Leukemia

## H

**HLA:** Human leukocyte antigen

**HMEC-1:** Human microvascular endothelial cells

**HSV-1:** Virus de l'herpès simplex de type 1

**HSV-TK:** Herpès simplex-thymidine kinase

**hTR:** human Telomerase RNA

**hTERT:** human Telomerase Reverse Transcriptase

## I

**iCAR:** Inhibitory chimeric antigen receptor

**iCasp9:** Caspase9 inducible

**ICOS:** Inducible T-cell COStimulator

**IDL:** Infusions of Donor Lymphocytes

**IFN $\alpha$  :** Interféron  $\alpha$

**IL:** Interleukine

**IL-1RAP:** Interleukin-1 Receptor

Accessory Protein

**IKK $\alpha$ :** Ikappa-B Kinase alpha

**IL-13R $\alpha$  :** Récepteur de l'interleukine-13 $\alpha$

**IM:** Imatinib

**IRIS:** International Randomized Study of Interferon versus STI571

**IRAK :** Interleukin-1 Receptor Activated Kinases.

**ITKs:** Inhibiteurs de tyrosine kinase

## J

**JAK:** Janus *Kinase*

## K

**KLH:** Keyhole Limpet Hemocyanin.

## L

**LAL-B :** Leucémies Aiguës

Lymphoblastiques à précurseurs B

**LAM :** Leucémie aigue myéloblastique

**LLC :** Leucémie lymphoïde chronique

**LMC:** Leucémie myéloïde chronique.

**LNH:** lymphomes non hodgkiniens

**LT:** Lymphocyte T

**LTreg:** Lymphocyte T régulateur

## M

**mAb:** Monoclonal antibody

**mTOR:** Mammalian Target Of Rapamycin

**Mcl1:** Induced myeloid leukemia cell differentiation protein.

**MCyR:** Major cytogenetic response

**MIC:** Major histocompatibility complex class I chain

**MRD:** Minimal residual disease

**MTI:** Médicaments de thérapies innovantes

**MyD88:** Myeloid Differentiation primary response 88

## N

**NK:** Natural Killer

**NKT:** Natural Killer T

**NF $\kappa$ B:** Nuclear factor-kappa B

**NGS:** Next-generation sequencing

**NKG2D:** Natural killer Group 2 member D

## O

**OMS** : Organisation mondiale de la santé

## P

**PBMC**: Peripheral blood mononuclear cells

**PD-1**: Programmed death-1

**PDL-1**: Programmed death-ligand 1

**PI3K**: phosphatidylinositol-3-kinase

**P190** : Gène mineur de BCR-ABL (e1-a2)

**P210** : Gène majeur de BCR-ABL (b3-a2)

**PCyR**: Partial cytogenetic response

**Ph1**: Chromosome Philadelphie

**PRAME**: Preferentially Expressed Antigen of Melanoma

**Pol**: polymérase

**PCR**: Polymerase chain reaction

## R

**RMM** : Réponse moléculaire majeure

**ROS** : Espèces réactives de l'oxygène

**RT-qPCR** : Reverse transcriptase-quantitative polymerase chain reaction

**RHC**: Réponse Hématologique Complète

**RCC**: Renal Cell Carcinoma.

**REV**: Regulator of Expression of Virion protein

## S

**scFv**: Single-chain variable fragment

**SDF-1**: Stromal cell-Derived Factor 1.

**STAT**: Signal Transducers and Activators of Transcription

**STIM**: Stop imatinib

**SLC**: Syndrome de libération cytokinique

## T

**TALEN**: Transcription activator-like effector nuclease

**TAT**: Trans-Activator of Transcription

**Th**: T helper cell

**TGF-β**: Transforming growth factor-β

**TIR**: Toll/IL-1 Receptor

**TIL**: Tumor infiltrating lymphocytes

**TCRtg**: Transgenic T cell receptor

**Treg**: LT régulateurs

**TSCM**: T stem cell central memory

## U

**UCART**: CART universels

## V

**VEGF**: Vascular endothelium growth factor

**VH**: Heavy chain

**VIH**: Virus d'immunodéficience humaine

**VL**: Light chain

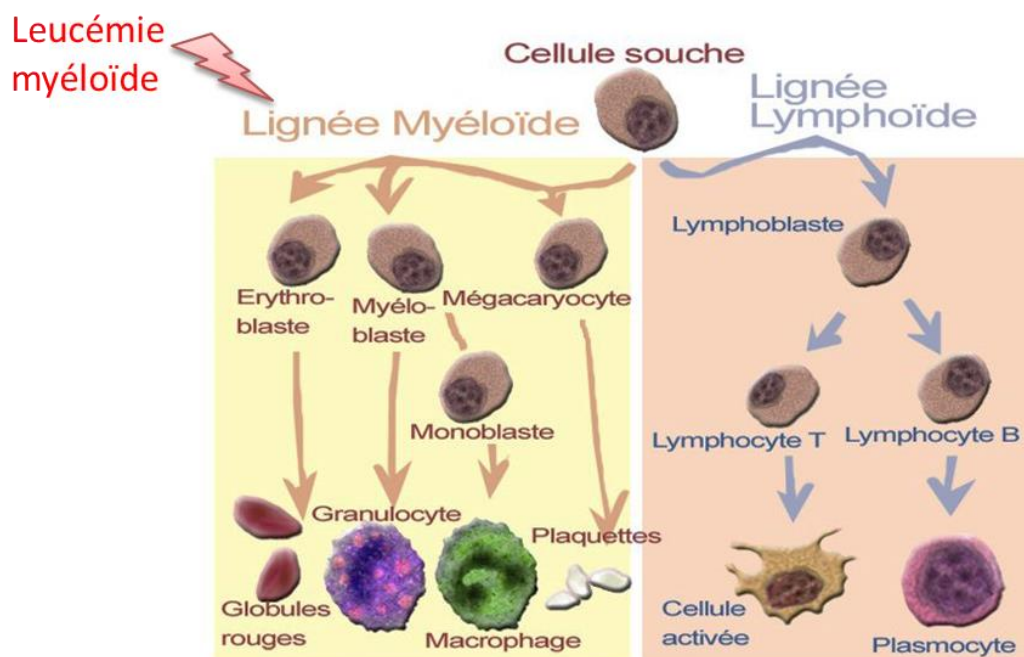
**VSV-G**: Vesicular Stomatitis Virus Glycoprotein

## Introduction

### Chapitre 1 : La Leucémie Myéloïde Chronique (LMC)

#### I. Physiopathologie de la LMC

La leucémie myéloïde chronique est une maladie caractérisée par la prolifération clonale et maligne d'une ou de plusieurs lignées cellulaires myéloïdes (**Figure 1**). Elle se caractérise entre autre, par une augmentation du nombre de globules blancs (hyperleucocytose) dans le sang du patient allant de 100 à 300 millions de cellules, une myélémie pouvant aller jusqu'à une phase blastique et une basocytose (représentant 10 à 15% des leucocytes). La LMC est une pathologie relativement rare en France avec une incidence annuelle de 1 à 2 cas par 100 000 individus (Rohrbacher and Hasford, 2009). Elle est plus fréquente chez l'adulte âgé de plus de 60 ans (médiane d'âge au diagnostic = 67 ans), moins de 10% des cas sont recensés avant l'âge de 20 ans avec une prédominance masculine : sex ratio = 1,1 à 1,2.



**Figure 1 : Hématopoïèse normale des cellules souches hématopoïétiques.**

L'étiologie de la LMC reste inconnue, mais, dans 5% des cas, elle est secondaire à une exposition chronique au benzène ou aux radiations ionisantes. La plupart des patients atteints de LMC sont diagnostiqués au stade de **phase chronique** caractérisée, dans le sang, par :

- Nombre de blastes <15%
- Nombre de blastes plus myéloblastes < 30 %
- Nombre de polynucléaires basophiles < 20 %
- Nombre de plaquettes > 100 G/L.

**La phase accélérée** est une évolution de la LMC. Elle est présente chez 10% des patients dès le diagnostic mais peut également apparaître au cours du traitement. Cette phase peut durer «3 à 12 mois », elle se caractérise de la manière suivante (OMS : Organisation mondiale de la santé 2016) :

- Persistance ou augmentation de la splénomégalie, ne répondant pas au traitement.
- Persistance ou augmentation du nombre de leucocytes au-delà de 10 G/L, ne répondant pas au traitement.
- Persistance ou augmentation de la thrombocytose (> 1000 G/L), ne répondant pas au traitement.
- Persistance d'une thrombopénie < 100 G/L, sans lien avec le traitement.
- Présence d'au moins 20% de basophiles dans le sang.
- Présence d'anomalies cytogénétiques clonales additionnelles au Ph1 (anomalie génétique, chromosome Philadelphie), incluant les anomalies de première importance (doublement du Ph1, trisomie 8, isochromosome 17q, trisomie 19), ou un caryotype complexe, ou des anomalies en 3q26.2

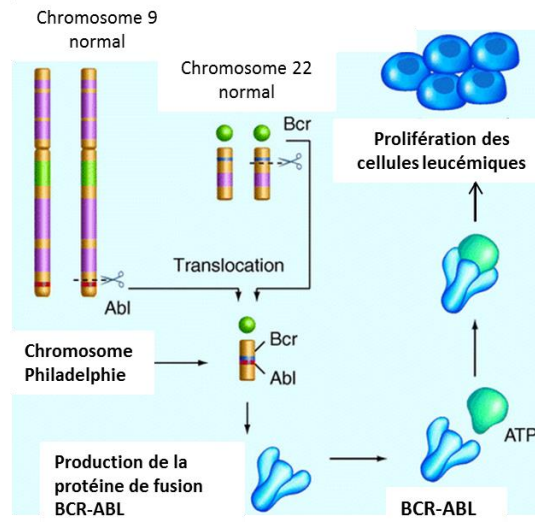
**La phase blastique** est la phase terminale de la LMC. Elle présente les signes cliniques suivants: réapparition de la splénomégalie, sueurs nocturnes, perte de poids, douleurs osseuses; parfois adénopathies et chloromes blastiques extramédullaires. Cette phase est caractérisée (critères OMS 2016) par la présence d'au moins 20% de blastes dans le sang et/ou la moelle osseuse, ou la présence d'une maladie extramédullaire avec infiltration blastique (les blastes pouvant être lymphoïdes ou myéloïdes).

En 1960, Nowell et Hungerford ont mis en évidence la présence d'un petit chromosome dans les cellules tumorales. Ce chromosome sera nommé chromosome de Philadelphie (Ph1), en référence au nom de la ville de sa découverte (Nowell and Hungerford, 1960).

En 1973, Rowley a montré que ce chromosome Ph1 était issu d'une translocation réciproque entre le chromosome 9 et le chromosome 22 : t(9;22)(q34;q11) (Rowley, 1973). Ainsi, le bras

long du chromosome 9 le gène (ABL) (Abelson) fusionne à la partie télomérique du bras long du chromosome 22, dans une région appelée (BCR) (Breakpoint Cluster Region).

Ce remaniement chromosomique aboutit à un chromosome 22 très court (Ph1) sur lequel se trouve le gène de fusion (BCR-ABL) (**Figure 2**).



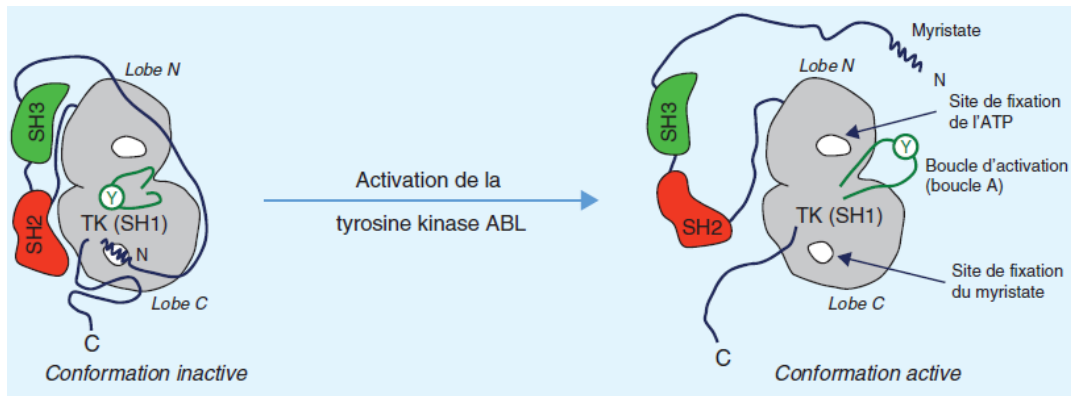
**Figure 2 : Translocation réciproque t(9;22) et formation du Chromosome Philadelphie.**  
(<http://apbiobhs.blogspot.fr>)

La protéine de fusion (BCR-ABL) est un oncoprotéine hybride, caractérisé par une activité tyrosine kinase dérégulée.

#### A. Les signalisations de l'oncogène (BCR-ABL)

Structurellement, la protéine BCR-ABL contient la plupart des domaines fonctionnels d'ABL : les domaines SH2 et SH3, le domaine tyrosine kinase SH1, le domaine de fixation à l'ADN et le domaine de liaison à l'actine (**Figure 3**). Ainsi cette recombinaison amène à une activation constitutive de la fonction tyrosine kinase d'ABL et à la localisation majoritairement cytoplasmique de la protéine BCR-ABL (Goldman and Melo, 2003).





**Figure 3 : Structure protéique de la protéine de fusion BCR-ABL, en forme inactive et active.**  
D'après Sorel et al., 2017

En conséquence, la protéine BCR-ABL interfère avec des processus cellulaires normaux (Keramatinia et al., 2017) comme la prolifération, l'apoptose, l'adhérence et la stabilité génétique en activant des voies de transduction du signal de façon autonome, en induisant une prolifération incontrôlée de la lignée myéloïde.

**1. La voie Ras:** L'effet cellulaire de la voie Ras est l'expression anormalement élevée de gènes indispensables pour la prolifération cellulaire, tels que c-Fos (un facteur de transcription induisant la réplication de l'ADN), c-Myc (nécessaire pour la transcription de l'ARN ribosomal), ou c-Jun (Raitano et al., 1995). Elle stimule aussi, en coordonnant avec la voie PI3K, l'expression de cycline D1 et de Cdk6, deux éléments importants pour l'initiation du cycle cellulaire en G1 (Pagès et al., 1993). Cette voie active également la synthèse protéique en favorisant la traduction au niveau des ribosomes. (Ow et al., 2008). La voie Ras/ERK induit l'expression de protéines anti-apoptotiques (Bcl2, Bcl-xL et Mcl1) par des mécanismes transcriptionnels et post-traductionnels (Kim et al., 2006).

**2. La voie PI3K (Phosphatidylinositol-3-Kinase) /Pkb (Protein kinase B)/mTOR (Mammalian Target Of Rapamycin) :** La PI3K est un enzyme hétéro-dimérique à activité lipide kinase composée d'une sous-unité régulatrice (p85) et d'une sous-unité catalytique (p110). Dans les cellules LMC, il a été montré que l'activation de la voie PI3K/mTOR par BCR-ABL contribue à la production accrue des espèces réactives de l'oxygène (ROS) et que l'inhibition de la PI3K ou de mTOR conduit à une diminution significative de niveau de ROS (*Reactive Oxygen Species*). Le mécanisme passe par une augmentation du métabolisme du glucose et par une hyperactivité de la chaîne mitochondriale de transport des électrons. Les niveaux élevés des ROS dans les cellules BCR-ABL positives peuvent contribuer aux dommages de l'ADN spontanés et à l'instabilité génomique (Kim et al., 2005).

Akt joue aussi un rôle important dans la survie induite par BCR-ABL car elle affecte un certain nombre de phosphorylations qui permettent l'échappement à l'apoptose.

En résumé, la voie PI3K/Akt/mTOR transforme la protéine BCR-ABL qui régule la croissance, la prolifération, la survie cellulaire et l'instabilité génétique.

**3. La voie JAK (*Janus Kinase*) /STAT (*Signal Transducers and Activators of Transcription*):**

La famille des JAK-kinases, composée de tyrosine kinases intracellulaires, et les protéines STAT sont impliquées directement dans la transduction du signal à partir des membres de la famille des récepteurs aux cytokines. Dans les lignées BCR-ABL positives, l'activation de STAT5 par BCR-ABL confère la résistance à l'apoptose en activant la transcription des gènes codant les protéines anti-apoptotiques BCL-XL (*B-cell lymphoma-extra large*) et Mcl1 (*Myeloid cell leukemia*). STAT5 induit aussi avec STAT3 l'expression de c-Myc (Proto-oncogène) et les gènes régulant le cycle cellulaire comme la cycline D1/D2 (Steelman et al., 2004).

**4. La voie Rac:** Il est probable que les modifications de la capacité d'adhésion et de la migration des cellules BCR-ABL positives soient liées à l'activation des voies de signalisation faisant intervenir les molécules de la plaque d'adhésion (Fak et paxilline) et de Rac1 (Gotoh et al., 1995). Des travaux plus récents semblent indiquer que BCR-ABL pourrait modifier la migration des cellules leucémiques en interagissant avec la molécule CXCR4 (*C-X-Chemokine Receptor type 4*), récepteur de SDF-1 (Stromal cell-Derived Factor 1). Les mécanismes de cette interaction restent à élucider (Geay et al., 2005).

**5. La voie NFκB (*Nuclear Factor-kappa B*):** BCR-ABL active la voie NFκB via la voie PI3K/Akt. L'activité de NFκB a été montrée comme étant nécessaire à la transformation des cellules primaires par BCR-ABL (Reuther et al., 1998).

**6. Les voies de l'instabilité, génomique et génétique:** BCR-ABL est la seule anomalie cytogénétique détectable au cours de la phase chronique de la maladie. La progression vers les phases accélérées puis blastiques s'accompagne d'anomalies génomiques additionnelles, marqueurs d'une instabilité génomique croissante (Radich, 2007). Les trois anomalies les plus souvent rencontrées sont : la trisomie 8, la duplication du chromosome Ph1 et la trisomie 19.

La responsabilité de BCR-ABL dans la genèse de cette instabilité génomique est fortement suspectée.

**7. La voie de la télomérase :** La télomérase, enzyme responsable du maintien de la taille des télomères, est constituée de deux composants essentiels : l'ARN matrice ou hTR (*human Telomerase RNA*) qui sert de matrice pour la synthèse de l'ADN télomérique matrice et l'enzyme reverse transcriptase hTERT (*human Telomerase Reverse Transcriptase*) (Greider and Blackburn, 1985). L'expression de hTERT dans les cellules de LMC chez les patients en phase chronique est similaire à celle des cellules normales. Cependant, son épissage alternatif est modifié et l'expression de son partenaire hTR diminue (Drummond et al., 2005). Ceci explique la faible activité de la télomérase dans cette phase. Durant les phases d'accélération et blastique les télomères arrivent à une taille critique. Les cellules de la LMC présentent des changements au niveau des microsatellites, signe d'une forte instabilité génomique dans ces deux phases (Brümmendorf et al., 2000).

**8. la voie d'ubiquitinylation :** Des travaux récents ont montré que BCR-ABL interagit avec l'ubiquitinylation de certaines protéines cibles en stimulant leur dégradation par le protéasome (Dai et al., 1998). Cette implication de BCR-ABL a été démontrée initialement par l'étude des protéines adaptatrices ABI-1 et ABI-2 (ABI: *ABL-interactor proteins*) qui sont capables de se lier aux régions riches en proline d'ABL et de bloquer également l'activation de RAS. L'équipe de Pendergast a montré que les oncogènes (BCR-ABL) p210 et p190 pouvaient entraîner une réduction du niveau des protéines ABI-1 et ABI-2 dans les cellules leucémiques en favorisant leur dégradation par le système ubiquitine-protéasome (Dai and Pendergast, 1995).

La découverte de BCR-ABL a été une étape clé dans la compréhension de la LMC et l'élaboration de nouvelles lignes de thérapies ciblées pour la traiter (Chen et al., 2010).

Ainsi, nous allons vous présenter les différentes stratégies thérapeutiques qui ont été développées pour lutter contre la LMC. Ainsi que les nouvelles pistes de recherche pour cibler les cellules leucémiques notamment les cellules souches leucémiques.

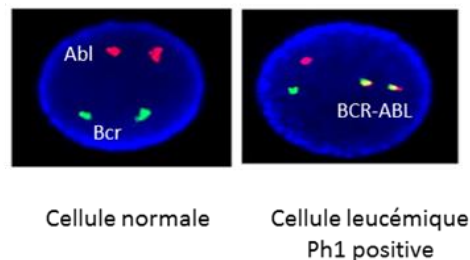
## B. Diagnostic

Dans 40 % des cas, la découverte de la maladie se fait de manière fortuite, à l'occasion d'un examen sanguin de routine. Dans les autres cas, ce sont des indices comme une intense fatigue

et une augmentation du volume de la rate (splénomégalie) qui vont conduire à la réalisation d'un examen de la moelle osseuse (myélogramme) et faire suspecter la LMC.

Le diagnostic est alors confirmé par des analyses sanguines et médullaires. Dans le sang, la translocation t (9;22) par les techniques de caryotype et d'hybridation *in-situ* en fluorescence (FISH) (**Figure 4**). Par cette technique les cellules sont incubées avec deux sondes marquées par deux fluorochromes différents, une sonde rouge spécifique pour le gène ABL (Chromosome 9) et une sonde verte spécifique pour le gène BCR (Chromosome 22). Dans le cas de translocation t (9 ; 22), le gène BCR et ABL sont liés, ce qui donne naissance à une couleur jaune (Gène de fusion BCR-ABL).

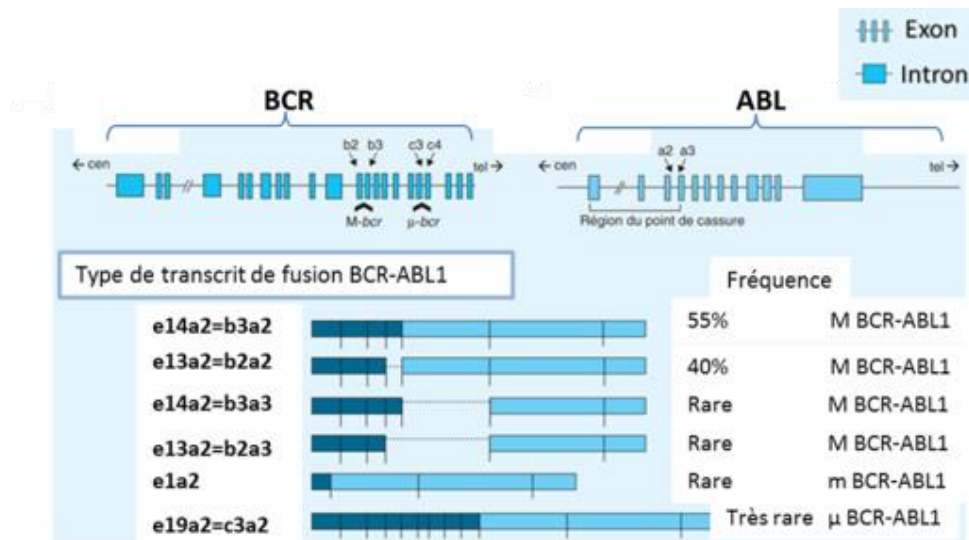
L'amplification des transcrits du gène de fusion par RT-PCR (*Polymerase Chain Reaction*) permet la confirmation du diagnostic



**Figure 4 : Détection du gène BCR-ABL par la technique de FISH.** Coloration du gène BCR avec une sonde spécifique verte, et du gène ABL avec une sonde spécifique rouge. La cellule normale présente deux gènes BCR et deux gènes ABL. Par contre la cellule leucémique présente un gène BCR et un ABL avec deux gènes de fusion BCR-ABL (couleur jaune). La couleur jaune résulte de la fusion de couleur vert avec la couleur rouge. D'après (Järås et al., 2010)

En effet, la fusion des gènes BCR et ABL entraîne la transcription d'ARN messagers hybrides, dits chimériques car ils comportent des séquences transcrites à partir des deux gènes de la translocation dans le sens 5' BCR-ABL 3'. Il existe plusieurs types de transcrits, un transcrit joignant l'exon b2 de la région BCR à l'exon a2 du gène c-ABL (b2-a2 retrouvé dans 40% des cas) et ou l'exon b3 de la région BCR à l'exon a2 de c-ABL (b3-a2 retrouvé dans 55% des cas) (**Figure 5**).

Le myélogramme permet de déterminer la phase de la maladie en particulier par le décompte du nombre de blastes. Une biopsie ostéo-médullaire peut aussi être réalisée afin d'évaluer l'importance d'une éventuelle fibrose médullaire.



**Figure 5 : Représentation schématique des différents types de transcrits BCR-ABL1 retrouvés dans la LMC. D'après (Gendron et al., 2014)**

Il est à noter que le chromosome de Philadelphie est également présent dans certaines Leucémies Aiguës Lymphoblastiques (LAL) (retrouvé dans 20 à 30 % des LAL chez l'adulte et 5 % chez l'enfant) (Melo, 1996). Dans un tiers des cas, les anomalies moléculaires sont identiques à celles décrites au cours de la LMC, mais, dans deux tiers des cas, le point de cassure sur le chromosome 22 est situé plus en amont, au niveau du premier intron dans une région appelée m-BCR ou point de cassure mineur. Le transcrit chimérique généré est de type e1-a2 et aboutit à la synthèse d'une protéine hybride p190 qui possède une activité tyrosine kinase et un pouvoir transformant supérieurs à ceux de la p210.

L'analyse par RT-qPCR (RT-PCR quantitative) permet également d'évaluer la charge tumorale par quantification du ratio BCR-ABL/ABL et servira de référence pour le suivi de la leucémie résiduelle, ainsi que pour évaluer la réponse du patient aux traitements.

## II. Historique du traitement

Le traitement de la LMC a commencé par l'utilisation de médicaments non ciblés comme l'arsenic et la radiothérapie (Rayon X). Puis, avec la compréhension des mécanismes physiopathologiques de la LMC, les progrès de la médecine ont été considérables dans le traitement de cette maladie, notamment par l'utilisation des Inhibiteurs de Tyrosines Kinases (ITKs) (**Figure 6**).

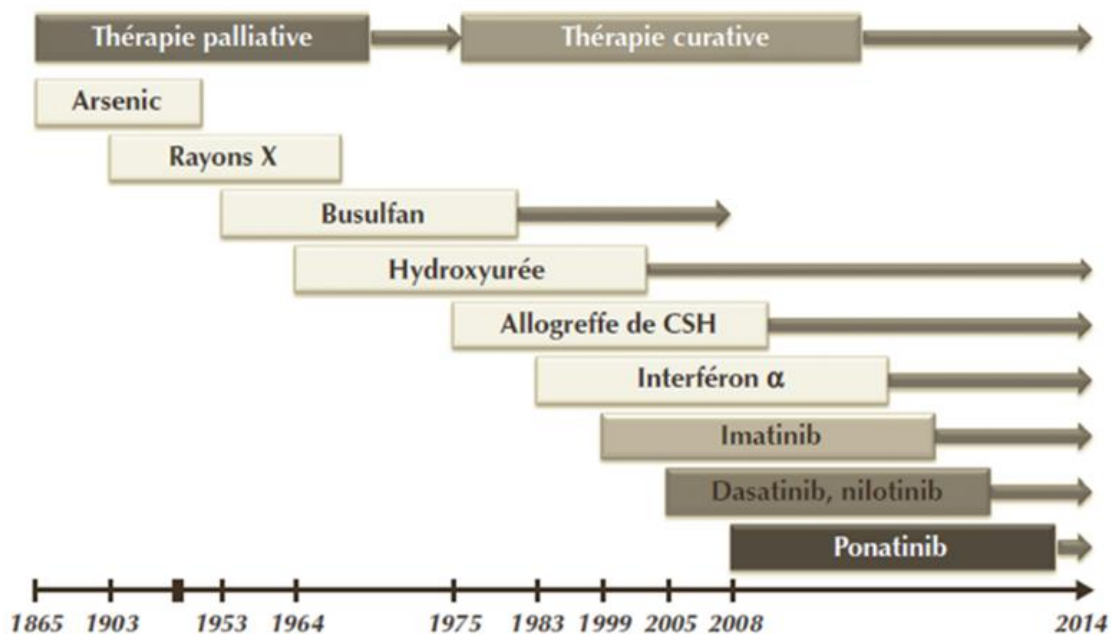


Figure 6 : Historique des traitements de la LMC.(Gonon-Demoulian et al., 2014)

## A. Thérapies non ciblées

### 1. L'arsénite de potassium

Le premier traitement de la LMC a été publié par Heinrich Lissauer en 1865. Il préconisait l'utilisation d'une solution d'arsénite de potassium (titrée à 1 % en trioxyde d'arsenic). Ce produit découvert par Thomas Fowler en 1786 (appelé liqueur de Fowler) a été utilisé pendant plus d'un siècle comme médicament (Goldman, 2010).

### 2. L'irradiation splénique

L'irradiation splénique, utilisée dès la fin du XIXe siècle en tant que traitement palliatif, apportait une amélioration temporaire chez certains patients en phase chronique de leur maladie (Gonon-Demoulian et al., 2014).

### 3. Le busulfan et l'hydroxyurée

La chimiothérapie conventionnelle reposant sur le busulfan (dès les années 1950) ou l'hydroxyurée (années 1970) permettait la normalisation de l'hémogramme. Cependant ces traitements ne permettaient pas de stopper l'évolution naturelle de la maladie vers une

leucémie aiguë. De nos jours encore, l'hydroxyurée est utilisée au diagnostic lorsque le nombre de leucocytes sanguins est élevé ( $>80-100 \times 10^9/L$ ) et poursuivie jusqu'à la confirmation de la présence du chromosome Ph1 et /ou la mise en évidence d'un réarrangement BCR-ABL (Silver et al., 1999).

#### 4. Greffe allogénique de la moelle osseuse

La greffe de Cellules Souches Hématopoïétiques (CSH) allogéniques est une approche de traitement curatif bien établie pour de nombreuses hémopathies malignes grâce à l'effet GvL (*Graft versus Leukemia*) du greffon. En effet, les cellules immunitaires du donneur en reconnaissant les cellules tumorales du receveur vont les détruire (Goldman et al., 1986).

Plusieurs preuves cliniques, établies au cours des 30 dernières années, ont démontré l'existence de GvL et son efficacité remarquable dans la rémission complète de patient de LMC.

L'efficacité des réponses GvL dans l'élimination des tumeurs a été définitivement démontrée par l'utilisation des perfusions de lymphocytes du donneur (IDL : *Infusions of Donor Lymphocytes*) pour traiter la LMC récidivante après la greffe de CSH (Kolb et al., 1990). De plus, les expériences multicentriques en Europe et en Amérique du Nord ont confirmé l'efficacité de l'IDL pour induire un effet GvL (Collins et al., 1997). De ces études cliniques, il est clair que l'IDL est particulièrement efficace dans le traitement de la LMC en phase stable, où des rémissions complètes surviennent chez 75-80% des patients.

La compatibilité tissulaire est impérative et garantit en grande partie la réussite de la transplantation. Il s'agit de la compatibilité entre le greffon et le système HLA (*human leukocyte antigen*) du patient. On parle de compatibilité dans le cas où deux individus ont des codes HLA suffisamment proches pour que la réaction immunitaire induite par la petite différence génétique entre les deux HLA soit maîtrisée par les immunosuppresseurs (la rapamicine, la cyclosporine, les corticostéroïdes et d'autres) et donc que la greffe puisse être acceptée.

#### 5. Les traitements associant l'IFN $\alpha$ (Interféron $\alpha$ )

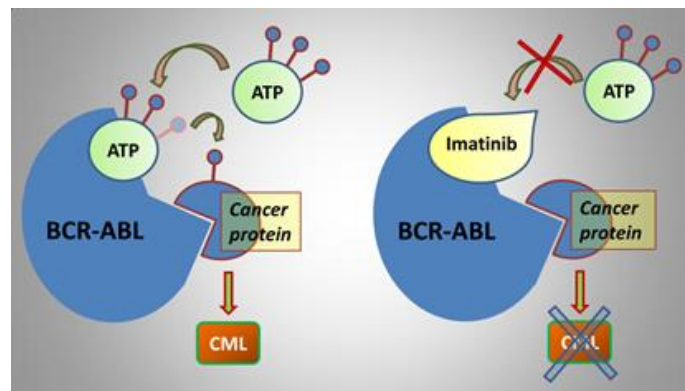
Les traitements associant l'IFN $\alpha$  permettent de stimuler le système immunitaire. Avec une augmentation significative de la survie globale, l'IFN $\alpha$  était le traitement référence, associé

ou non à d'autres drogues, de la LMC dans les années 80, pour les patients non éligibles à la greffe (Talpaz et al., 1983).

## B. Thérapies ciblées : l'ère des ITKs

### 1. ITK de première génération : Imatinib (IM)

Le modèle d'anomalie moléculaire BCR-ABL, à l'origine de la prolifération cellulaire, a permis d'imaginer un traitement ciblé spécifique de la protéine BCR-ABL. Des approches de criblage haut débit de chimiothèque, réalisé par l'industrie pharmaceutique (Novartis®) ont permis d'identifier une molécule inhibitrice de la protéine BCR-ABL, nommée STI 571. Cette molécule sera commercialisée sous le nom de Gleevec™ ou Imatinib. L'IM agit par compétition avec l'ATP (Adénosine triphosphate) au niveau de la poche catalytique de la protéine de fusion BCR-ABL, permettant ainsi une inhibition de son activité enzymatique (Druker et al., 1996) (**Figure 7**).

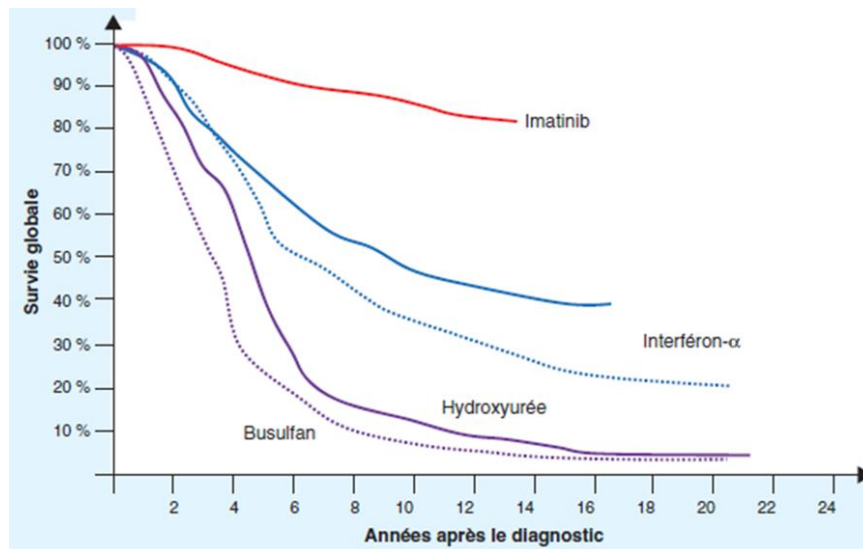


**Figure 7 : Mode d'action de l'imatinib.** D'après (Zaharieva et al., 2013)

Des premiers essais pré-cliniques *in-vitro* ou sur des modèles murins ont montré des résultats très prometteurs. Il s'en est suivi divers essais cliniques de phase I ou II chez l'homme, avec en finalité un essai clinique international de phase III, l'étude IRIS (*International Randomized Study of Interferon versus STI571*). Cette étude compare IM contre IFN $\alpha$  associé à la Cytarabine (O'Brien et al., 2003) et démontre l'avantage significatif de l'IM avec un taux de RHC (Réponse Hématologique Complète) à 18 mois de 96.8% (bras IM) contre 69% (Bras IFN $\alpha$ ) et une survie de 89% à 5 ans dans le bras IM (Figure 8).



Après 6 ans de traitement par IM, pour les patients diagnostiqués en phase chronique, la survie globale est voisine de 90 % (**Figure 8**). L'IM est ainsi devenu le traitement de référence de la LMC et le modèle d'une thérapie ciblée dans le domaine des affections malignes.



**Figure 8 : Probabilité de survie globale de patients de LMC.** L'imatinib a considérablement amélioré la survie des patients atteints de la LMC par rapport à l'utilisation de busulfan, de l'hydroxurée et de l'IFN $\alpha$ . D'après (Kantarjian et al., 2012)

Malgré les résultats apportés par l'IM, des résistances sont rapidement apparues. Ces mutations représentent environ 25% des causes de résistance à l'IM. Plus de 100 mutations ont été répertoriées touchant plus de 70 acides aminés (Ernst et al., 2008a).

Les mutations les plus fréquemment retrouvées sont localisées dans la boucle P, la charnière (T315I), la zone de contact SH2, le site catalytique ou la boucle d'activation (H396P/R).

Ces mutations « faux sens » peuvent altérer des points de liaison entre l'IM et le domaine kinase (perte d'une liaison hydrogène en T315, perte d'une liaison de van der Waals en Y253), et être à l'origine d'un encombrement de l'entrée de la poche ATP (G250), d'une modification de la flexibilité de la boucle P ou d'une déstabilisation de la forme inactive de la protéine (H396) (Reddy and Aggarwal, 2012). La mutation T315I est à l'origine d'une résistance totale à l'IM.

## 2. ITK de deuxième génération : Nilotinib, Dasatinib, Bosutinib

L'émergence de résistance à l'IM, les intolérances au traitement, le manque de réponse chez certains patients a motivé le développement de nouvelles molécules ITKs: Nilotinib (AMN107 ; Tassigna™, Novartis), Dasatinib (BMS-354825 ; Sprycel™, BMS), et Bosutinib (SKI-606 ; Bosulif®, Pfizer)

Les essais cliniques, ENESTnd (*Evaluating Nilotinib Efficacy and Safety in Clinical Trials-Newly Diagnosed Patients*) (Saglio et al., 2010), DASISION (*Dasatinib Versus Imatinib Study In Treatment-Naïve Chronic Myeloid Leukemia*) (Müller et al., 2009), BELA (*Bosutinib Efficacy and Safety in Newly Diagnosed Chronic Myeloid Leukemia*) (Cortes et al., 2012) ont démontré que ces molécules sont plus performantes en termes de rapidité et de profondeur de réponse, ce qui diminue le taux de progression en phase accélérée ou blastique et permet de mieux appréhender l'arrêt du traitement chez des patients en réponse moléculaire majeure.

## 3. ITK de troisième génération : Ponatinib

Le Ponatinib (AP24534 ; Iclusig, ARIAD) répond à une problématique très spécifique de résistance aux ITKs (Figure 9). En effet une mutation T315I confère une résistance à tous les ITKs; avant le Ponatinib, la seule issue, lors de l'émergence d'un clone LMC T315I était l'allogreffe de moelle osseuse. Ce traitement propose également une alternative aux patients intolérants au Dasatinib ou Nilotinib. L'étude PACE (Cortes et al., 2012) montre que 100% des patients avec une T315I atteignent une RHC et 92% une MCyR (réponse cytogénétique complète) après traitement par Ponatinib.

Il est à noter que des mutations composées ne comportant pas la mutation T315I sont à l'origine d'une résistance totale à plusieurs ITK (**Figure 9**). Les mutants V299L/F317L sont résistants à l'IM et au dasatinib. La mutation simple T315M générée par deux mutations séquentielles touchant le même acide aminé (T315I puis I315M) entraîne une résistance globale à tous les ITKs. Ainsi, la présence de ces mutations (observée dans de rares cas) pourrait conduire à une impasse thérapeutique.

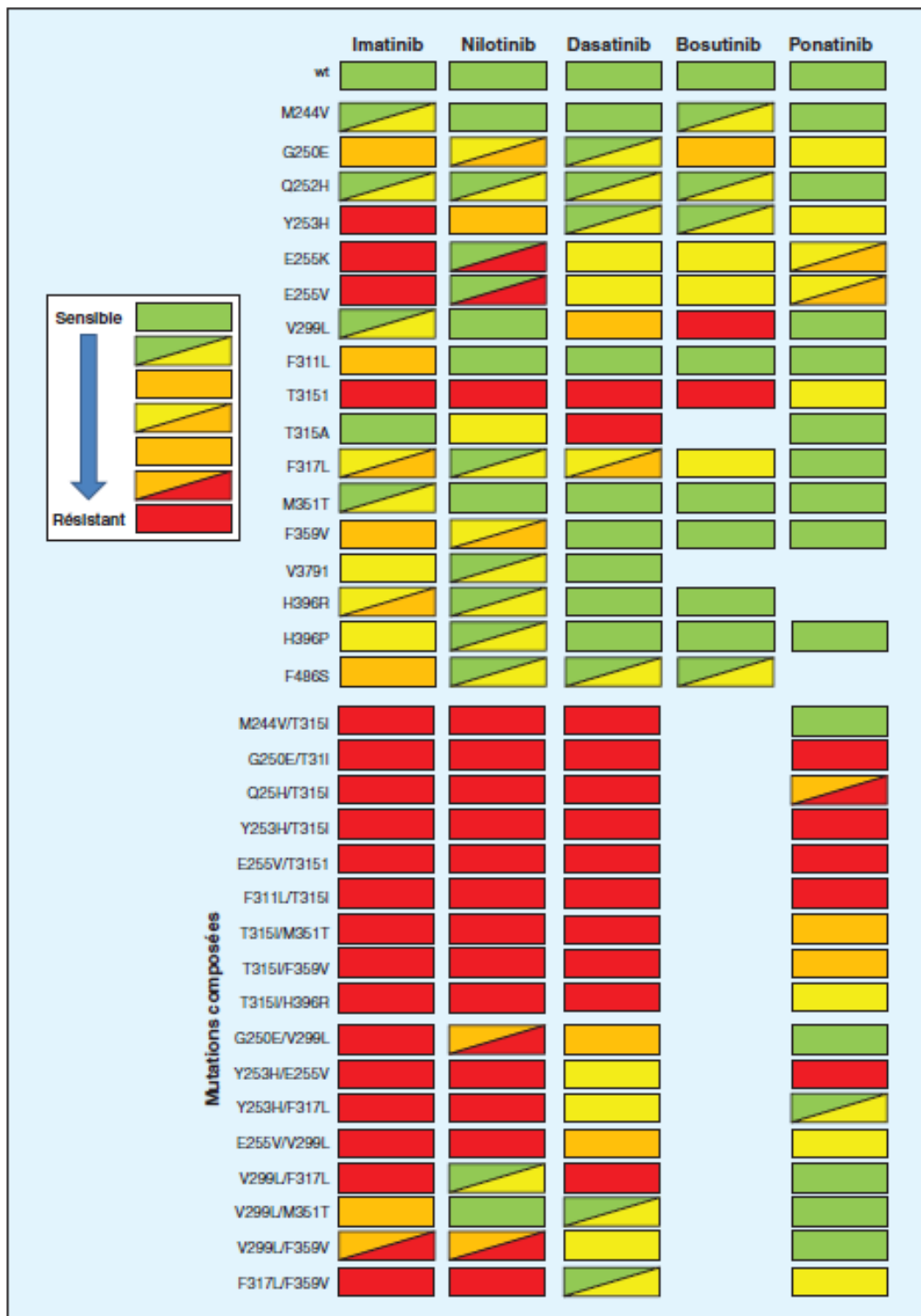
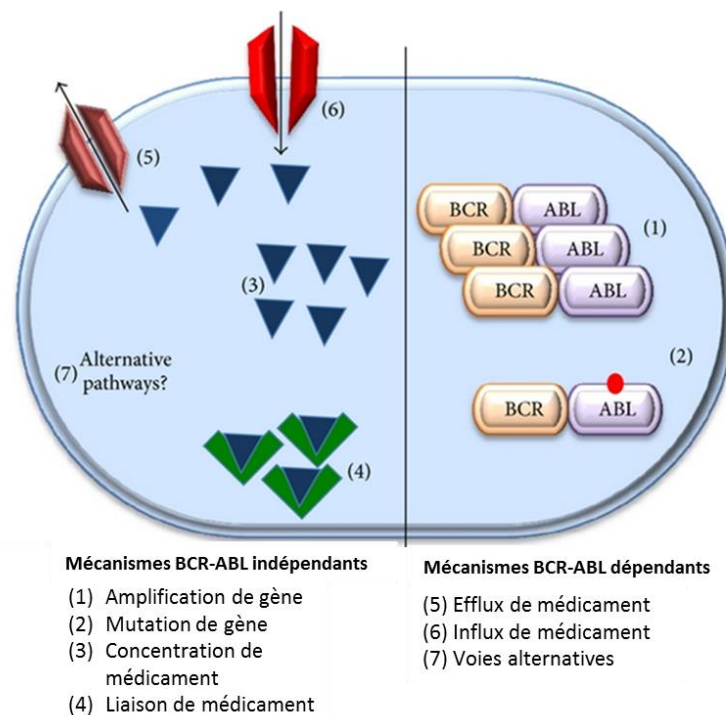


Figure 9 : Activité des inhibiteurs de tyrosine kinase sur les mutants BCR-ABL les plus fréquemment détectés dans le cadre de résistance. (Nathalie et al, 2017)

### C. Modes de résistance au traitement par ITKs

Bien que les ITKs, particulièrement l'IM, aient prouvés leur efficacité et restent une option de choix dans le traitement de première ligne de la LMC, il a été montré l'émergence de résistance primaire ou secondaire (Ernst et al., 2008b) ou d'intolérance sur près d'1/3 des patients (Assouline and Lipton, 2011).

Ces mécanismes biologiques de résistance ont été répartis en 2 groupes: les mécanismes de résistance BCR-ABL dépendants et les mécanismes de résistance BCR-ABL indépendants (**Figure 10**).



**Figure 10 : Mécanismes de résistance aux ITKs** (Hamad et al., 2013)

Dans le premier cas de **résistances BCR-ABL dépendantes**, la résistance implique soit une duplication ou une over-amplification de BCR-ABL conduisant à une surexpression des transcrits BCR-ABL et donc une activité tyrosine kinase accrue, soit l'acquisition de mutations de la séquence nucléotidique codant pour le domaine kinase qui affecte directement la liaison du composé ITK dans la poche de la protéine kinase BCR-ABL (Gorre et al., 2001). Plus de 70 mutations ont été identifiées aujourd'hui grâce aux nouvelles technologies de séquençages d'ADN à haut débit (NGS) (Soverini et al., 2013).

La 2ème catégorie de **résistance BCR-ABL indépendantes** concerne les pompes à efflux ou influx conduisant à une diminution de l'IM intracellulaire et à des séquestrations de l'IM plasmatique. Ainsi, certains polymorphismes ou mutations sont associés à la diminution d'expression des transporteurs de cations organiques (Koren-Michowitz et al., 2014) . Enfin, d'autres voies de signalisation peuvent conduire à l'activation du signal, comme les voies STAT ou les voies Wnt/ $\beta$ catenin, Hedgehog, FoxO impliquées dans le développement cellulaire (O'Hare et al., 2012).

#### D. Effets secondaires des ITKs

Les effets secondaires liés au traitement par ITKs peuvent être divisés en 3 catégories. La première comprend **les effets secondaires majeurs**, de grade 3/4, qui surviennent habituellement pendant la première phase du traitement. Ils sont gérables, mais nécessitent un arrêt temporaire du traitement, une réduction de la dose, et peuvent entraîner l'arrêt du traitement chez environ 10% des patients (Baccarani et al., 2013a)

La deuxième catégorie comprend **les effets secondaires mineurs**, grade 1/2, qui apparaissent en début de traitement, ils peuvent persister et devenir chroniques. Une étude des phases I et II a démontré que parmi les patients traités avec le bosutinib, 42% avaient une thrombocytopenie et 28% avaient une anémie (Kantarjian et al., 2014). Ces toxicités sont gérées avec une réduction de la dose ou un arrêt temporaire du traitement.

**Les complications tardives**, dites «hors cible», qui peuvent affecter le système cardiovasculaire, le système respiratoire, le foie, le pancréas, et les défenses immunitaires (Kerkelä et al., 2006). Tous les ITKs peuvent être toxiques pour le cœur et doivent être utilisés avec une grande prudence chez les patients souffrant d'insuffisance cardiaque. Le nilotinib a été associé à des pathologies artérielles, périphériques et coronaires. Le dasatinib a été associé à des complications de la plèvre et des poumons. Les données sur le ponatinib sont rares.

Dans l'ensemble, les complications à long terme des ITKs de deuxième génération ne sont pas encore entièrement comprises et évaluables. Parce que ces complications sont une cause potentielle de morbidité et de mortalité, une surveillance clinique continue des patients est requise.

### III. Stratégie d'arrêt du traitement par des ITKs

Les ITKs présentent des nombreux effets secondaires dus à la prise à long terme et présentent un coût important, c'est pourquoi aujourd'hui est envisagé un arrêt du traitement après rémission.

Différents niveaux de réponse ont été définis dans le traitement de la LMC: la RHC correspondant à une normalisation de la numération sanguine, la Réponse Cytogénétique Complète (CCyR) ou Partielle (PCyR) correspondant respectivement à la détection de 0% ou entre 1 et 35% de chromosome Ph1 (**Tableau 1**). Ce suivi permet d'adapter le traitement selon les recommandations de l'ELN (*European Leukemia Net*) (Baccarani et al., 2013b).

Avec les nouvelles techniques sensibles de biologie moléculaire de PCR quantitative, la quantification du niveau de transcrits BCR-ABL est reportée par le ratio du nombre de transcrits BCR-ABL sur 100 transcrits ABL sur une échelle internationale IS (*International scale*) (**Tableau 1**).

**Tableau 1: Niveau de réponse au traitement de la LMC.** (Mahon and Etienne, 2014)

Réponse hématologique	RHC	Réponse hématologique complète		
			Leucocytes < 9 G/L, formule normale, taux de plaquettes < 450 G/L Disparition des symptômes et signes cliniques de la maladie (notamment la splénomégalie)	
Réponses cytogénétiques	RCyC	Réponse cytogénétique complète	Ph1 0 %	
	RCyP	Réponse cytogénétique partielle	Ph1 [1 %-35 %]	
	RCyM	Réponse cytogénétique majeure	RCyC + RCyP, Ph1 < 35 %	
	RCym	Réponse cytogénétique mineure	Ph1 [36 %-65 %]	
		Réponse cytogénétique minime	Ph1 [66 %-95 %]	
		Pas de réponse cytogénétique	Ph1 > 95 %	
Réponses moléculaires	RMM	Réponse moléculaire majeure	$BCR-ABL1/ABL1^{IS} \leq 0,1 \%$	
	RM <sup>4</sup>	Réponse moléculaire profonde	RQ-PCR positive	$BCR-ABL1/ABL1^{IS} \leq 0,01 \%$ avec copies <i>ABL1</i> > 10 000
			RQ-PCR négative	Copies <i>ABL1</i> [10 000–31 999]
	RM <sup>4.5</sup>	Réponse moléculaire profonde	RQ-PCR positive	$BCR-ABL1/ABL1^{IS} \leq 0,0032 \%$ avec copies <i>ABL1</i> > 32 000
			RQ-PCR négative	Copies <i>ABL1</i> [32 000–99 999]
	RM <sup>5</sup>	Réponse moléculaire profonde	RQ-PCR positive	$BCR-ABL1/ABL1^{IS} \leq 0,001 \%$ avec copies <i>ABL1</i> > 100 000
RQ-PCR négative			Copies <i>ABL1</i> > 100 000	

A partir de ce ratio, il est permis d'établir la Réponse Moléculaire Majeure (RMM ou RM3.0) correspondant à une réduction de 3 Log. La disposition d'ITKS de nouvelle génération permet d'atteindre des niveaux de réponse supérieurs à 3 Log : la réponse moléculaire profonde (RM4.0 à RM5.0).

La réponse aux traitements ITKs sera évaluée selon le ratio BCR-ABL/ABL tous les trois mois après le début du traitement (sur des prélèvements du sang ou de la moelle) (**Tableau 2**).

En fonction de ce ratio, le clinicien adapte le traitement d'ITK pour le patient.

**Tableau 2 : Réponses hématologiques, cytogénétiques et moléculaires au cours du traitement par inhibiteurs de tyrosine kinase. D'après (Baccarani et al., 2015)**

A- Traitement par ITK première ligne			
Durée du traitement	Réponse optimale	Alertes	Échec du traitement
3 mois	$BCR-ABL1/ABL1^{IS} \leq 10\%$ ou Ph1 $\leq 35\%$	$BCR-ABL1/ABL1^{IS} > 10\%$ ou Ph1 $35\% - 95\%$	Pas de RHC ou Ph1 $> 95\%$
6 mois	$BCR-ABL1/ABL1^{IS} \leq 1\%$ ou Ph1 = 0	$BCR-ABL1/ABL1^{IS} 1\% - 10\%$ ou Ph1 $1\% - 35\%$	$BCR-ABL1/ABL1^{IS} > 10\%$ ou Ph1 $> 35\%$
12 mois	$BCR-ABL1/ABL1^{IS} \leq 0,1\%$	$BCR-ABL1/ABL1^{IS} 0,1\% - 1\%$	$BCR-ABL1/ABL1^{IS} > 1\%$ ou Ph1 $\geq 1\%$
B- Traitement par ITK seconde ligne			
Durée du traitement	Réponse optimale	Alertes	Échec du traitement
3 mois	$BCR-ABL1/ABL1^{IS} \leq 10\%$ ou Ph1 $< 65\%$	Ph1 $65\% - 95\%$	Pas de RHC, $BCR-ABL1/ABL1^{IS} > 10\%$ , Ph1 $> 95\%$ Nouvelles mutations *
6 mois	$BCR-ABL1/ABL1^{IS} \leq 10\%$ ou Ph1 $\leq 35\%$	Ph1 $35\% - 65\%$	$BCR-ABL1/ABL1^{IS} > 10\%$ , Ph1 $> 65\%$ Nouvelles mutations *
12 mois	$BCR-ABL1/ABL1^{IS} \leq 1\%$ ou Ph1 = 0	$BCR-ABL1/ABL1^{IS} 1\% - 10\%$ ou Ph1 $1\% - 35\%$	$BCR-ABL1/ABL1^{IS} > 10\%$ , Ph1 $> 35\%$ Nouvelles mutations *

Un premier essai d'arrêt de l'IM chez des patients avec transcrits BCR-ABL indétectables depuis plus de 2 ans, avait montré sa faisabilité (Rousselot et al., 2007).

Le protocole STIM (*Stop imatinib*) a ensuite été initié par l'intergroupe français de la LMC (Fi-LMC) avec comme promoteur le CHU (Centre hospitalier universitaire) de Bordeaux. Il comprenait les deux critères suivants:

1-Traitement par IM pendant au moins 3 ans.

2-Obtention d'une réponse moléculaire profonde (RT-qPCR négative,  $\geq RM5$ ) et stable pendant au moins 2 ans.

Après arrêt, le ratio BCR-ABL/ABL était vérifié tous les mois pendant la première année. La rechute moléculaire était définie comme une repositivation du rapport BCR-ABL1/ABL, vérifiée sur un deuxième prélèvement. Le traitement par IM était alors repris. Cette étude avait porté sur 100 patients, dont la moitié avait été préalablement traitée par IFN $\alpha$  (Mahon et al., 2010a). Une rechute moléculaire a été observée chez 60 % des patients, le plus souvent dans les 7 premiers mois. Il est à noter que les patients en rechute moléculaire sont restés sensibles à l'IM ou à un autre ITK (nilotinib, dasatinib). Chez les patients demeurant en

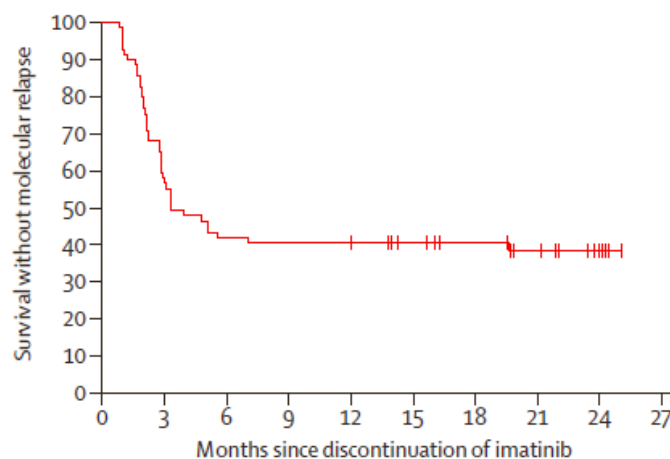
rémission moléculaire profonde (40 %), celle-ci semble se prolonger sans rechute au-delà de 5 ans.

D'autres essais thérapeutiques d'arrêt des ITKs sont en cours comme l'essai français STIM 2 ou l'essai européen EUROSKI (*European stop kinase inhibitor*). Ils comportent quelques différences dans le protocole expérimental (notamment dans les critères de reprise du traitement), mais les résultats préliminaires vont dans le même sens que l'essai STIM (*Clinical Trial : NCT01596114*).

#### IV. Rechute de patients après arrêt de traitement par des ITKs

La première étude pilote (Rousselot et al., 2007) a été initiée chez 12 patients de LMC en phase chronique, traités par IM à la dose standard qui avaient atteint et maintenu un niveau de réponse RMC (RM5.0) pendant au moins 2 ans.

Après un suivi de 18 mois, 50% des patients n'ont pas rechuté et sont toujours à un niveau RM5.0, 6 ans après (**Figure 11**). Ces résultats ont été confirmés par l'étude multicentrique française STIM (Mahon et al., 2010b), ainsi que de nombreuses autres études internationales (Breccia and Alimena, 2014).



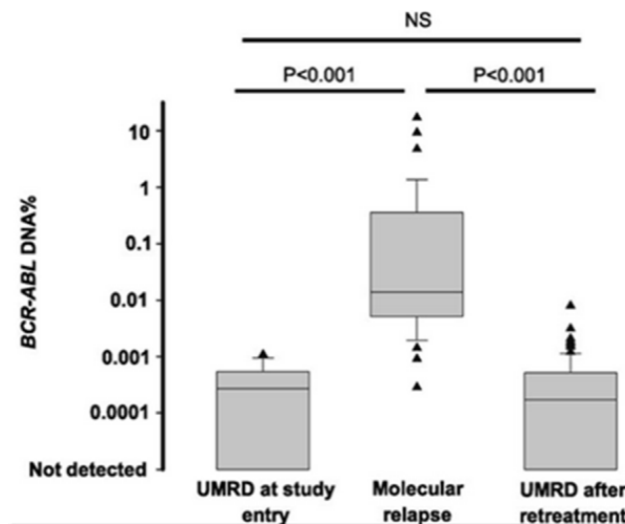
**Figure 11 : Courbe de Kaplan-Meier.** Pourcentage de la survie de 12 patients après arrêt du traitement par l'IM en fonction du temps (Mahon et al., 2010a)

Il a cependant été démontré, par PCR sur l'ADN génomique, la persistance d'un signal BCR-ABL chez les patients en RMC après arrêt du traitement par IM (Bartley et al., 2010). Cela suggère un niveau faible, résiduel, persistant des cellules leucémiques, pouvant être potentiellement réactivé. Une partie des Cellules Souches Leucémiques (CSL) quiescentes ou



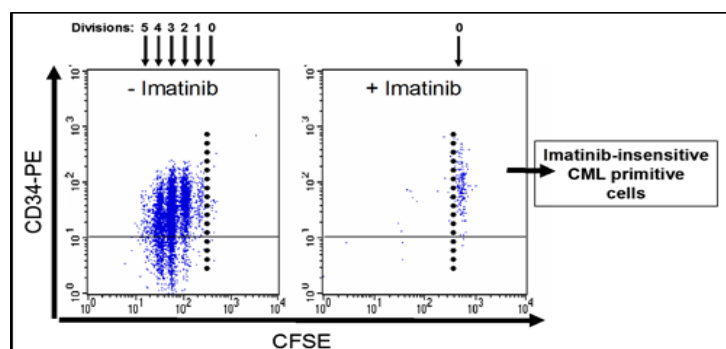
dormantes, et donc ne métabolisant que faiblement les ITKs sont la source de cette MRD (*Minimal Residual Disease*).

En effet, chez des patients en RM5.0 avec un signal BCR-ABL indétectable, quantifié par RT-qPCR à partir de l'ARN, mais il est encore possible de détecter ce signal au niveau génomique (**Figure 12**), avec des techniques de PCR sensibles sur ADN (Ross et al., 2013a).



**Figure 12 : Niveau de détection de BCR-ABL chez 13 patients.** Par PCR sur l'ADN extrait des cellules de la moelle des patients atteint de la LMC avant et après la rechute et après retraitement. UMRD (undetectable minimal residual disease) (Ross et al., 2013a).

Plusieurs causes permettent d'expliquer la résistance d'une fraction de CSL aux ITKs : la quiescence ou dormance des CSL. Ces cellules ne se divisent pas, et par conséquent ne sont pas sensibles aux ITKs (**Figure 13**) (Graham et al., 2002). De plus, un haut niveau d'expression de BCR-ABL et leur indépendance à l'oncogène permettent leur persistance.



**Figure 13 : Suivi de la prolifération des cellules souches après le traitement par l'IM.** Marquage CFSE (*CarboxyFluorescein Succinimidyl Ester*) en cytométrie en flux (CMF), sur des CSL CD34+, cultivées *in-vitro* avant et après un traitement par IM. (Graham et al., 2002)

## A. Ciblage de la CSL par des inhibiteurs de voies de signalisations

Il convient donc de cibler la CSL-LMC résiduelle afin de tendre vers une éradication de la maladie.

Les études des différentes voies de signalisation ont permis de mieux comprendre comment les CSL survivent en échappant aux ITKs. Cela permet d'identifier et de proposer de nouvelles molécules cibles anti-leucémiques (**Figure 14**) (Hamad et al., 2013).

Ainsi, le Zileuton, un inhibiteur de l'activité enzymatique d'**Alox5** (Arachidonate 5-lipoxygénase) surexprimé dans la CSL, induit la mort et prolonge la survie des souris dans un modèle de LMC (Chen et al., 2009).

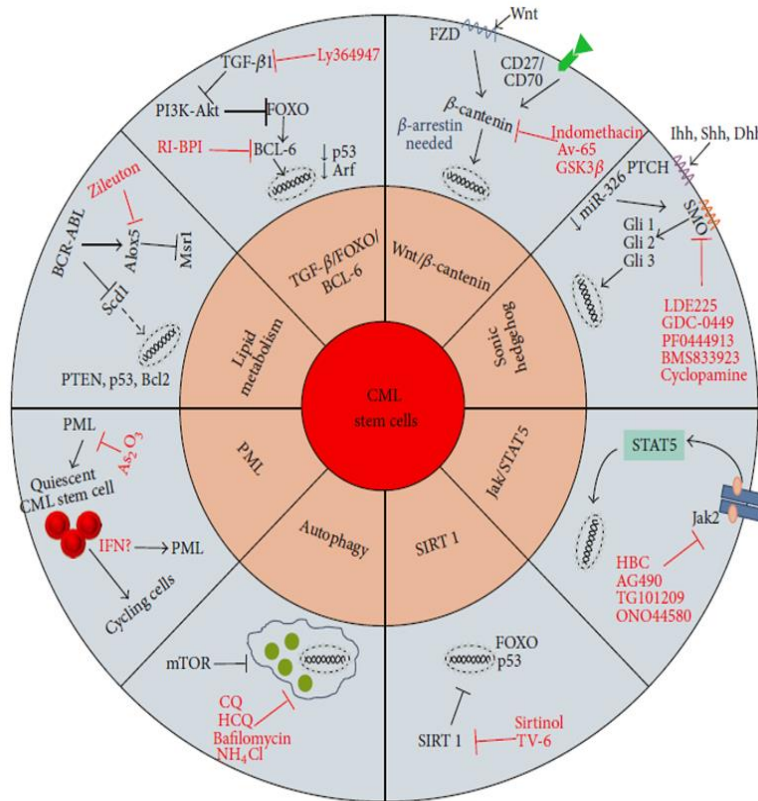
La **voie canonique Wnt/ $\beta$ -catenin** joue un rôle majeur dans le développement embryonnaire et l'auto-renouvellement des cellules souches. La  $\beta$ -catenin est surexprimée dans les CSL, et son inactivation par le GSK3 $\beta$  ou AV65 induit une inhibition de leur prolifération.

Une autre voie de signalisation, la **voie Sonic Hedgehog**, est particulièrement active dans le développement embryonnaire et est suractivée dans les CSL. De nombreux inhibiteurs de protéines impliquées dans cette voie sont en cours d'étude, comme LDE225 (Sonidegib) et GDC-0449 (Vismodegib).

La signalisation BCR-ABL active **mTOR**, un inhibiteur de l'autophagie qui permet d'éliminer et recycler les composants cellulaires dans les lysosomes. L'inhibition de l'autophagie au sein des CSL leur confère une résistance aux ITKs. Ainsi le ciblage de cette voie par des inhibiteurs de l'autophagie comme Cloroquine-CQ et Bafilomycine, permet de restaurer une sensibilité des CSL aux ITKs.

De plus, BCR-ABL active les voies de signalisation **JAK/STAT**, **TGF $\beta$ /FOXO/BCL6** (voie PI3K/AKT), ce qui induit la prolifération, la différenciation et l'inhibition de l'apoptose. L'inhibition de JAK2 ou de la **voie TGF- $\beta$**  (*Transforming Growth Factor- $\beta$* ), via BCL-6, conduit respectivement à la réduction de l'oncogenèse induite par BCR-ABL ou à la sortie de l'état de quiescence des CSL, les rendant plus sensibles aux ITKs (Walz et al., 2012).

**STAT5** est également une cible intéressante pour éliminer les CSL. En effet, des souris STAT5 *knock-out* ne développent pas de LMC. Ce qui prouve l'implication de STAT5 dans l'oncogenèse induite par BCR-ABL (Wang et al., 2011).



**Figure 14 : Voies de signalisation alternatives ciblées pour palier à la résistance de la CSL aux ITKs** Sonic hedgehog (Shh), Indian hedgehog (Ihh), Desert hedgehog (Dhh), Smoothened (Smo), STAT5 (signal transducer and activator of transcription), retroinverso BCL6 peptide inhibitor (RI-BPI), chloroquine (CQ), hydroxychloroquine (HCQ), Sirtuin 1 (SIRT1), tenovin-6 (TV-6), Arachidonate 5-lipoxygenase (*Alox5*), stearoyl-CoA desaturase 1 (*Scd1*), promyelocytic leukemia protein (PML), arsenic trioxide ( $As_2O_3$ ), and Interferon-alpha ( $IFN\alpha$ ). (Hamad et al., 2013)

## B. Evidence de l'intervention du système immunitaire

L'importance de l'intervention du système immunitaire dans la réponse anti-tumorale en général et dans le traitement de la LMC en particulier est bien connue. Cela a été démontré à travers l'allogreffe de CSH, la DLI (*Donor Lymphocytes Infusion*) et l'utilisation de l' $IFN\alpha$  en traitement de première ligne de la LMC. L' $IFN\alpha$  est d'ailleurs aujourd'hui testé de nouveau en association avec d'autres traitements (Ross et al., 2013b).

Il a été montré que la proportion de cellules NK (*Natural Killer*) est diminuée chez des patients LMC (Chen et al., 2012), et que les cellules NKT (*Natural Killer T*) ne sont pas fonctionnelles (Rossignol et al., 2012). De plus, d'autres études ont montré que les LT régulateurs sont élevés chez certains patients atteints de la LMC (Christiansson et al., 2013).

Enfin, il a été démontré que la persistance de la RMC 5.0 chez certains patients après arrêt du traitement par ITKs était corrélée à l'abondance et à la fonctionnalité des cellules NK, ainsi qu'à la présence de lymphocytes cytotoxiques dirigés contre l'oncoprotéine BCR-ABL (Yoshimoto et al., 2014).

Les inhibiteurs de *checkpoints* immunologiques comme Ipilimumab, un anti-CTLA4 et Nivolumab, un anti-PD-1 (*Programmed death-1*) testés dans les tumeurs solides peuvent être de bons candidats pour stimuler le système immunitaire dans les pathologies hématologiques (Wolchok et al., 2013).

### 1. Antigènes tumoraux de la LMC

L'antigène principal de la LMC est l'**oncoprotéine de fusion BCR-ABL** qui est cytoplasmique, est plus particulièrement les peptides endogènes présentés à la surface des CSL par le CMH (Complexe majeur d'histocompatibilité) de classe I (Bocchia et al., 2005).

La **protéine WT1** (*Wilms tumor protein*) facteur de transcription en doigt de zinc surexprimé dans la cellule leucémique est également une cible intéressante (Gerber et al., 2011). De plus, la **téломérase**, **ELA2** (Elastase), **PRAME** (*Preferentially Expressed Antigen of Melanoma*), et **Aurora-A kinase** sont des antigènes capables de générer des réponses T cytotoxiques et peuvent être des cibles intéressantes dans des stratégies de vaccination peptique.

### C. Caractéristiques des cellules souches hématopoïétiques

Le premier marqueur de surface cellulaire utilisé pour enrichir les CSH humaines était le CD34, un ligand de la L-sélectine qui n'est exprimé que par 0,5 à 5% des cellules sanguines dans le foie fœtal humain, le sang de cordon et la moelle osseuse d'un sujet adulte (Krause et al., 1996). Des essais *in-vitro* ont révélé que presque toutes les cellules CD34+ (CD: Cluster de différentiation) avaient une activité multiple ou une oligo-activité, mais aussi que la population était encore très hétérogène (**Figure 15**).

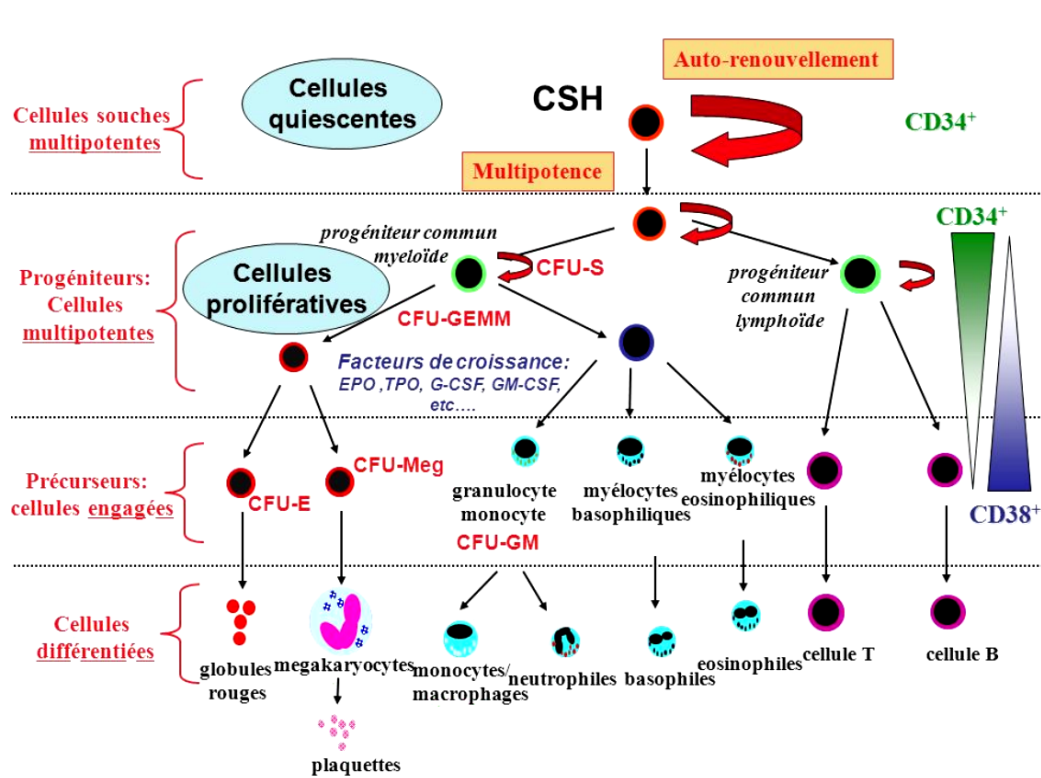
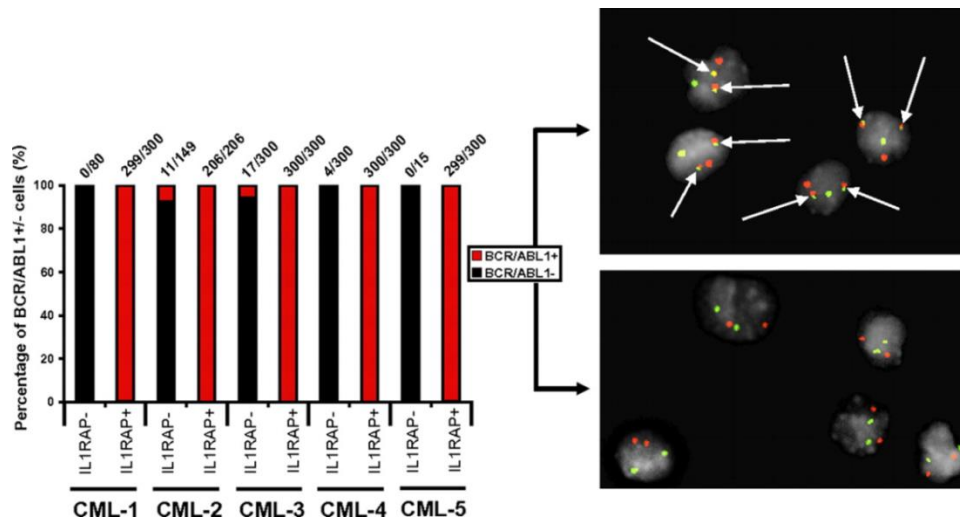


Figure 15 : Expression de CD34 et de CD38 par les cellules hématopoïétiques durant les différents stades de différenciation cellulaire. D'après (Juneau et al., 2016)

Un enrichissement supplémentaire des CSH humaines dans la population CD34<sup>+</sup> a été obtenu par l'expression différentielle du marqueur de surface CD38. Bien que la plupart des cellules CD34<sup>+</sup> (90-99%) co-expriment CD38, les cellules qui peuvent donner à la fois des cellules lymphoïdes et myéloïdes résident dans la fraction CD38 faible à négative et la fraction CD90<sup>+</sup> (Hao et al., 1996).

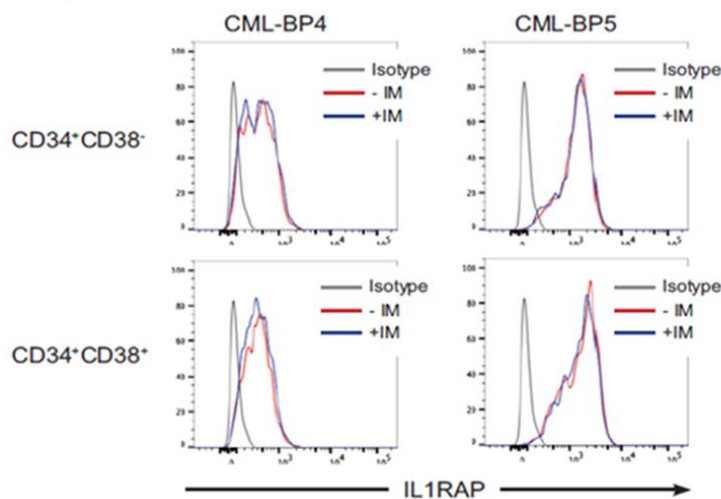
#### D. Identification des CSL exprimant la protéine IL-1RAP

Jaras et al. ont démontré la possibilité de distinguer les CSL CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>/BCR-ABL<sup>+</sup> des CSH normales CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>/BCR-ABL<sup>-</sup> par l'expression membranaire de la protéine IL-1RAP (*Interleukin-1 Receptor Accessory Protein*), dans la LMC. Car l'expression d'IL-1RAP par les CSL est liée à la présence du gène de fusion BCR-ABL (**Figure 16**) (Järås et al., 2010).



**Figure 16 :** L'expression d'IL-1RAP distingue les cellules souches CD34+CD38- normales (BCR/ABL) des cellules souches leucémiques (BCR/ABL+), sur des prélèvements de la moelle osseuse de patients atteints de la LMC. Pourcentage des cellules IL-1RAP+ ou IL-1RAP- en fonction de la présence de BCR-ABL (colonne en couleur rouge) ou son absence (colonne en couleur noir), sur 5 patients. La FISH Flow-drop sur les cellules leucémiques. Coloration du gène BCR en vert, du gène ABL en rouge, et du gène de fusion BCR-ABL en jaune (Järås et al., 2010)

Le traitement de CSL CD34+CD38- ou CD34+CD38+ par l'IM n'induit pas une diminution de l'expression de la protéine IL-1RAP (**Figure 17**).



**Figure 17 :** Expression d'IL-1RAP par les CSL de patients atteints de LMC. Marquage d'IL-1RAP en cytométrie en flux avant et après traitement par IM (IL-1RAP en couleur rouge et l'isotype en couleur gris) sur des cellules des CSL CD34+CD38- ou CD34+CD38+ de la moelle osseuse de deux patients atteints de la LMC en phase blastique (BP) (Ågerstam et al., 2016).

L'anti-IL-1RAP bloque la prolifération des CSL de LMC et induit une cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps (ADCC) (Järås et al., 2010). De plus, l'anti-IL-1RAP inhibe la croissance des cellules leucémiques *in-vitro* et *in-vivo* dans un modèle de xénogreffe chez la souris (Ågerstam et al., 2016).

## E. Protéine accessoire au récepteur de l'interleukine-1 (IL-1RAP)

### 1. Définition d'IL-1RAP

L'IL-1RAP (également appelée IL-1RAcP, IL-1R3 ou C3orf13) est une protéine codée par le chromosome 3q28.

Elle appartient à la famille des protéines de l'interleukine-1 (IL-1). C'est une protéine associée aux récepteurs d'IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , et IL-33.

Il y a six formes d'épissage alternatif connues pour IL-1RAP. Cette protéine existe sous deux formes, **une forme membranaire** (variant 1, 3, 4 et 6) et **une forme soluble sécrétée** (variant 2 et 5).

La forme membranaire d'IL-1RAP induit un signal intracellulaire après sa liaison à l'IL-1. Alors que la forme soluble a un effet neutralisant de l'IL-1 (Figure 18) (Smith et al., 2003).

### 2. Fonction d'IL-1RAP

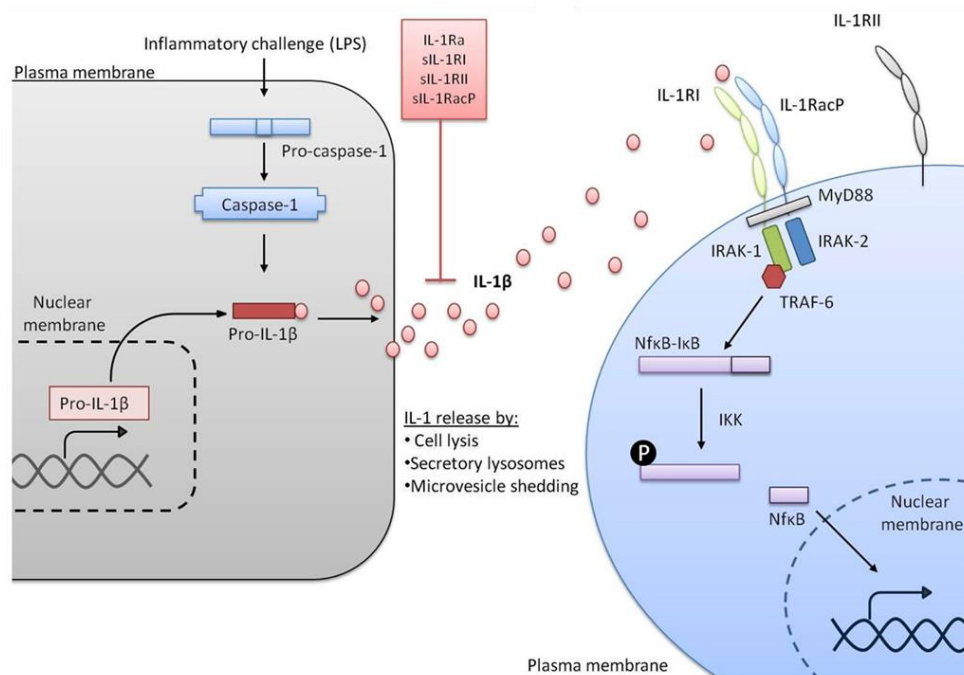
Les cytokines de la famille de l'IL-1 sont sécrétées très tôt au cours de la réponse immunitaire par les cellules dendritiques, les monocytes et les macrophages. La sécrétion d'IL-1 est stimulée par la reconnaissance d'antigènes viraux, parasitiques ou bactériens par les récepteurs de l'immunité innée. Les cytokines membres de la famille de l'IL-1 (IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ ) sont généralement pro-inflammatoires, ce qui signifie qu'elles induisent une augmentation de la perméabilité des capillaires au site de sécrétion de la cytokine, ainsi qu'une amplification de la migration des leucocytes vers les tissus infectés (Chackerian et al., 2007).

L'IL-1 peut être stockée sous la forme d'un précurseur (Pro-IL-1 $\beta$ ) qui est ensuite hydrolysé en IL-1 $\beta$  par l'enzyme de conversion de l'IL-1 ou caspase I.

La liaison d'IL-1 $\beta$  à son récepteur IL-1RI (*IL-1 Receptor I*) (**Figure 18**) induit une modification conformationnelle du domaine TIR (*Toll/IL-1 Receptor*) du récepteur, ce qui

permet la liaison de la molécule adaptatrice MyD88 (*Myeloid Differentiation primary response 88*) via son domaine TIR. MyD88 recrute une ou plusieurs kinases IRAK (*IL-1 Receptor Activated Kinases*) sur le complexe du récepteur et conduit finalement à l'activation du facteur de transcription NF- $\kappa$ B (*Nuclear factor-kappa B*) et AP-1 (*Activator Protein-1*) impliqués dans l'induction de la prolifération, la différenciation et la sécrétion des facteurs de croissance cellulaires (Chackerian et al., 2007). Par contre, la liaison d'IL-1 $\beta$  sur son récepteur IL-1RII n'induit pas une signalisation car l'IL-1RII est dépourvu du fragment intracellulaire TIR.

L'IL-1Ra (*IL-1 receptor antagonist*) a un effet qui s'oppose aux effets de l'IL-1 $\beta$  en entrant en compétition avec l'IL-1RI. De plus, les formes solubles d'IL-1RI (sIL-1RI), d'IL-1RII (sIL-1RII), et d'IL-1RAP (sIL-1RAP) ont un effet inhibiteur. Elles peuvent se lier à l'IL-1 $\beta$  et par conséquent, empêchent sa fixation sur son récepteur membranaire IL-1RI (Chackerian et al., 2007).



**Figure 18 : Production et signalisation de l'IL-1.** IL-1Ra : Interleukine-1 antagoniste, sIL-1RI : Récepteur I d'IL-1 soluble, sIL-1RII : Récepteur II d'IL-1 soluble, sIL-1RacP : Protéine accessoire au récepteur d'IL-1 (Murray et al, Front. Cell. Neurosci., 2015).



## Chapitre 2 : Immunothérapie cellulaire du cancer par des «CART-cells»

### I. Historique de l'immunothérapie

Utiliser le système immunitaire pour lutter contre le cancer n'est pas une nouvelle approche. En 1891, un chirurgien américain nommé William B. Coley qui opérait des patients atteints de carcinomes osseux, a pour la première fois utilisé cette approche en injectant des bactéries directement dans une tumeur inopérable de l'un de ses patients (Coley, 1891).

Cette époque précédait l'avènement de la chimiothérapie et de la radiothérapie dans le traitement du cancer, les cliniciens avaient alors peu de choix. En se basant sur le succès initial de ce traitement expérimental, Coley et d'autres médecins ont poursuivi cette forme d'immunothérapie pendant plusieurs années pour traiter des cancers agressifs en utilisant des bactéries ou produits bactériens qui seront connus sous le nom de «toxines de Coley». Des rémissions et même l'éradication de tumeurs consécutives à l'utilisation de cette technique ont été publiées (Coley, 1991). Ils ont néanmoins rencontré un certain scepticisme laissant place par la suite à la chimio- ou radiothérapie.

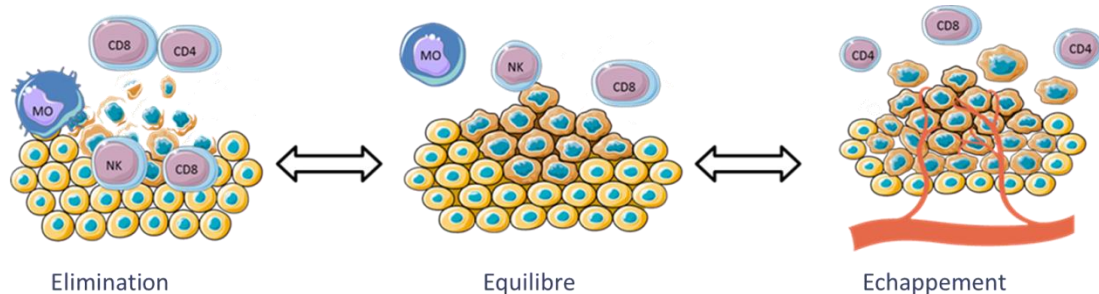
Néanmoins, il est admis aujourd'hui que les observations de Coley étaient pertinentes. Ses résultats étaient vraisemblablement dus à une stimulation de la réponse immunitaire anti-tumorale du patient consécutivement à l'infection ou à la présence de produits bactériens immunostimulants.

Par la suite, Paul Ehrlich postula au début des années 1900 que les cellules tumorales devaient exprimer des structures antigéniques pouvant être reconnues par le système immunitaire. Ce système de défense permettait, selon lui, d'expliquer la faible émergence de cellules tumorales. Dans les années 70, Sir Mac Farlane Burnet et Lewis Thomas ont officiellement formulé la théorie d'immunosurveillance des tumeurs (Burnet, 1957).

#### A. La théorie de l'immunosurveillance des tumeurs

Aujourd'hui, la théorie des 3E (Élimination, Équilibre, et Échappement) proposée par Robert Schreiber a prolongé et revisité la théorie de l'immunosurveillance, en stipulant que l'interaction entre le système immunitaire et la cellule tumorale peut conduire à l'élimination de la tumeur, à un état d'équilibre (maîtrise de la prolifération des cellules tumorales sans

éradication) ou à un échappement de la cellule tumorale au contrôle immunologique (Schreiber et al., 2011). Cette dernière phase est la seule visible cliniquement, ce qui conduit à penser que le système immunitaire est devenu inefficace pour contrôler la croissance tumorale (Figure 19).



**Figure 19 : la théorie de l'immunosurveillance de la tumeur.**

### 1. Phase d'élimination

Une tumeur primaire ayant atteint une certaine taille, se vascularise (Hanahan and Folkman, 1996) et devient invasive dans le tissu environnant causant des lésions de celui-ci, ce qui induit la production de facteurs inflammatoires. Plusieurs cellules du système immunitaire inné et adaptatif, comme les cellules NK, les LT (Girardi et al., 2001) iront infiltrés la tumeur. Ces cellules peuvent être stimulés par des molécules exprimées à la surface des cellules tumorales, produire de l'IFN $\gamma$  et être cytotoxiques (Smyth et al., 2001).

### 2. Phase d'équilibre

Des preuves indirectes, basées sur des observations cliniques, proposent la présence d'une phase d'équilibre entre le système immunitaire et les tumeurs. Il apparaît que chez certains patients, des tumeurs pourraient rester «en dormance» pendant plusieurs années (parfois même plus de 10 ans) avant qu'une rémission ou un échappement du cancer ne soit observé (Demicheli et al., 1996).

### 3. Phase d'échappement

Au cours de la dernière phase de l'immunosurveillance des cancers, les cellules tumorales deviennent insensibles au système immunitaire par différents mécanismes et vont proliférer de manière incontrôlée. Les causes de cet échappement sont les suivantes :

**-Absence de signaux de danger pour le système immunitaire** : En effet, les LT rencontrant les antigènes tumoraux en absence des signaux appropriés de co-stimulation, entreraient en anergie voire en apoptose perdant ainsi leur potentiel à répondre aux tumeurs (Gallucci et al., 1999). Plusieurs études renforcent cette idée que les tumeurs elles-mêmes sont capables d'induire une tolérance périphérique (Willimsky and Blankenstein, 2005).

**-Les LT régulateurs ou suppresseurs.** Parmi eux, se trouvent les cellules NKT (Terabe et al., 2000). On peut aussi citer les **lymphocytes Treg** CD4+CD25+ (Terabe and Berzofsky, 2004) qui sécrètent des cytokines suppressives tel que l'IL-10 (Interleukine-10), le TGF- $\beta$  ou l'IL-35, en consommant de l'IL-2, ce qui limite la prolifération des autres lymphocytes par un effet de compétition.

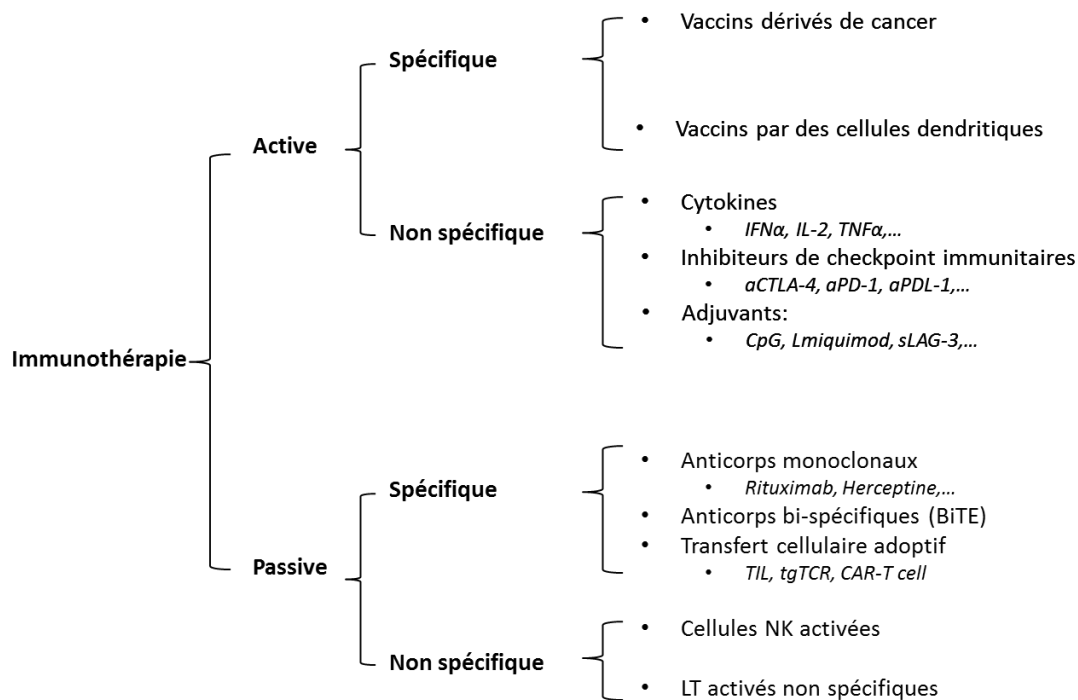
**-L'expression des molécules inhibitrices des LT** comme par exemple PDL-1 retrouvé à la surface de certaines cellules tumorales. Il est également nommé CD274 ou B7-H1 (Dong et al., 2002).

**-La diminution de l'expression des molécules de CMH** à la surface des cellules tumorales (Campoli et al., 2002).

La tumeur peut aussi relarguer des cytokines immunosuppressives telles que le TGF- $\beta$  ou l'IL-10 (Elgert et al., 1998). Elle peut aussi, **produire des molécules MIC** (*Major histocompatibility complex class I chain*) **solubles** qui provoqueraient une diminution de l'expression de la molécule stimulatrice NKG2D (*Natural killer Group 2 member D*) en surface des NK ou de divers LT tels que les LT- $\gamma\delta$  (Groh et al., 2002).

## B. Types d'immunothérapie

L'immunothérapie ne vise pas directement la tumeur. Elle agit principalement sur le système immunitaire du patient pour le rendre apte à attaquer les cellules cancéreuses. L'immunothérapie se divise en deux grands types, actif et passif selon le mode d'action du traitement. Chaque grand type se divise en deux sous types : spécifique et non spécifique (**Figure 20**).



**Figure 20 : Types d'immunothérapie. D'après (Sell, 2017)**

### 1. Immunothérapie active spécifique

On touche là au concept de vaccination thérapeutique anti-tumorale. Son objectif est d'induire une réponse immunitaire spécifique. Le vaccin thérapeutique consiste à injecter au patient des composants dérivés des cellules cancéreuses afin d'activer le système immunitaire et de générer une réponse anti-tumorale.

Pour ce faire, des cellules dendritiques peuvent être «chargées» en antigènes tumoraux *in-vitro* puis réinjectées aux patients. L'utilisation de particules produites par les cellules dendritiques, les exosomes, ou encore leur stimulation *in-vivo* est également envisageable.

Un essai réalisé en 1999 par l'équipe de Holtl (Hörtl et al., 2002) dans le RCC (*Renal Cell Carcinoma*), proposait trois cures de cellules dendritiques chargées en lysat de tumeur autologue et une activation par de la KLH (*Keyhole Limpet Hemocyanin*). Cette équipe a obtenu une forte activation des CTL anti-KLH dans le sang périphérique des patients. Cette forte stimulation du système immunitaire par la KLH a entraîné la sécrétion d'IL-12 par les cellules dendritiques et a induit une réponse cytotoxique des LT.

## 2. Immunothérapie active non spécifique

Les médicaments d'immunothérapie non spécifique stimulent l'activité globale du système immunitaire sans cibler spécifiquement la tumeur. Elle repose sur l'utilisation des cytokines et des inhibiteurs de *checkpoints* immunitaires.

### a) Les cytokines

En 1995, le groupe d'Atzpodien a obtenu dans un essai de phase II, 30% de réponses à un traitement associant l'IL-2 et l'IFN $\alpha$  en sous-cutané chez 152 patients atteints de RCC métastatique.

L'administration par voie intraveineuse de doses élevées d'IL-2 associées à l'IFN $\alpha$  s'accompagne d'effets secondaires sévères notamment de syndrome grippal et de fuites capillaires.

Ces effets peuvent être considérablement diminués en utilisant la voie sous-cutanée au lieu de la voie intraveineuse. D'autres perspectives prometteuses existent, en particulier l'utilisation de la voie locale à proximité de la tumeur.

Dans une étude menée sur 116 patients atteints de métastases pulmonaires secondaires à un cancer du rein, l'IL-2 par inhalation, en plus de son utilisation systémique, a entraîné un taux de réponses de 16% de rémission totale, (Heinzer et al., 2002).

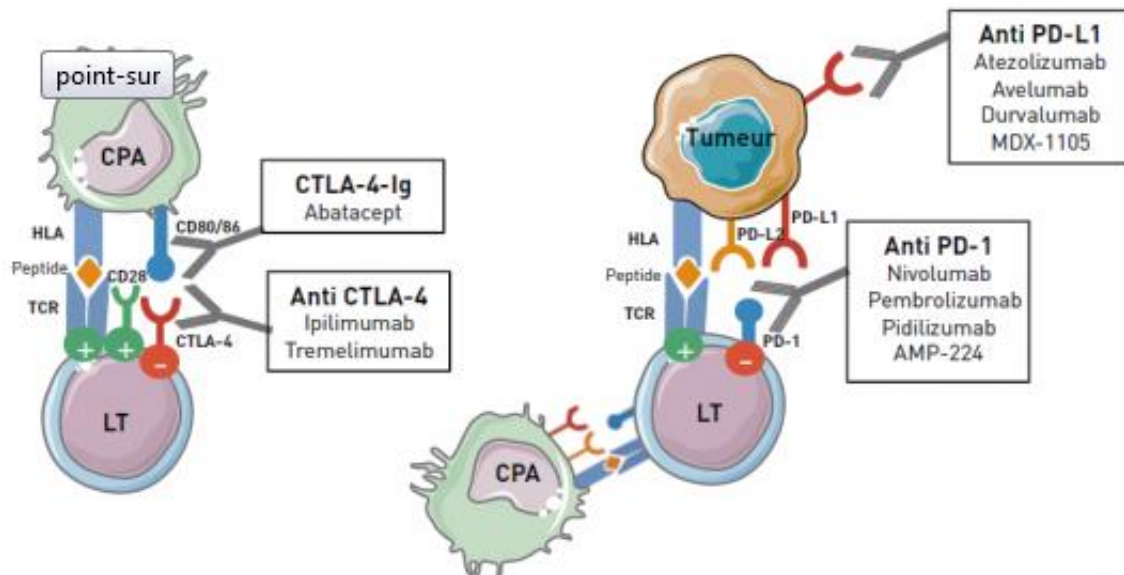
L'IL-2 recombinante possède une autorisation de mise sur le marché pour le cancer du rein avancé, l'IFN $\alpha$  pour certaines formes de leucémies (LMC par exemple) et de myélomes ainsi que pour les mélanomes (Pawelec, 2017).

### b) Les inhibiteurs de *checkpoints* immunitaires

Dans certains cas, les cellules cancéreuses arrivent à «endormir» les défenses immunitaires en agissant sur des freins naturels. Elles peuvent également détourner l'action de ces défenses au profit de la croissance de la tumeur.

Les immuno-modulateurs ou les inhibiteurs de *checkpoints* immunitaires ont pour objectif de rétablir l'action du système immunitaire en levant ces mécanismes d'inhibition et de détournement. Plusieurs molécules aux mécanismes d'action différents comme anti-PD-1,

anti-PD-L1 (*PD-ligand 1*) et anti-CTLA-4 sont d'ores et déjà utilisés dans le mélanome avancé, le cancer du poumon non à petites cellules, le cancer du rein, le cancer de la vessie, le cancer des voies aérodigestives supérieures et le lymphome hodgkinien (**Figure 21**).



**Figure 21 : Mode d'action des inhibiteurs de *checkpoints* immunitaire. (Dupont, 2017)**

#### 4. Immunothérapie passive spécifique

Elle s'appuie essentiellement sur des anticorps obtenus par biotechnologie. A l'instar des anticorps naturellement produits dans l'organisme, ces molécules modifiées se fixent spécifiquement sur les cellules cancéreuses cibles et induisent leur destruction. Une autre approche consiste à utiliser des LT après les avoir activés *ex-vivo*.

##### a) Les anticorps monoclonaux

Les anticorps monoclonaux (mAb) sont utilisés depuis longtemps comme agents d'immunothérapie pour traiter le cancer. Actuellement, environ 12 mAb différents sont utilisés dans le traitement du cancer.

Le **tableau 3** liste plusieurs d'entre eux et les cancers dans lesquels leur utilisation est approuvée. Ces mAb peuvent être utilisés nus ou conjugués avec un agent pour accroître leur

efficacité. Les toxines, les agents chimiques, et les particules radioactives sont utilisés pour conjuguer les anticorps, qui délivrent ensuite la substance conjuguée aux cellules cibles.

**Tableau 3: Anticorps monoclonaux agréés par la FDA et autorisés dans le traitement du cancer**

Nom du mAb	Nom commercial	Cible	Pathologie ciblée	Date
Rituximab <b>«(Chimérique)</b>	Rituxan	CD20	Lymphome non hodgkinien Leucémie lymphoïde chronique	1997 2010
Transtuzumab <b>(Humanisé)</b>	Herceptine	HER2	Cancer du sein Cancer de l'estomac	1998 2010
Gemtuzumab ozogamicin <b>(Humanisé)</b>	Mylotarg	CD33	Leucémie myéloïde aigue (Leucémie aigue myéloblastique ?	2000
Alemtuzumab <b>(Humanisé)</b>	Campath	CD52	LLC (Leucémie lymphoïde chronique)	2001
Ibritumomab tiuxetan <b>(Murin)</b>	Zevalin	CD20	Lymphome non hodgkinien	2002
I-Tositumomab	Bexxar	CD20	Lymphome non hodgkinien	
Cetuximab <b>(Chimérique)</b>	Erbitux	EGFR	Cancer colorectal Cancer de la tête et du cou	2004 2005
Bevacizumab <b>(Humanisé)</b>	Avastin	VEGF	Cancer colorectal Cancer du poumon non à petites cellules Cancer du sein Glioblastome et cancer du sein	2004 2006 2008 2009
Panitumumab <b>(Humain)</b>	Vectibix	EGFR	Cancer colorectal	2006
Ofatumumab <b>(Humain)</b>	Arzerra	CD20	LLC	2009
Denosumab <b>(Humain)</b>	Xgeva	Rank ligand	Cancer avec métastase osseuses	2010
Ipilimumab <b>(Humain)</b>	Xervoy	CTLA-4	Mélanome	2011
Brentuximab vedotin <b>(Chimérique)</b>	Adcetris	CD30	Lymphome de Hodgkin et un type de lymphome non hodgkinien	2011

Les moyens par lesquels les anticorps peuvent induire la mort des cellules cibles sont (Strome et al., 2007) :

- **Compétition** pour la liaison aux récepteurs à la surface cellulaire et inhibition de leur activation comme l'Erbitux, se lie au récepteur de l'EGFR (*Epidermal Growth Factor Receptor*) et interfère avec sa fonction.
- **Inhibition** de la formation de nouveaux vaisseaux sanguins dont fait partie le Bevacizumab (Avastin) cible l'activité du VEGF (*Vascular endothelial growth factor*).
- **Opsonisation**: Les anticorps se lient aux cellules cibles, et puis aux récepteurs Fc sur les cellules phagocytaires. Cette liaison induit l'internalisation et la destruction par les cellules phagocytaires.
- **Fixation au complément**: Le complexe anticorps-antigène se lie aux composants sériques du complément et il est soit phagocyté par les cellules exprimant les récepteurs de CD3, soit lysé par la formation d'un pore par les composants C7, C8 et C9 du complément.
- **Cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps (ADCC)**: Les complexes anticorps-antigène sont fixés aux récepteurs Fc (Fragment cristallisable) sur les cellules NK et les granulocytes, permettant ainsi d'induire la cytotoxicité de ces cellules vers l'antigène cible de l'anticorps et induisant l'apoptose de la cellule

#### b) *La thérapie cellulaire*

Il s'agit d'injecter au patient certaines de ses cellules immunitaires (ou celle d'un donneur) qui ont été préalablement prélevées et manipulées en laboratoire pour être actives.

##### (1) *Les TIL (Tumor Infiltrating Lymphocytes)*

Les TIL sont des LT isolés de tumeurs, expandus *ex-vivo* puis réinjectés aux patients en plus grande quantité. Le principal avantage de cette stratégie est que l'identification au préalable d'antigènes tumoraux n'est pas nécessaire puisque les TIL sont extraits des tumeurs et sont de ce fait probablement spécifiques des antigènes tumoraux. Cette stratégie a montré son intérêt surtout dans le Mélanome (Chandran et al., 2017) .



## (2) Modification des LT par un TCR transgénique (TCRtg)

Cette approche consiste au clonage des parties hypervariables du TCR (T cell receptor), spécifiques d'antigènes tumoraux présentés par le CMH. Les séquences codantes pour les chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  des TCR anti-tumoraux (TCRtg) sont alors intégrées dans un transgène (rétrovirus ou lentivirus). Les particules virales vont ensuite infecter les LT et permettre l'intégration des séquences d'intérêt dans les génomes des cellules.

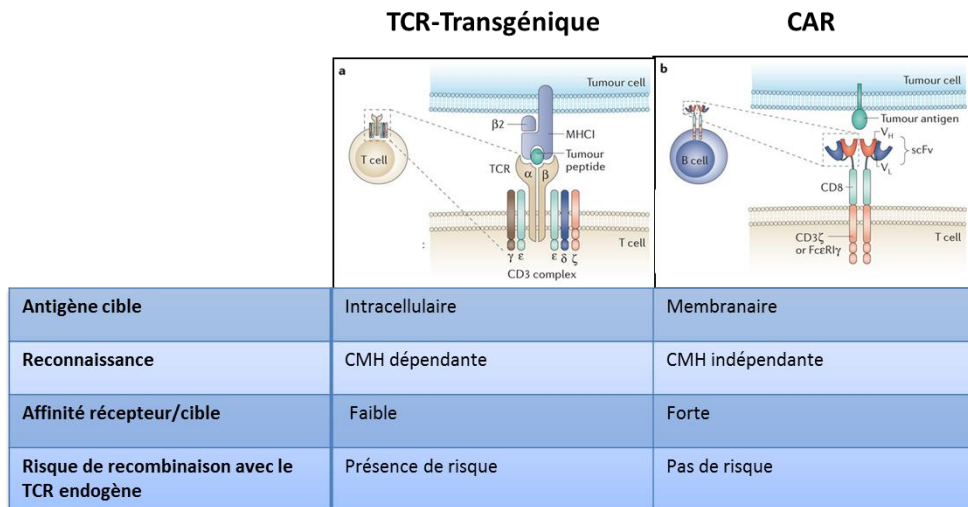
Les LT du patient seront donc pourvus des chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  des TCRtg et des chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  des TCR exprimés naturellement par ces lymphocytes. Un risque de recombinaison entre les différentes chaînes du TCR endogène et celles du TCRtg est à envisager.

C'est pourquoi des alternatives ont été mises en place : un pont disulfure supplémentaire entre les domaines extracellulaires du TCRtg peut être ajouté à la construction ou bien des domaines constants murins peuvent remplacer ceux humains pour orienter les associations des chaînes du TCRtg (Kroemer et al., 2015).

Cependant, le principal inconvénient des TCRtg est leur restriction au HLA, par conséquent le traitement sera restreint à certains patients.

## (3) Modifications génétiques des LT par un CAR

Les immunothérapies « CART-cells » (*Chimeric Antigen Receptor*) utilisent des LT génétiquement modifiés exprimant un anticorps de synthèse pour les diriger contre les cellules cancéreuses. Les principales différences entre un TCR-tg et un CAR sont représentées dans la figure ci-dessous (**Figure 22**).



**Figure 22 : Comparaison entre un TCR transgénique et un CAR.**

## II. Historique de développement de CAR

Le concept de développement de CAR est basé sur la compréhension croissante de la construction et la fonction du TCR (**Figure 23**). D'abord, en 1989 l'équipe de Gross ont construit un TCR chimérique (cTCR) en remplaçant les domaines extracellulaires  $V\alpha$  et  $V\beta$  des chaînes de TCR avec leur immunoglobuline homologues  $VH$  (Heavy chain) et  $VL$  (Light chain) ( $C\alpha VH + C\beta VL$  ou  $C\alpha VL + C\beta VH$ ). L'expression de ce TCR chimérique par des LT cytotoxiques, a induit leur activation d'une manière CMH indépendante, après co-culture avec des cellules cibles (Gross et al., 1989).

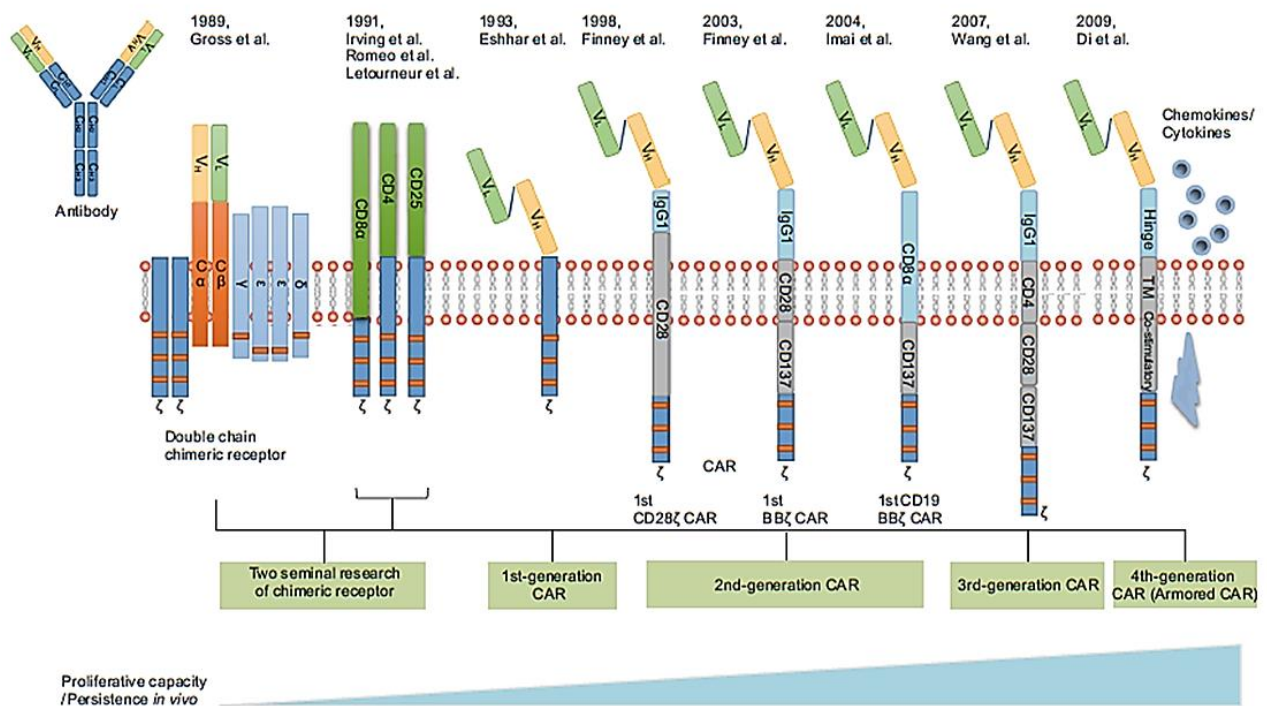


Figure 23 : Historique de développement de CAR. (Wang et al., 2017a)

Cette expérience a permis de valider que la partie cytoplasmique de  $CD3\zeta$  peut reproduire beaucoup des signalisations d'un TCR (van der Stegen et al., 2015). A la lumière de ces avancées, en 1993 Eshhar et al. a construit un premier CAR fonctionnel composé d'un fragment variable d'un anticorps (scFv) lié à la partie intra-cytoplasmique de  $CD3\zeta$  (Eshhar et al., 1993). Ce nouveau récepteur artificiel est connu sous le nom de CAR de **première génération**.

Cependant, ces récepteurs de fusion sont dépourvus d'éléments costimulateurs des LT nécessaire pour induire la production de cytokines et l'activation des LT naïfs (Brocker and Karjalainen, 1995).

Afin de résoudre ces problèmes, l'ajout de l'élément costimulateur CD28 à la première génération de CAR a d'abord été décrite par Finney et al. dans 1998. Cette **deuxième génération** est capable d'augmenter 20 fois la production d'IL-2 par rapport à la première génération.

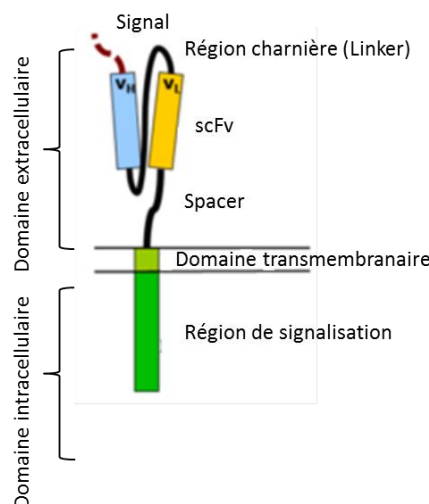
Les CAR de deuxième génération sont plus efficaces dans induction de la production de cytokines et la prolifération des CART-cells par rapport à la première génération de CAR, ce qui a été prouvé dans plusieurs études précliniques (Haynes et al., 2002).

La CAR de **troisième génération** contient deux domaines costimulateurs, ce qui entraîne une persistance plus puissante et d'autres fonctions de CART-cell chez les patients traités (Wang et al., 2007).

Pour améliorer encore la lutte de LT CAR contre la tumeur, une **quatrième génération** de CAR a été développé. Il s'agit de l'ajout d'un gène codant pour une cytokine ou une chimiokine, l'IL-12 par exemple.

### III. Structure de CAR

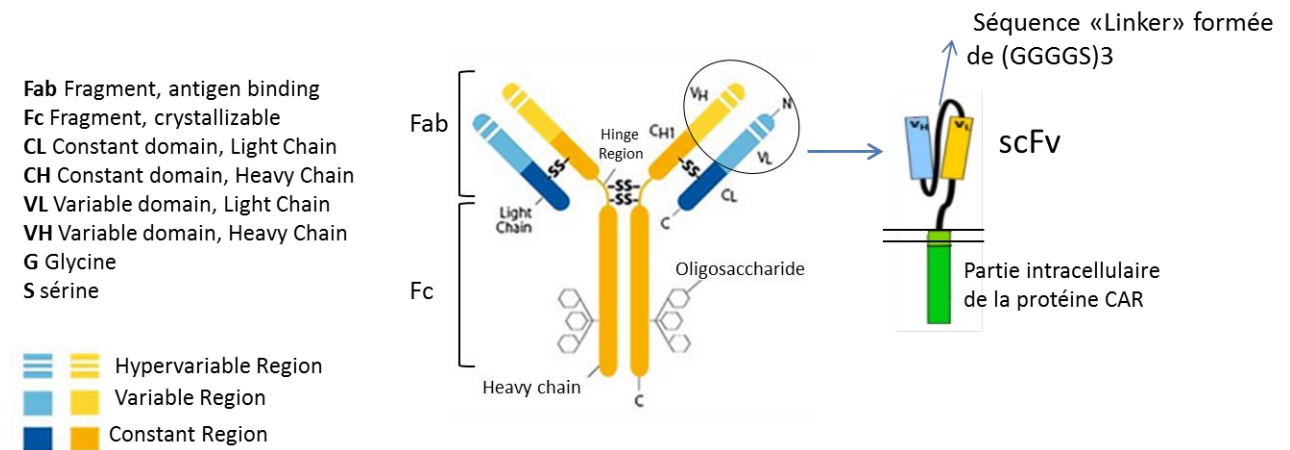
Le CAR est composé de quatre régions. Il s'agit (i) d'un domaine extracellulaire, (ii) d'une région charnière (iii) d'une région transmembranaire, et (iv) d'une région de signalisation intracellulaire (**Figure 24**).



**Figure 24 : Structure d'un CAR.**

## A. Domaine extracellulaire

La région extracellulaire de CAR est un scFv (*Single Chain Variable Fragment*) dérivé d'un mAb spécifique pour l'antigène cible de CAR. Le scFv est une protéine de fusion composée d'une VL attachée à une VH via un lien oligo-peptidique, nommé « Linker » (**Figure 25**).

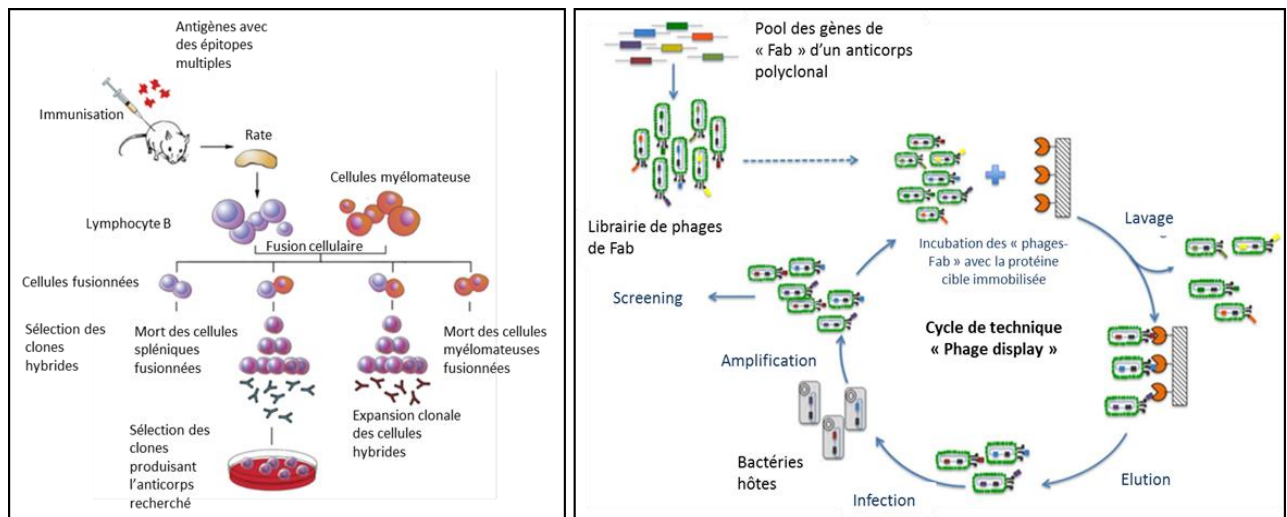


**Figure 25 : Formation de scFv de CAR.**

Il a été montré que le « Linker GS flexible » améliore le repliement et la stabilité de la construction de scFv (Chen et al., 2013). Un lien flexible composé d'une répétition de trois fois de la séquence peptidique (GGGGS) a été conçu par Huston et al. pour construire un scFv, puisque sa structure permet l'orientation correcte des domaines VH et VL, et n'interfère pas avec le repliement des domaines protéiques. La longueur du « Linker » a été ajustée en fonction de la distance entre l'extrémité C-terminale du domaine VH et l'extrémité N-terminale du domaine VL sous son orientation naturelle (3,5 nm). Ce « Linker » est utilisé dans de nombreuses constructions de CAR (Chen et al., 2013).

### 1. La génération de scFv

Il existe deux techniques pour produire des anticorps monoclonaux. La première est à partir d'un hybridome et la deuxième est par « phage display » (**Figure 26**).



**Figure 26 : Production d'un anticorps monoclonal. A droite, technique d'hybridome. A gauche, technique de « Phage display ». D'après (biolabs)**

Le «*phage display*», est fondé sur la fusion du gène d'une banque de protéines avec le gène d'une protéine de surface d'un phage. La protéine recherchée est donc exprimée à la surface du phage, ce qui nous permet de sélectionner les phages qui portent la séquence de l'anticorps d'affinité élevée (Ju and Sun, 2017).

## 2. Caractéristiques de scFv

L'expression de scFv ne garantit pas la fonctionnalité de CAR. L'affinité de scFv et la densité de l'expression de l'antigène cible par les cellules cibles, jouent un rôle dans la fonction de CAR.

**Affinité de l'anticorps :** Chmielewski et al. ont constaté qu'une affinité élevée d'un scFv d'un CAR de première génération est insuffisante pour induire une sécrétion de cytokines comparable à celle d'un CAR de seconde génération, suggérant que l'affinité de liaison permet l'activation mais ne dirige pas la réponse effectrice des LT (Chmielewski et al., 2011).

Liu et al. (Liu et al., 2015a) ont généré des CAR avec des scFv de différentes affinités contre ErbB2 (*Receptor Tyrosine Kinase 2*), un récepteur de surface cellulaire surexprimé dans les cancers de l'ovaire et du sein, mais peut aussi être exprimé sur les tissus normaux.

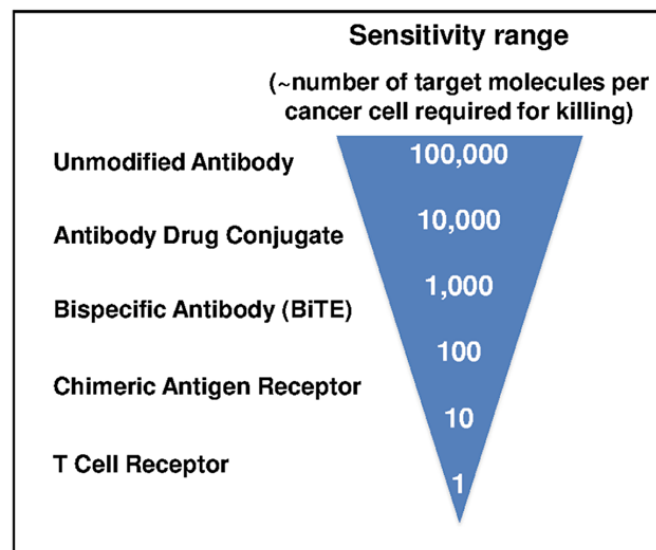
Les expériences in-vivo ont montré que les CART-cells exprimant un scFv à partir d'un anti-ErbB2 (*Receptor Tyrosine Kinase 2*) à faible affinité ont eu une forte activité contre les

cellules tumorales ErbB2<sup>High</sup> avec moins moins d'effets cytotoxiques contre les cellules normales qui sont ErbB2<sup>Low</sup> (Liu et al., 2015b).

Ainsi les études sur la sélection d'un scFv avec une affinité appropriée est cruciale dans la conception des CAR ciblant les antigènes qui sont surexprimés sur des cellules tumorales, mais qui peuvent également être exprimés sur des cellules saines.

**Densité de la cible** : D'autres chercheurs (Caruso et al., 2015) ont démontré que l'activation d'un CAR dépend de la densité d'antigène sur la cellule cible.

Le seuil de sensibilité est le nombre de molécules cibles nécessaires pour induire une réaction cytotoxique suffisante pour tuer une cellule cancéreuse. Sharma et Kranz ont évalué différents seuils de sensibilité, de TCR, de CAR et des anticorps monoclonaux (**figure 27**). Et ils ont trouvé que le seuil de sensibilité d'un TCR est dix fois plus élevé que celle d'un CART-cell.



**Figure 27 : Seuils de sensibilité pour divers anticorps ou modalités thérapeutiques à base de LT (Sharma and Kranz, 2016)**

### 3. Immunogénicité de scFv

L'immunogénicité de la scFv pourrait provoquer des réponses immunitaires anti-CAR chez les receveurs (Ali et al., 2016) (Ramos et al., 2016) (Turtle et al., 2016). Les stratégies pour employer des scFv humanisées ou entièrement humaines sont maintenant en développement (Sommermeier et al., 2017).

## B. Région Hinge

La partie «*Hinge*» ou charnière du CAR, lie la partie extracellulaire à la partie intracellulaire de CAR. Elle joue un rôle important dans l'activation du CART-cell.

Le rôle de cette région est de fournir une flexibilité à la scFv, dont la longueur de «*Hinge*» joue un rôle dans l'amélioration de l'expression du scFv à la membrane du LT. Ces propriétés ont été décrites comme modulant les interactions cellule effectrice/cellule cible, affectant ainsi la force du signal d'activation du CART-cell. Les régions charnières peuvent être des régions de CD8 $\alpha$ , de CD28 ou de Fc d'un anticorps IgG (Immunoglobuline G) (Lipowska-Bhalla et al., 2012).

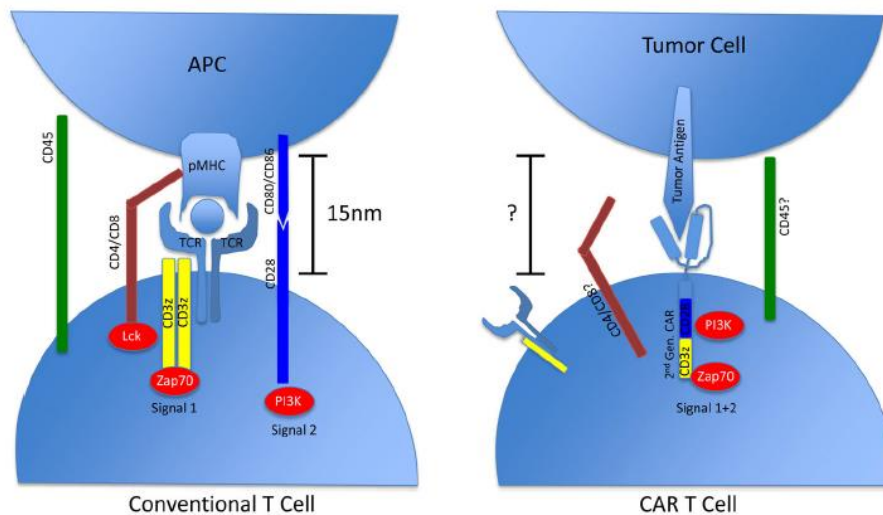
La plupart des CAR utilisent les domaines Fc CH2-CH3 de l'IgG1 ou de l'IgG4. Les premières études d'utilisation d'une région charnière IgG1 ont montré son rôle dans l'activation et la sécrétion des cytokines de CART-cell (Hombach et al., 2000).

Lorsqu'un TCR interagit avec le CMH, la distance spatiale entre le LT et la cellule présentatrice d'antigène (CPA) est d'environ 15 nm. Cette synapse exclut physiquement le récepteur inhibiteur CD45 en raison de son grand ecto-domaine où il phosphoryle et active Zap70. L'activation de Zap70 fournit le signal 1 d'activation de LT. La liaison du CD28 à son ligand CD80/CD86 entraîne l'activation de PI3K et délivre le signal 2 (**Figure 28**).

Pour un CART-cell, l'activation par le signal de CAR est suffisant pour délivrer les deux signaux 1 et 2, ce qui entraîne l'activation des cellules T.

La distance spatiale entre un CART-cell et une cellule cible n'est pas connue (**Figure 28**).





**Figure 28 : Activation du TCR ou CAR. Présentation du rôle la distance qui sépare un LT d'une cellule présentatrice d'antigène (APC), pendant la reconnaissance via un TCR (à gauche) et la distance qui sépare un CART-cell d'une cellule tumorale cible (à droite) (Srivastava and Riddell, 2015).**

### C. Domaine transmembranaire

Le domaine transmembranaire de CAR fait partie des composants les moins étudiés. Une étude antérieure (Romeo et al., 1992) qui a utilisé un domaine transmembranaire CD3 dans une construction de CAR a montré que cette région est importante pour la formation de dimères avec d'autres protéines CD3, car les mutations dans la cystéine et les résidus d'acide aspartique dans la partie transmembranaire ont entraîné une perturbation de dimérisation. Ce manque de dimérisation a suggéré une incidence sur l'activation des CART-cell conduisant à une activité cytolytique plus faible.

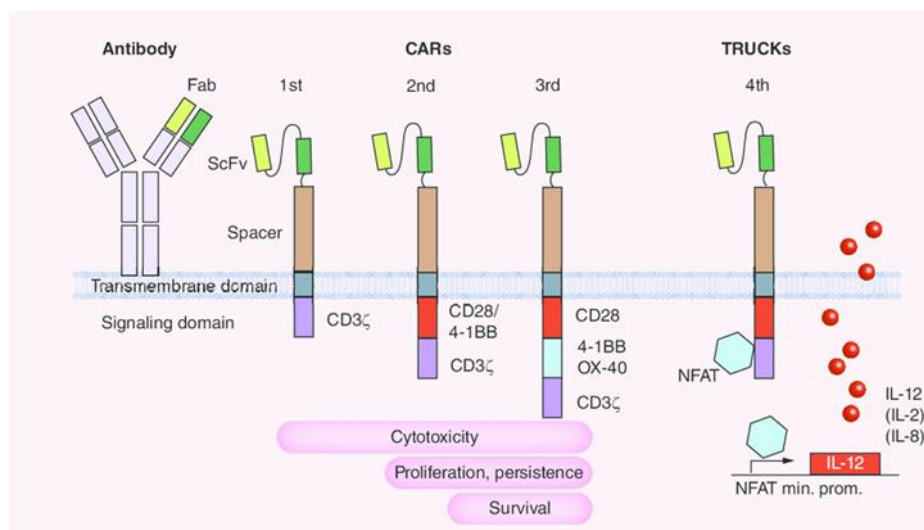
Ces observations montrent que la région transmembranaire a la capacité de fournir une stabilité d'expression membranaire au CAR (Zhang et al., 2006).

Ainsi, il est possible de profiter des domaines transmembranaires des protéines pour permettre au CAR de s'associer avec d'autres co-récepteurs ou des protéines de surface cellulaire. Cependant, d'autres recherches sont nécessaires pour définir quelles sont les protéines qui peuvent avoir des domaines transmembranaires utiles pour optimiser l'expression du CAR et sa fonction effectrice.

## D. Région intracellulaire

Le domaine cytoplasmique fournit la signalisation en aval qui active le CART-cell et dirige sa réponse. Les CAR ont été classés en quatre générations différentes en fonction des domaines de signalisation associés aux constructions (**Figure 29**).

Dans la plupart des constructions, le domaine costimulateur est situé directement après le domaine transmembranaire et avant le domaine de la signalisation primaire CD3 $\zeta$ . Cette proximité étroite avec la membrane cellulaire est jugée importante pour permettre au domaine de la costimulation d'interagir avec ses molécules de signalisation situées dans cette région de la cellule (Kalaitidou et al., 2015).



**Figure 29 : Générations des CAR T-cells.**

**NFAT** : Nuclear factor of activated T-cells, min. prom. : minimum promotor  
(Kalaitidou et al., 2015)

**CD28** : Le récepteur costimulant CD28 est également connu sous le nom de signal 2 dans l'activation des LT. Les constructions de CAR qui contiennent un domaine CD28 induisent généralement de plus grandes quantités de sécrétion de cytokines, telles que IL-2, IL-10, IFN $\gamma$  et TNF $\alpha$  en comparaison avec le CAR de première génération (Finney et al., 2004) (Hombach et al., 2012a).

Dans les essais cliniques, les CAR avec CD28 ciblant les cellules CD19 $^{+}$  ont montré leur efficacité dans l'éradication de la leucémie aigue lymphoblastique B (Davila et al., 2014a).

**4-1BB** : nommée aussi le **CD137** fait partie de la famille des récepteurs du facteur de nécrose tumorale et agit comme un récepteur costimulant. La signalisation de 4-1BB entraîne la sécrétion d'IL-2, d'IFN $\gamma$  et d'IL-4, la survie cellulaire, la résistance à l'AICD (*Activation Induced Cell Death*), et à l'augmentation de la signalisation médiée par CD28 (Vinay and Kwon, 2012).

De plus, il a été démontré que les CART-cells exprimant 4-1BB avaient atténué l'épuisement des cellules exprimaient moins de PD-1, TIM-3 et LAG-3 par rapport à des CART-cells basés sur CD28 seule (Long et al., 2015).

**ICOS** : nommé aussi CD278, l'ICOS (*Inducible T-cell COStimulator*) est un membre de la superfamille de CD28. Contrairement au CD28, il ne semble pas initier la prolifération, mais joue un rôle dans la production de cytokines des sous-ensembles de LT/CD4<sup>+</sup> Th1 (*LT helper1*) et Th2 (*LT helper2*) (Sharpe and Freeman, 2002).

**OX40** : il est similaire à 4-1BB, fait partie de la famille TNFR (*Tumor Necrosis Factor Receptor*) et est considéré comme une molécule costimulante tardive. Les CART-cells composé de l'OX40 sont utilisés pour augmenter la sécrétion d'IL-2 et d'IL-10, mais il n'augmente pas la sécrétion de l'IFN $\gamma$  par comparaison avec d'autres CART-cells formé de CD28 (Pulè et al., 2005). En outre, les CART-cells basés sur OX40 n'ont pas montré la même prolifération que les CART-cells basés sur CD28. Par contre, ils peuvent induire une différenciation des CART-cells vers un phénotype mémoire CD62L<sup>+</sup> qui peuvent échapper à l'AICD (Hombach et al., 2012b).

## IV. Les outils du transfert de gène

### A. Définition

L'expression de la protéine CAR par un LT nécessite le transfert de l'ADN ou encore de l'ARN codant pour le CAR à l'intérieur de la cellule. Ces acides nucléiques sont le plus souvent transportés jusqu'à la cellule grâce à un vecteur viral (méthode de transduction), mais ils peuvent également être injectés directement dans les cellules, sous forme d'ADN nu (transfection).

## B. Les vecteurs utilisés en thérapie génique

Il existe des vecteurs viraux **non répliatifs** (qui ne peuvent se multiplier), **intégratifs** (l'ADN du vecteur viral s'intègre dans l'ADN de l'hôte) et des vecteurs **non viraux non intégratifs** (Transfection par ADN ou ARN).

Pour faire pénétrer l'acide nucléique à visée thérapeutique dans les cellules du patient, on utilise un vecteur chargé d'assurer ce transport. Des virus modifiés (vecteurs viraux) sont utilisés dans plus de deux tiers des essais. Ce type de vecteurs reste la référence à ce jour (Goverdhana et al., 2005).

Les virus peuvent facilement entrer dans les cellules et délivrer leur matériel génétique dans le noyau des cellules cibles. Par conséquent, ils sont dans la plupart des cas plus efficaces que les systèmes de distribution non viraux. Les vecteurs les plus utilisés pour la délivrance de gènes sont dérivés des pathogènes viraux humains qui ont été rendus non pathogène en supprimant les gènes viraux essentiels. Ils ont généralement un large tropisme; donc ils peuvent infecter et délivrer leurs transgènes codés à un large spectre de cellules.

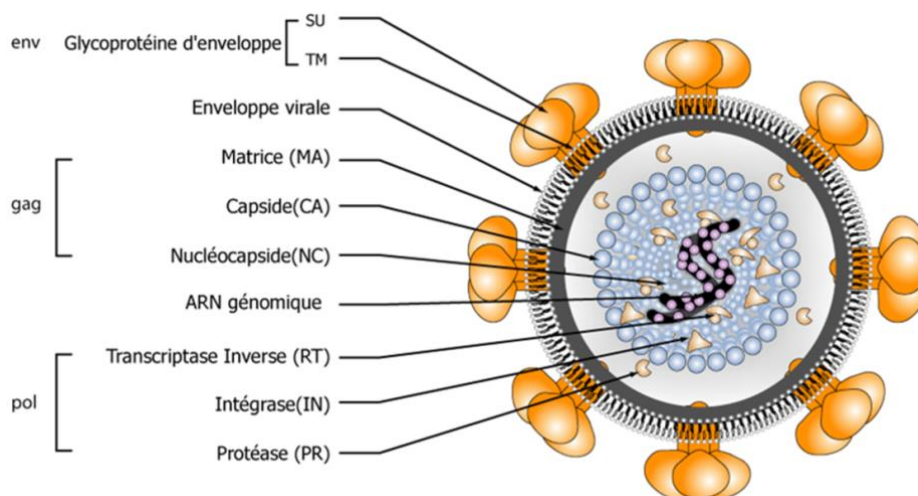
Les vecteurs dérivés de **virus adéno-associés (ou AAV)** permettent le transfert de petites séquences génétiques (seulement 4 kilobases contre 13 kilobases avec les lentivirus). Ils sont intéressants car peu inflammatoires et sont plus utilisés (par exemple pour le traitement de l'amaurose de Leber). Le seul médicament de thérapie génique autorisé en Europe (Glybera) utilise d'ailleurs ce type de vecteur.

Les rétrovirus et les lentivirus font parties de la même famille de virus, les Retroviridae et font aussi parties de la même sous famille des Orthoretrovirinae.

Pour pallier au risque d'insertion aléatoire, les chercheurs utilisent de plus en plus souvent **des lentivirus**. Ceux-ci semblent en effet avoir un profil d'intégration génomique plus sûr que celui des rétrovirus (intégration aléatoire au sein du génome complet et au niveau des gènes versus dans des régions hot spot et en 5' promotrices des gènes, respectivement pour le lentivirus ou rétrovirus). De plus, les lentivirus pénètrent bien dans des cellules qui ne se divisent pas comme les neurones ou les cellules hépatiques (alors que les rétrovirus s'y insèrent mal).

## C. Les lentivirus

Les lentivirus sont des rétrovirus apparentés aux virus d'immunodéficience humaine (VIH) ou féline (FIV) capables d'infecter des cellules au repos avec une grande efficacité. Ils s'intègrent dans le génome, permettant ainsi une expression de longue durée : en l'absence de division cellulaire, le complexe de pré-intégration traverse les pores nucléaires et arrive au noyau (Naldini et al., 1996). Les gènes qui codent pour les protéines de structure virales sont Gag, Pol et Env (**Figure 30**). La toxicité de ces protéines empêche la production de lignées cellulaires d'empaquetage stables (Roy, 2001).



**Figure 30 : Structure d'une particule lentivirale.**

### 1. Production des particules lentivirales

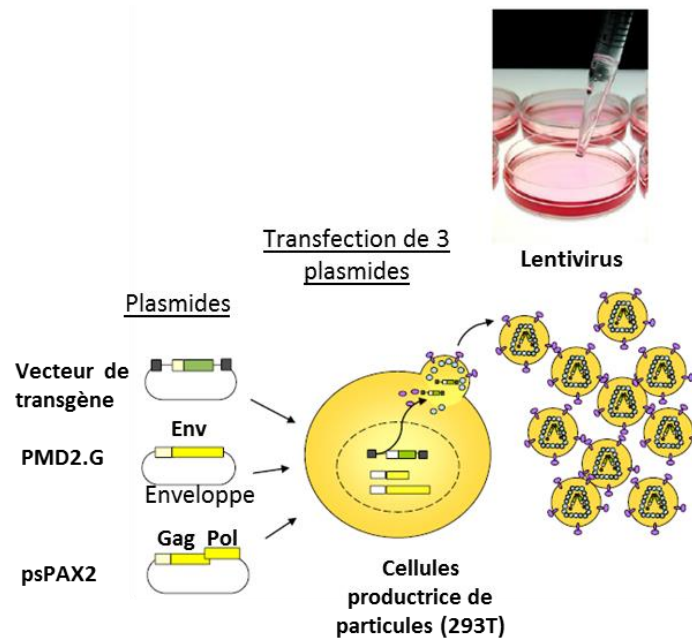
Pour produire des particules lentivirales en thérapie génique, il faut utiliser une lignée d'empaquetage permissive (forte intégration dans la cellule), la lignée 293T.

En plus du vecteur de transgène (vecteur codant pour le CAR par exemple), la lignée 293T a besoin de deux autres vecteurs qui sont (**Figure 31**):

**-Le plasmide psPAX2** contient la séquence codant pour le gène GAG (*Group specific antigen*) qui va permettre la traduction de la polyprotéine structurale du virus. Le gène POL (polymérase) code pour la transcriptase inverse. Ce plasmide possède également les gènes REV (*Regulator of Expression of Virion protein*) et TAT (*Trans-Activator of Transcription*), la protéine REV permet le transport nucléo-cytoplasmique des ARNm viraux non totalement

épissés (codant pour les protéines de structure). La protéine TAT quant à elle agit comme un facteur de transcription.

-Le plasmide **pMDG** qui codera pour l'enveloppe du virus. Il code pour le gène **VSV-G** (*Vesicular Stomatitis Virus Glycoprotein*). Cette enveloppe permet la fixation du virus sur les récepteurs LDL (*Low-density lipoprotein*) de la cellule.



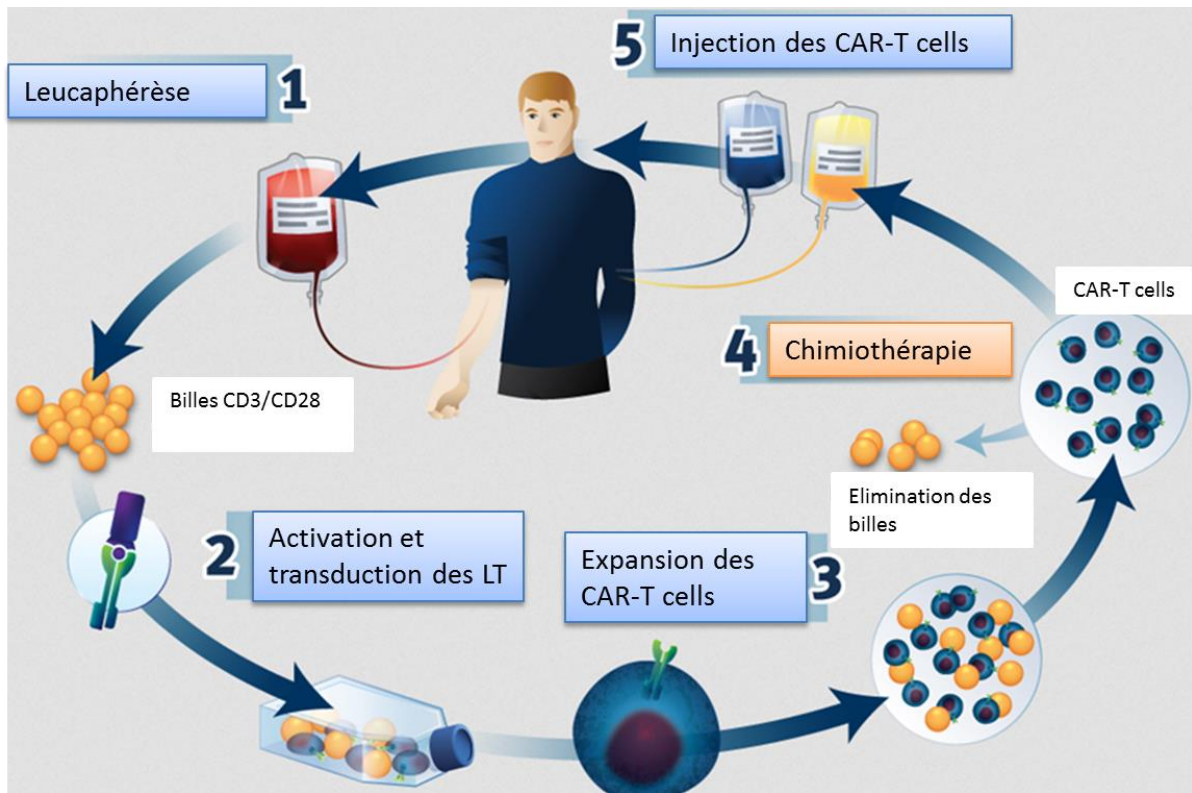
**Figure 31 : Production des particules lentivirales.**

## V. Stratégie de traitement de patient par des CART-cells

La plupart des essais cliniques ont utilisé les LT du sang périphérique en tant que matériel de départ. Les lymphocytes du patient sont prélevés par leucophérèse puis isolés et activés à l'aide des billes coâtées avec un anticorps spécifiques de CD3/CD28, en présence d'une dose forte de l'IL-2 (**Figure 32**). Cette condition induit une prolifération rapide des LT.

Plus récemment, des méthodes ont été développées pour isoler des sous-ensembles de LT (CD4 ou CD8) ou pour induire la différenciation des LT dans un certains phénotypes (Xu et al, 2014; Ramos et al, 2016; Turtle et al, 2016).

L'activation et la prolifération des LT facilitent leur transduction. Les LT transduits sont cultivés, jusqu'à obtenir un nombre suffisant de cellules. Après des étapes de contrôle de fonctionnalité et de stérilité, les CART-cells sont réinjectés au patient.



**Figure 32 : Stratégie de production de CART-cells en clinique. (Davila and Sadelain, 2016)**

Les premières générations de CART-cell ont été administrées sans conditionnement préalable. Avec un conditionnement du patient à base de cyclophosphamide (CY) et fludarabine ou bendamustine. Le traitement de lymphomes non hodgkiniens (LNH) par CART -cells anti- CD19 de deuxième génération, a montré de meilleurs taux de réponse.

Lors du congrès américain d'hématologie (ASH) en 2015, il a été rapporté que l'utilisation d'un conditionnement associant fludarabine et CY montrait un bénéfice net par rapport au CY seul dans un essai incluant 34 patients atteints de LNH réfractaires ou en rechute. Ce type de conditionnement permet une action anti-tumorale directe mais réduit aussi l'action de CART-cells (Davila and Sadelain, 2016).

Typiquement, les CART-cells sont perfusées par voie intraveineuse. Mais selon le type du cancer, les CART-cells peuvent être aussi injectés par voie intra-tumoral (You et al., 2016), intracrânienne (Brown et al., 2015), intrapéritonéale (Koneru et al., 2015), ou dans l'artère hépatique (Katz et al., 2015). Tout ce processus se fait en 1 à 2 semaines.

En outre, la fabrication automatisée pourrait être une option pour simplifier le processus et améliorer la robustesse de la production de CART-cell. Les CD19 CART-cells générés en utilisant un système de grade GMP (*Good Manufacturing Process*) automatisé fermé (*CliniMACS Prodigy*) (**Figure 33**) ont été comparables aux CD19 CART-cells produits par les processus conventionnels en termes d'efficacité de transduction, de phénotype cellulaire, de la fonctionnalité et le rendement global (Mock et al., 2016).



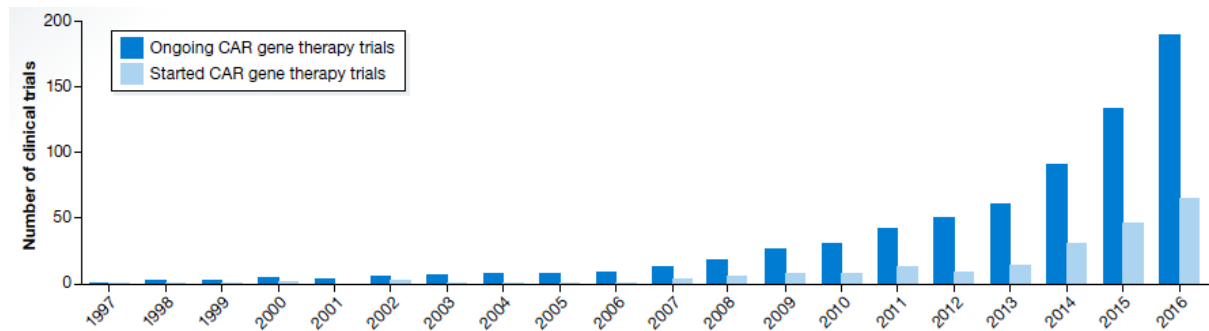
**Figure 33 : Système clos, appelé « Prodigy » pour la production des CART-cells en grade GMP.  
(Société Miltenyi)**

## **VI. Essais clinique par des CART-cells**

À la fin de l'année 2016, 220 essais de CART-cell ont été enregistrés dans *Clinical Trials.gov*, dont 188 sont en cours, y compris neuf études de suivi à long terme (**Figure 34**). La thérapie



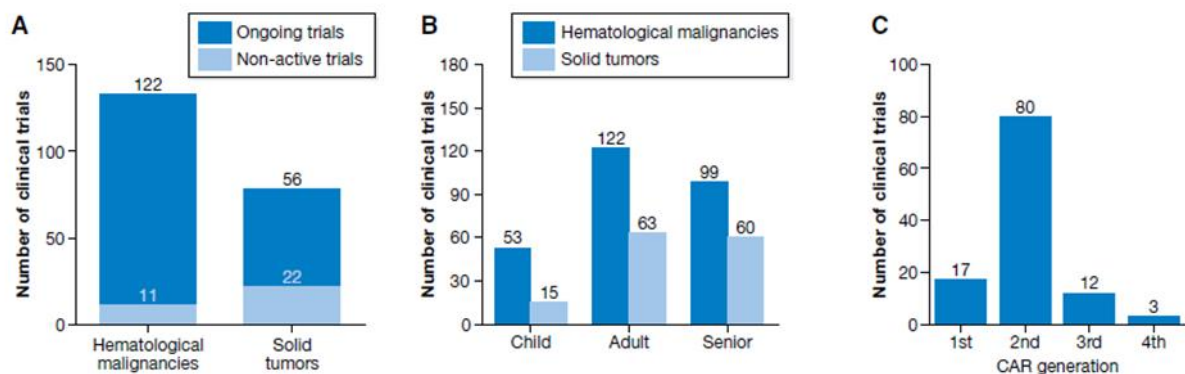
cellulaire par des CART-cells a été initialement commencée aux Etats-Unis, puis a été propagée au reste du monde.



**Figure 34 : Nombre des essais cliniques de CAR entre l'année 1997 et 2016. (Hartmann et al., 2017)**

Actuellement, 89 essais cliniques par CART-cells sont en cours en dehors des États-Unis, avec les chiffres les plus élevés en Chine (66 essais) et en Europe (14 essais, Dataset EV5).

Parmi les essais en cours, il y a 133 essais dans des cas d'hémopathies malignes et 78 essais pour des tumeurs solides (Hartmann et al., 2017). Pour traiter les patients à différents âges avec surtout des CAR de 2<sup>ème</sup> génération (Figure 35).



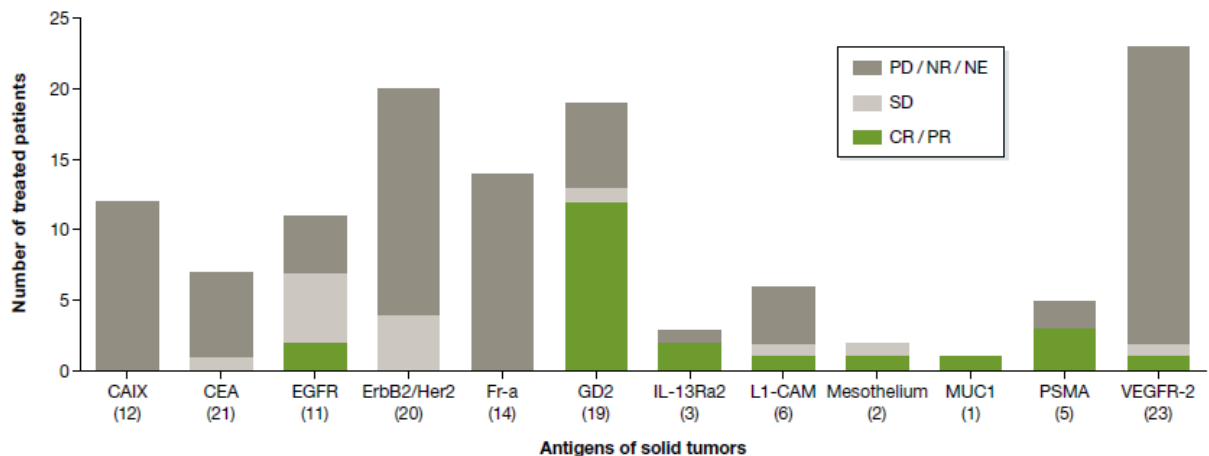
**Figure 35 : Nombre des essais de CAR selon le type de la tumeur (A); l'âge de patient traité (B) et la génération de CAR utilisé (C). (Hartmann et al., 2017)**

### A. Cancer solide

Un nombre croissant d'essais cliniques se sont concentrés sur les tumeurs solides, ciblant les protéines de surface, y compris l'antigène carcino-embryonnaire (ACE), le diganglioside (GD2), la mésothéline, le récepteur de l'interleukine-13 $\alpha$  (IL-13R $\alpha$ ), le récepteur du facteur de croissance épidermique humain 2 (HER2), la protéine d'activation de fibroblaste (FAP), et la molécule d'adhésion cellulaire L1 (L1CAM) (Figure 36).

Malheureusement, les résultats cliniques dans les tumeurs solides ont été beaucoup moins encourageants.

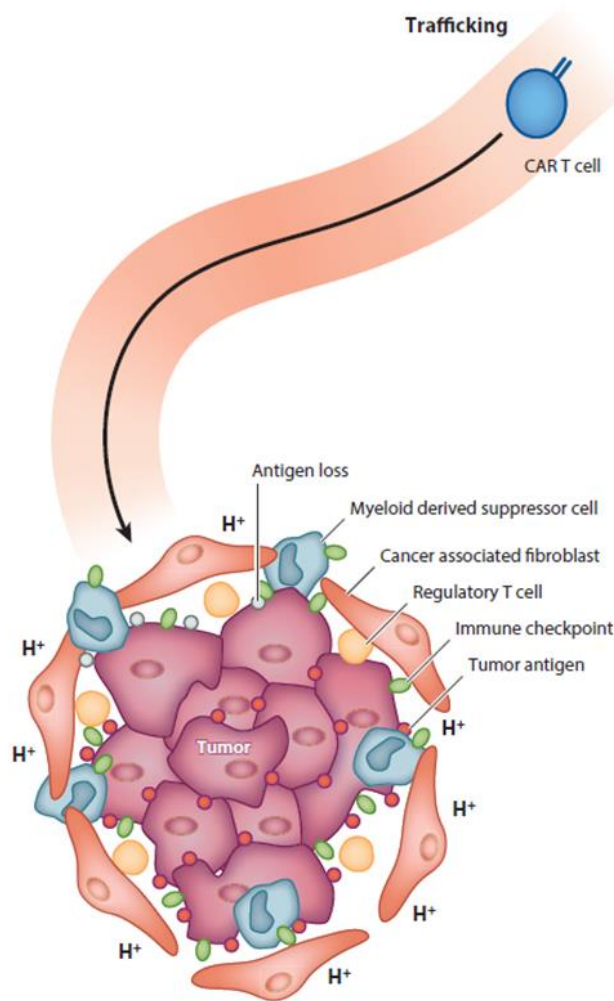
À ce jour, les essais les plus positifs rapportés ont utilisé le CAR-GD2 pour cibler le neuroblastome (3 des 11 patients avec des rémissions complètes) (Louis et al., 2011), HER2 CAR pour le sarcome (4 des 17 patients maladie stable) (Ahmed et al., 2015), et CAR-HER1 pour le cancer du poumon (2 des 11 patients avec des réponses partielles) (Feng et al., 2016). La raison de ce différentiel est inconnue mais est probablement multifactorielle.



**Figure 36 : Types des antigènes cibles et les nombres de patients traités par des CART-cells dans les cas des tumeurs solides. (Hartmann et al., 2017)**

Les tumeurs solides présentent les barrières qui sont absentes dans les malignités hématologiques. Contrairement à la situation de tumeur hématologique, les CART-cells doivent infiltrer avec succès les éléments stromaux des tumeurs solides pour cibler leurs antigènes spécifiques. Malgré leur infiltration, les CART-cells deviennent rapidement dysfonctionnelles en raison d'un microenvironnement tumoral (**Figure 37**) (Newick et al., 2017) caractérisée par:

- a- Un stress oxydatif, une déplétion nutritionnelle, un pH acide et une hypoxie;
- b- La présence de facteurs solubles inhibiteurs et de cytokines;
- c- Des cellules immunitaires suppressives, notamment les LT régulateurs (Tregs), les cellules suppressives dérivées des myéloïdes (MDSC) et les macrophages associées aux tumeurs (TAM) ou les neutrophiles associées aux tumeurs (TAN).
- d- L'engagement du récepteur PD-1 à la surface du lymphocyte et de son ligand PD-L1 à la surface de la cellule tumorale.



**Figure 37 : Barrières des tumeurs solides qui réduisent l'efficacité de CART-cell. Le microenvironnement tumoral caractérisée par un stress oxydatif, une déplétion nutritionnelle, un pH acide et une hypoxie, par la présence de facteurs solubles inhibiteurs et des cellules immunitaires suppressives, notamment les LT régulateurs (Tregs). (Newick et al., 2017)**

## B. Cancer hématologique

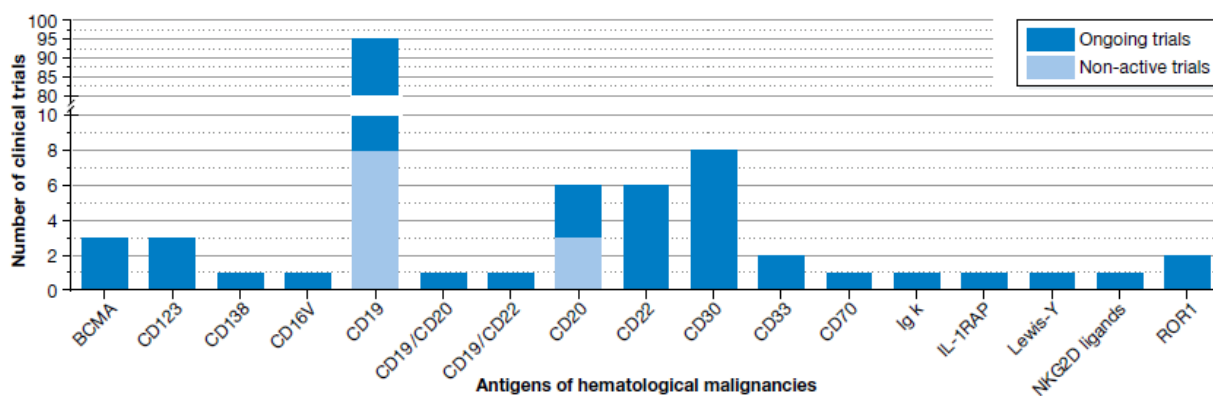
Aujourd'hui, les essais cliniques par des CART-cells sont majoritairement décrit dans le traitement des cancers hématologiques, dont 19 cibles antigéniques de CAR différents ont été testées jusqu'à aujourd'hui (**Figure 38**).

Les premiers essais cliniques utilisant des CART-cells spécifiques de CD19 ont été menés pour le traitement de LAL-B.

L'antigène CD19 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). En 2013, le premier essai clinique publié utilisait un CAR spécifique de CD19 de deuxième génération (CD28/CD3 $\zeta$ ) dans le traitement de la LAL chez des patients adultes récidivants (Brentjens et al., 2013). Puis, de nombreuses études cliniques utilisant des CAR anti-CD19 ont ensuite suivi, et des résultats similaires ont été obtenus avec un pourcentage de réponse compris entre 70 et 100% selon les essais (**Tableau 4**) (Sadelain, 2015).

Récemment, l'industrie pharmaceutique, Novartis a annoncé l'approbation de la FDA pour Kymriah<sup>®</sup> (Tisagenlecleucel-CTL019) une suspension par injection intraveineuse. Il s'agit du premier traitement CART-cell autorisé à la commercialisation. Il est indiqué dans la leucémie aiguë lymphoblastique (LAL), réfractaire chez les patients âgés de plus de 25 ans.



**Figure 38 : Nombre des essais cliniques de CAR selon le type d'antigène cible de tumeur liquide. (Hartmann et al., 2017)**

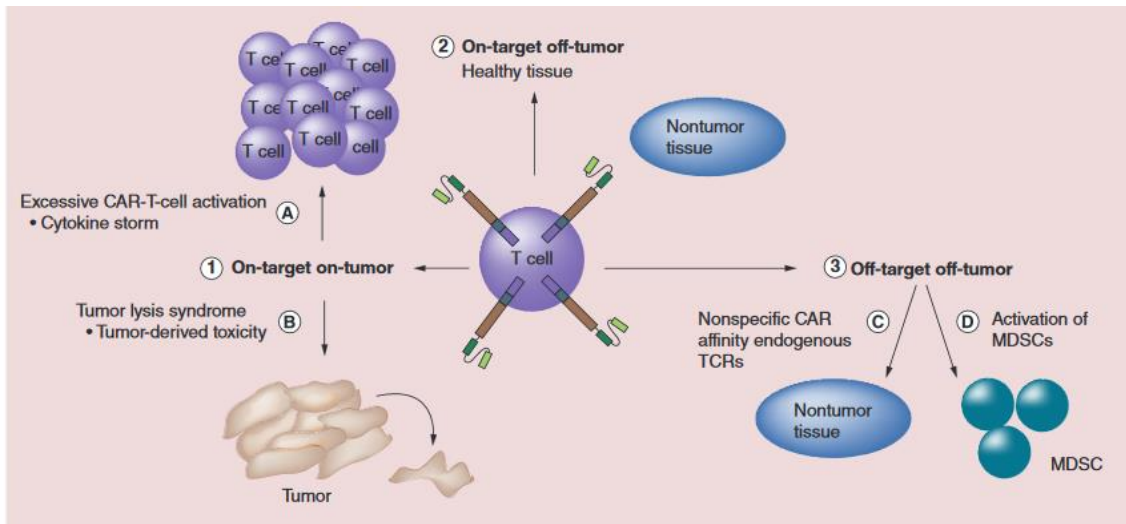
**Tableau 4 : Pourcentage de RC (Rémission complète) des patients (adultes ou enfants) traités par des CART-cells.**

Publication	Nombre/âge de patient	% RC
Brentjens, et al. ;2013	5 adultes	100%
Grupp, et al. ; 2013	2 enfants	100%
Davila, et al. ; 2014	16 adultes	88%
Lee, et al. ; 2015	20 enfants	70%
Maude, et al. ; 2014	25 enfant	90%
	5 adultes	100%
Frey, et al. ; 2014	12 adultes	89%
Parck, et al. ; 2014	27 adultes	89%

Actuellement, de nouvelles cibles des CAR sont en développement afin de cibler d'autres antigènes des hémopathies B (comme le CD22 et le CD20). Actuellement, des CAR ciblant CD22 et CD20 sont en évaluation clinique (NCT02194374, NCT00881920). Enfin, les antigènes CD30 pour les lymphomes Hodgkiniens, BCMA (*B-cell maturation antigen*) et CD138 pour les maladies malignes (Myélome) ou encore CD33 et CD123 dans les pathologies myéloïdes apparaissent également comme des cibles potentielles pour le développement de CAR.

## VII. Toxicités liées au traitement par des CART-cells

Les cellules CART-cells offrent donc une nouvelle thérapie prometteuse pour les cancers, mais les toxicités rencontrées dans les essais cliniques sont encore une grande préoccupation. Les toxicités de la thérapie CART-cell appartiennent généralement aux catégories suivantes (**Figure 39**).



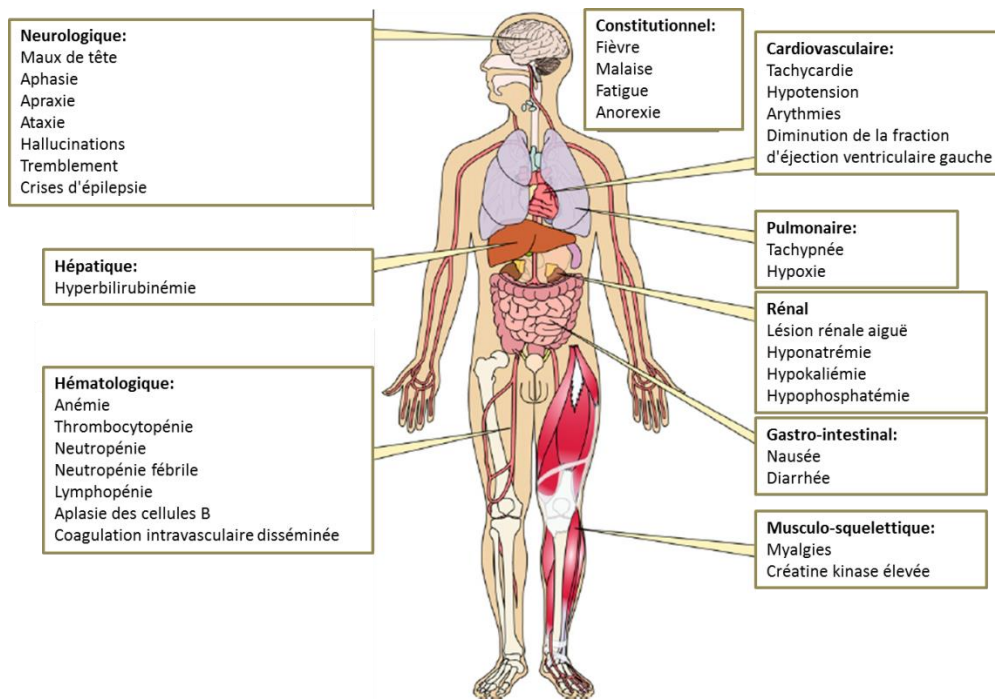
**Figure 39 : Types de toxicité liée au traitement par des CART-cells. D'après (Brudno and Kochenderfer, 2016)**

#### A. Toxicité on-target / on-tumor (sur la cible / dans la tumeur)

L'utilisation de CART-cells est presque constamment associée à un syndrome de libération cytokinique (SLC), encore appelé « orage cytokinique » survenant quelques jours suivant l'injection (Brudno and Kochenderfer, 2016). Ce SLC est lié à une réponse inflammatoire systémique avec des taux très élevés de cytokines circulantes telles que l'IL-6, l'IL-10, ou l'IFN $\gamma$ . Cette augmentation est associée à l'activation et à la prolifération des CART-cells injectées. Cet orage cytokinique a d'abord été attribué à un syndrome d'activation macrophagique, du fait de l'association de la fièvre à une augmentation de la ferritine, des triglycérides et des LDH, le tout accompagné de cytopénies (Grupp et al., 2013a). Le SLC se traduit par des signes cliniques toujours transitoires mais plus ou moins graves parmi lesquels on peut également citer des complications hypotensionnelles, des hypoxies, des coagulopathies, des cytopénies, voire des arrêts cardiaques dans de plus rares cas (**Figure 40**). Un SLC sévère avec choc hypotensionnel est rapporté dans 11 à 27% des cas. L'association de signes clinico biologiques peut aider au diagnostic de SLC (Davila et al., 2014b), comme :

- Un taux sérique de Protéine C Réactive (CRP) supérieur à 20mg/dL semble également intéressant pour identifier cette complication.

- Une charge tumorale élevée semble associée à un plus haut risque de SLC.



**Figure 40 : Effet indésirables de Syndrome de libération cytokinique.**  
**D'après (Brudno and Kochenderfer, 2016).**

L'administration de corticoïdes permet la résolution transitoire du SLC. Ces corticoïdes peuvent être associés au tocilizumab, un anti-récepteur bloquant la fixation de l'IL- 6 à ses cellules-cible, qui permet une résolution rapide en 1 à 3 jours des troubles tensionnels et/ou de la fièvre (Maude et al., 2014). À l'inverse des corticoïdes souvent administrés à haute dose, le tocilizumab n'entraîne pas de diminution du taux de CART-cells. Le SLC est corrélé à l'efficacité des CART-cells, c'est pourquoi l'objectif est plus le contrôle du SLC avec prévention des complications sévères que son éradication complète.

## B. Toxicité on-target / off-tumor (sur la cible / en dehors de la tumeur)

Dans cette situation, le CART-cell attaque l'antigène cible qui est exprimé sur des cellules non tumorales saines. Dans le cas des lymphomes B, l'antigène CD19 est exprimé sur les LB matures et pré-matures. Le traitement par des CART-cells anti-CD19 conduit à une aplasie des LB. Une lymphopénie B est observée chez tous les patients présentant une réponse à l'administration de CART-cells anti-CD19.

L'aplasie B est observée entre 2 semaines et 1 mois après l'injection des CART-cells. Elle peut être durable, jusqu'à 2 ans après le traitement, nécessitant l'administration

d'immunoglobulines intraveineuses afin de maintenir un taux d'IgG suffisant (Maude et al., 2014). Parallèlement à l'aplasie B et à la diminution de la concentration des immunoglobulines (Ig) totales dans le sérum, les taux IgG et d'IgA spécifiques de pathogènes ou de vaccins restent stables plusieurs mois après le traitement. Ces anticorps pourraient être sécrétés par des plasmocytes persistants en dépit de l'injection de CART-cells anti-CD19 induisant la disparition de cellules B CD19+ (Bhoj et al., 2016).

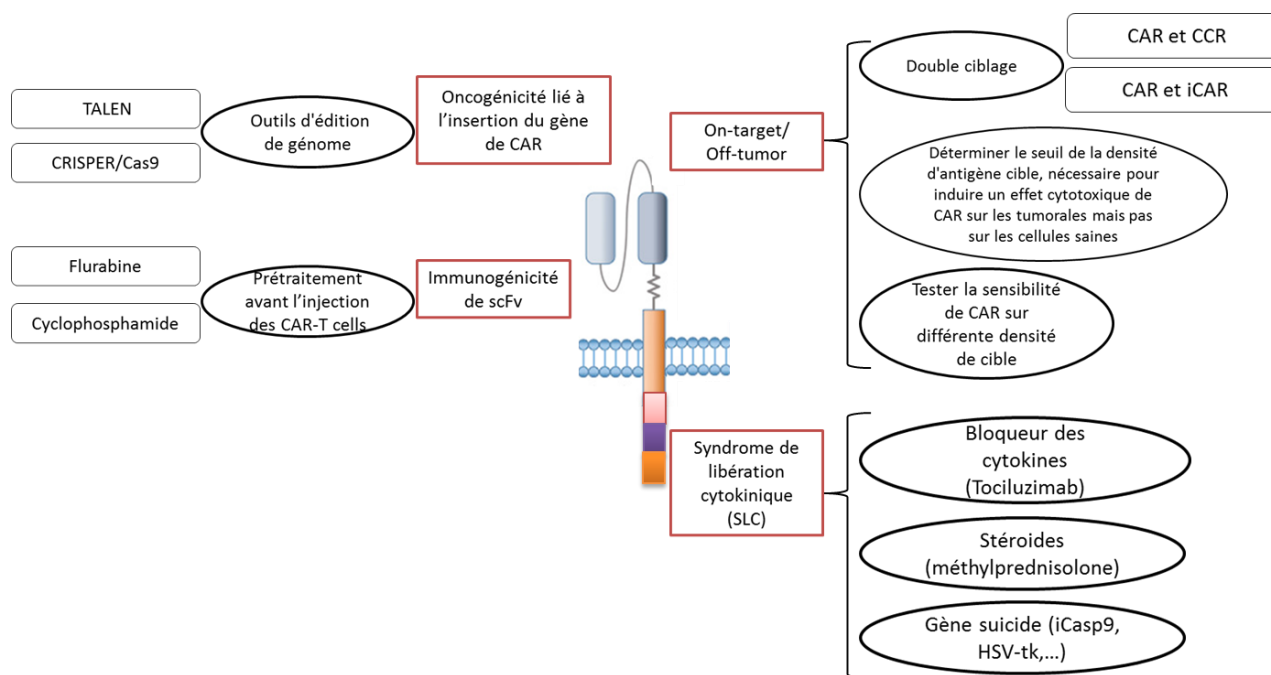
### C. Toxicité neurologique

Malgré l'absence de l'expression de l'antigène cible au niveau de système nerveux, des toxicités neurologiques ont été décrites chez 13% -52% des patients de l'ensemble des essais cliniques (Wang et al., 2017b). Ce syndrome accompagne souvent le SLC mais peut aussi être présent seul (Maude et al., 2014). Le NCI (*National Cancer Institut*) croit que tocilizumab peut temporairement aggraver la neurotoxicité, ils recommandent donc d'utiliser des doses élevées de stéroïdes plutôt que du tocilizumab pour traiter la toxicité neurologique de grade  $\geq 3$  (Brudno et al., 2016). D'autres études sont nécessaires pour déterminer la pathophysiologie et par la suite trouver la meilleure approche pour traiter ou prévenir une neurotoxicité sévère.

## VIII. Stratégies de sécurisation et de régulation de la fonction de CAR

En complément de l'identification des récepteurs d'antigènes spécifiques de tumeur, des stratégies sont en cours d'élaboration afin de prévenir les signalisations indésirables induites par le CAR. Des mécanismes de sécurité sont développés pour contrôler l'activité des CART-cells et qui améliorent soit la sécurité, soit la sélectivité tissulaire des CART-cells (**Figure 41**).





**Figure 41 : Stratégies pour limiter les effets indésirables du traitement par des CART-cells. CCR : Chimeric Costimulatory Receptor ; iCAR : inhibitory CAR. D'après (Sha et al., 2017)**

## A. Outils d'édition de génome

Le transfert de gène du CAR dans les LT se fait souvent en utilisant des vecteurs rétroviraux ou lentiviraux. Par ces méthodes le gène de CAR est inséré au hasard dans le génome de la cellule cible, de sorte que les oncogènes seraient activés si le site d'insertion est situé dans la zone proto-oncogène. Cela pourrait entraîner un risque élevé de mutation génique ou d'oncogénicité (Roy, 2001).

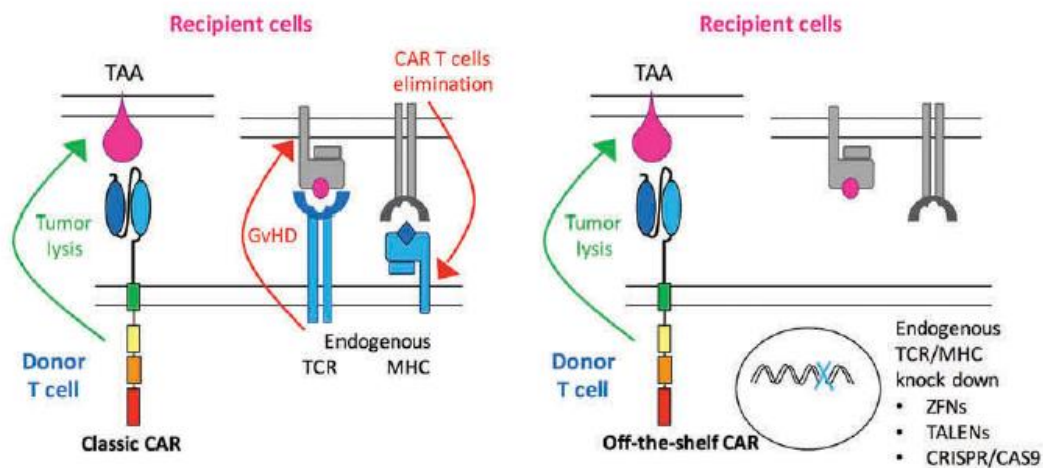
Il a été rapporté que les techniques de TALEN (*Transcription activator-like effector nuclease*), CRISPR/Cas9 (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/CRISPR associated protein 9*) et ZFNs (*Zinc Finger Nuclease*) étaient de puissants outils pour une insertion en toute sécurité. Par ces méthodes l'insertion du gène de CAR se fait dans des sites connus dans le génome de la cellule cible, où les transgènes ne perturberaient pas l'activité des gènes endogènes (Sadelain et al., 2011) (Sun et al., 2012).

### 1. CAR universels

La grande majorité des essais cliniques avec des CART-cells reposent sur l'utilisation de LT autologues. Cette thérapie présente des limites intrinsèques, y compris les coûts de

fabrication, le nombre, la qualité des LT prélevés et le temps requis pour la fabrication de cellules qui peut ne pas convenir aux patients à évolution rapide de la maladie (ex leucémies aiguës). Pour surmonter ces défis, l'utilisation de CART-cells allogéniques générés à partir de donneurs sains, tierces parties est une piste intéressante.

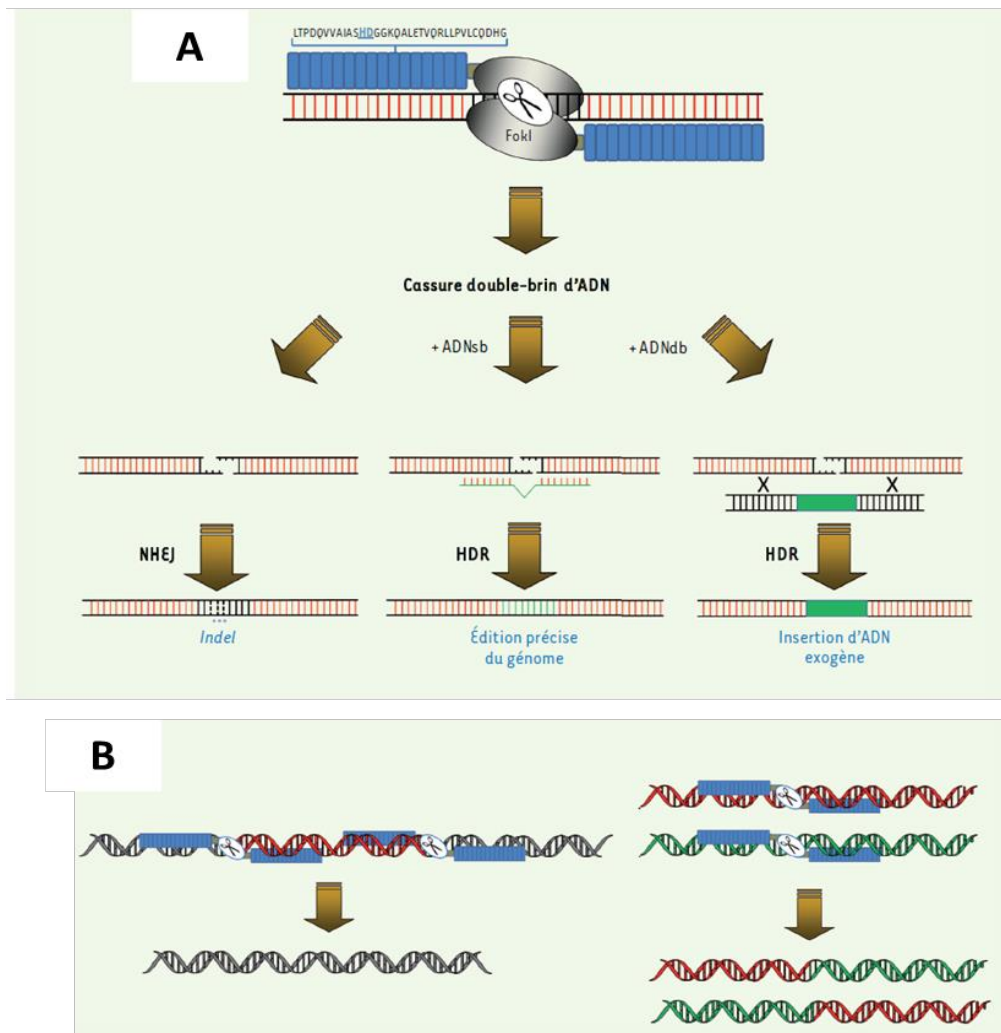
Une approche originale testée par la société Collectis consiste à préparer des CART-cells allogéniques dits « off the shelf », capables d'être administrées à tout un chacun (Poirot et al., 2015). L'idée consiste à inactiver le TCR endogène des cellules qui perdent ainsi leur réactivité allogénique potentielle. L'extinction de l'expression du TCR a été faite par l'utilisation de la technologie de TALEN. Une autre possibilité serait d'utiliser la technologie CRISPR/Cas9 pour inactiver le TCR ou les gènes codant pour les molécules HLA associées (Figure 42).



**Figure 42 : CAR universels.** A gauche, un CART-cell en allo-greffe d'une part, induit la mortalité d'une cellule cible tumorale via le CAR et le TCR (activité anti-leucémique et activité allogénique), avec une élimination potentielle du CART-cell par le système immunitaire du receveur. A droite, le CART-cell universel, exprime un CAR mais n'exprime pas un TCR (éliminer par la technique TALEN ou CRISPR/CAS9 ou ZFNs ; activité anti-leucémique, sans alloractivité) et par conséquent il n'y a pas un risque de GvHD, ni d'être éliminé par le système immunitaire du receveur.

Les TALEN sont des protéines chimériques, constituées d'un domaine de liaison à l'ADN et d'un domaine endonucléasique (FOKI), qui vont induire une cassure double-brin d'ADN en un site spécifique du génome. La réparation de la cassure peut alors s'accompagner de mutations. La réparation de cette cassure par jonction d'extrémités non homologues (NHEJ) conduit à des insertions ou délétions d'un nombre variable de nucléotides (mutations indel). En présence d'ADN matriciel simple-brin (sb) ou double-brin (db), la réparation des cassures par recombinaison homologue (HDR) permet l'introduction de substitutions nucléotidiques

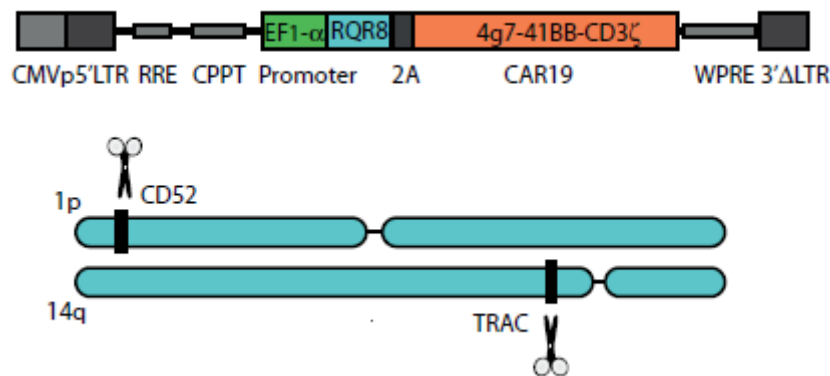
précises ou l'insertion de séquences d'ADN exogènes (**Figure 43**). De cette façon, les TALEN peuvent être utilisées pour cibler des mutations au niveau de sites choisis du génome (Dupret and Angrand, 2014).



**Figure 43 : Ingénierie des génomes par les TALEN. (A)** Les TALEN induisent une cassure double-brin (db) d'ADN en un site spécifique du génome. La réparation de cette cassure par jonction d'extrémités non homologues (NHEJ) conduit à des insertions ou délétions d'un nombre variable de nucléotides (mutations *indel*). En présence d'ADN matriciel simple-brin (sb) ou double-brin (db), la réparation des cassures par recombinaison homologue (HDR) permet l'introduction de substitutions nucléotidiques précises ou l'insertion de séquences d'ADN exogènes. **(B) L'utilisation de deux paires de TALEN en cis** sur le même chromosome conduit à la délétion des séquences (en rouge) localisées entre les deux cassures (à gauche), alors que l'introduction de cassures double-brin d'ADN sur deux chromosomes permet de générer des translocations réciproques (à droite).

Dans un essai clinique, la société Cellectis a pu obtenir une rémission complète de la maladie chez une patiente anglaise de 11 mois atteinte d'une LAL réfractaire par un CD19.CART universel (CD19.UCART). Dans cet UCART-cell la région constante de la chaîne  $\alpha$  du TCR

(TRAC) a été coupée par la technique de TALEN pour empêcher l'expression endogène de TCR et éviter l'apparition de GvHD. Ainsi que l'expression du gène codant pour CD52 (exprimé par LT) qui a aussi été éteint, afin d'éviter la sensibilité d'UCART-cell à l'alemtuzumab (anti-CD52). L'alemtuzumab est utilisé pour les LT du receveur pendant le conditionnement du patient, avant l'injection des CAR-T cells (**Figure 44**) (Qasim et al., 2017).



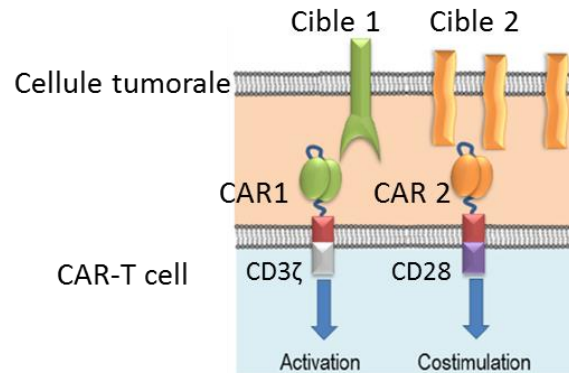
**Figure 44 : vecteur de CD19.UCAR. Vecteur lentiviral de troisième génération auto-inactivant avec des éléments de répétition terminale longue U3 (LTR) effacés et codant un transgène CAR19 (4g7) lié par un peptide auto-clivant à RQR8 (une molécule de incorporant des épitopes ciblés par anti-CD34 et anti-CD20). Le vecteur a utilisé un promoteur du facteur 1a d'élongation interne (EF-1a) et comprend un élément sensible à la Rev (RRE), un polypurine central (CPPT), et un mutant. Élément postregulatory de woodchuck (WPRE) (Qasim et al., 2017).**

Enfin, on peut rapporter un essai clinique intéressant (Clinical Trial : NCT03190278), utilisant des CART-cells universels (UCART123), ciblant CD123, bien que la phase I ait été arrêtée suite à des complications mortelles chez un patient (syndrome de lyse capillaire) atteint de leucémie à cellules dendritiques plasmacytoïdes (LpDC ou BPDCN). En effet, CD123 est exprimé faiblement par les cellules endothéliales ainsi que par les cellules souches hématopoïétiques, ce qui pourrait être la cause de ses complications. La FDA a donné son accord pour reprendre cet essai clinique en utilisant des doses de CART-cells plus faibles.

## B. Approches pour augmenter la spécificité de CART-cell

### 1. Dual CAR

L'objectif de ce type de CAR est de diminuer le risque de ciblage des cellules saines qui expriment l'antigène cible du CAR. Dans ce système le domaine de signalisation d'activation (CD3 $\zeta$ ) est séparé du domaine de signalisation de costimulation (CD28, 41-BB,...) en deux CAR séparés avec des différences de spécificités d'antigène cible (**Figure 45**).



**Figure 45 : Système Dual CAR. D'après (Gacerez et al., 2016)**

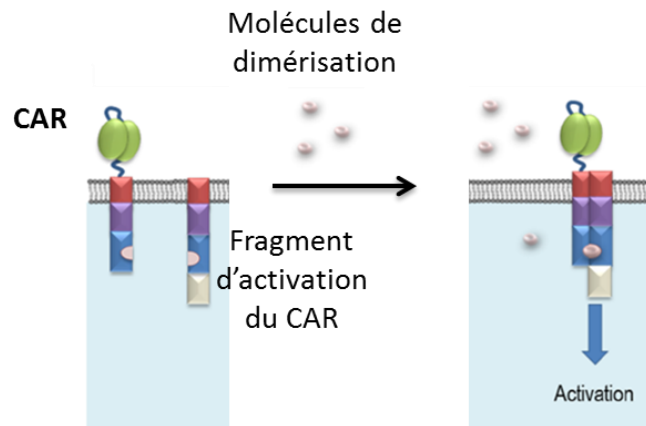
La spécificité pour la population de tumeurs est atteinte par le ciblage de deux ligands co-exprimés sur la tumeur phrase pas très compréhensible. Idéalement, les CART-cells génèrent une réponse anti-tumorale uniquement en présence des deux ligands. Ainsi, cette configuration pourrait atténuer les effets *on-target/off tumor* contre les cellules normales qui n'expriment qu'un seul des ligands ciblés. Les études (Wilkie et al., 2012) (Kloss et al., 2013) ont démontré avec succès que le système de *dual CAR* était réalisable pour créer des CART-cells fonctionnels.

Cependant, si l'antigène cible de CAR lié au CD3 $\zeta$  est fortement exprimé par la cellule cible, les CART-cell peuvent être activés par cette simple reconnaissance d'antigène. L'avidité des CAR pour leurs antigènes peut nécessiter une attention particulière pour que cette approche soit efficace et sélective uniquement pour les cellules qui expriment les deux antigènes.

## 2. Switchable CAR

Des CAR avec activation/désactivation contrôlées ont été développés (Wu et al., 2015). Ce système tourne autour de la séparation du domaine d'activation du domaine de liaison scFv (**Figure 46**). Bien que le scFv et le CD3 $\zeta$  soient attachés à la membrane, ils ne sont pas capables d'interagir et d'activer le LT même lorsque la scFv se lie à son antigène. Au lieu de

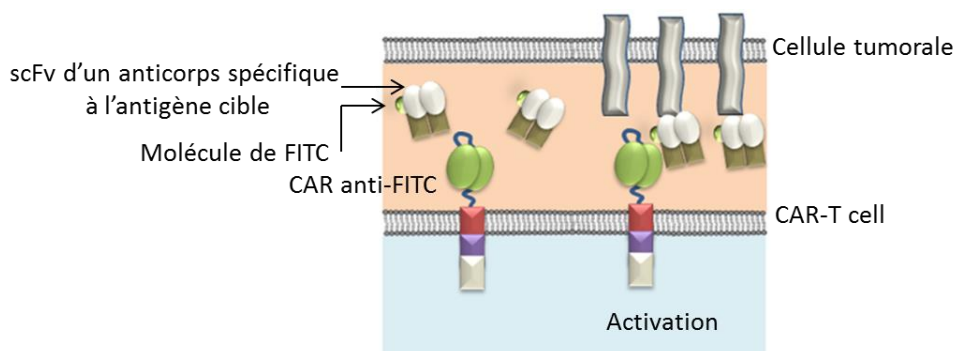
cela, les deux fragments de CAR ont été construits avec un domaine qui leur permet de faire un hétéro-dimère. Ce domaine est spécifique pour des molécules non toxiques comme Rapalog ou Gibberellin. Le CAR peut-il se monter à la membrane cellulaire et être capable de stimuler complètement la cellule T (Wu et al., 2015).



**Figure 46 : Système switchable CAR. D'après (Gacerez et al., 2016)**

Cette configuration permet de contrôler la « puissance » des CART-cells par des titrages de dose de la molécule de dimérisation, ce qui pourrait aider à freiner la toxicité immunitaire chez les patients.

Un autre type de *Switchable CAR* a été créé en utilisant un système de deux fragments d'anticorps (Ma et al., 2016) (Rodgers et al., 2016). Dans ce système, le CAR contient un scFv spécifique à un antigène tel que FITC (*Fluorescein isothiocyanate*) ou un petit peptide (**Figure 47**).



**Figure 47 : Système Switchable CAR/FITC.**

**FITC : fluorescein isothiocyanate (Gacerez et al., 2016)**

Ces antigènes seraient ensuite incorporés sur un second anticorps, soit par conjugaison spécifique du site, soit par ingénierie, l'anticorps lui-même contenant l'épitope peptidique. Cet anticorps secondaire serait spécifique pour un antigène cible. Ainsi, les CART-cells ne

devraient être activées qu'en présence du second anticorps cible spécifique, qui serait infusé. De cette manière, la puissance de la réponse des CART-cells pourrait être contrôlée en fonction de la quantité d'anticorps administrée au patient.

### 3. CAR inhibitrice

Une autre stratégie développée 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 (**Figure 48**). 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.

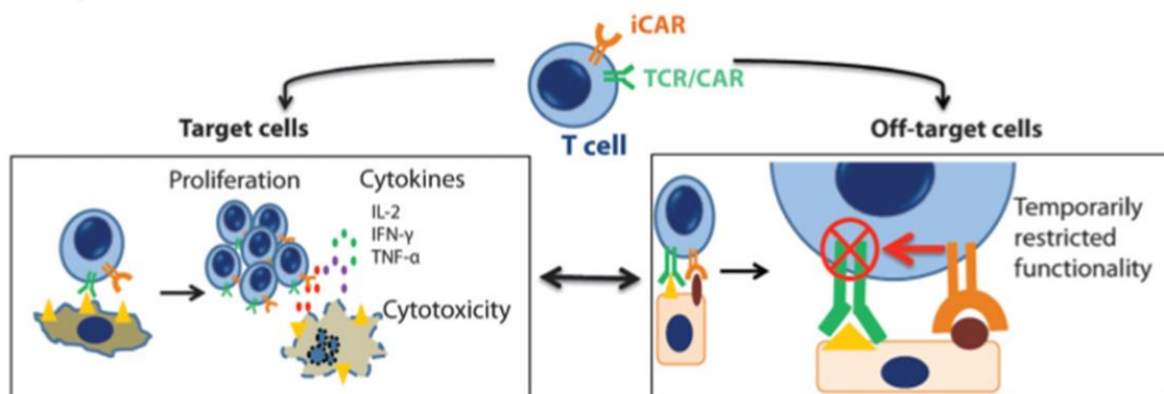
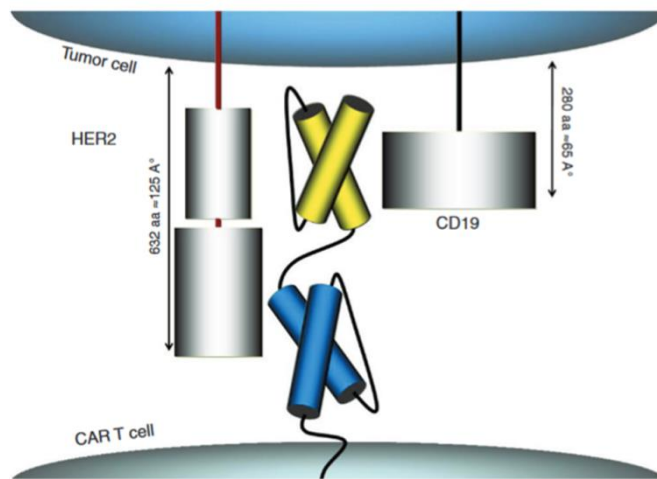


Figure 48 : Système iCAR. (Fedorov et al., 2013)

### 4. CAR bispécifiques : TanCAR

Une stratégie consiste à développer des CAR bispécifiques ou TanCAR (Grada et al., 2013). Ce type de CAR possède 2 domaines de reconnaissance exprimé en tandem. Grâce à leur double spécificité, les tanCARs permettent donc de mieux cibler les cellules tumorales ou de limiter les échappements par diminution ou perte d'expression de l'antigène cible (**Figure 49**). Il est également possible de cibler simultanément un antigène de tumeur et des éléments du microenvironnement tumoral dans le but d'optimiser la réponse antitumorale.



**Figure 49 : Système CAR en Tandem. Le CAR porte deux scFv spécifiques pour deux cibles différentes exprimées par la cellule tumorale (HER2 et CD19). HER2 : *Human epidermal growth factor receptor 2*. (Grada et al., 2013)**

### C. Approches pour induire la mortalité des cellules modifiées par le CAR

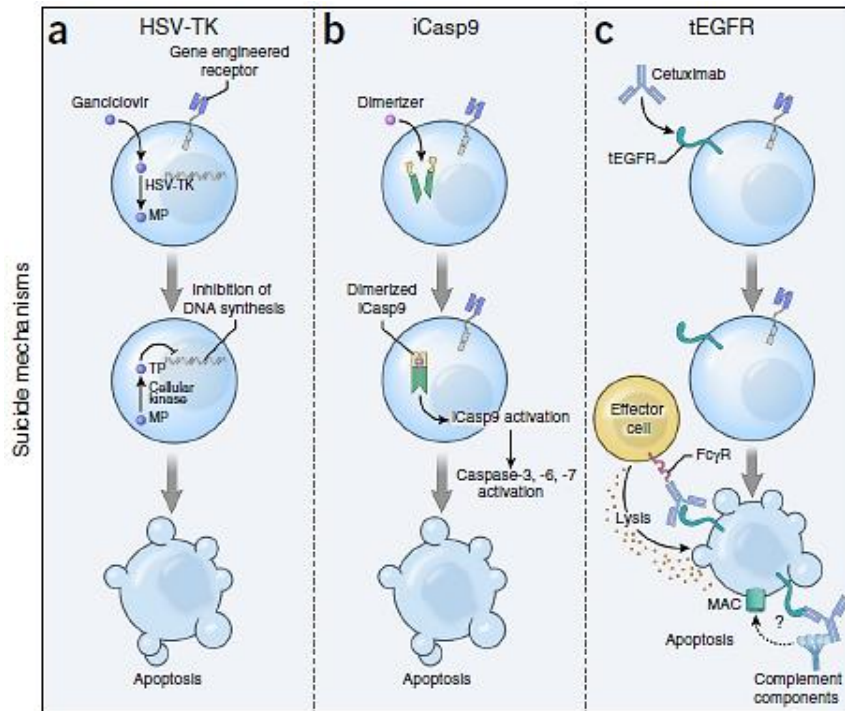
Les LT peuvent être modifiés avec un gène «suicide» qui confère une sensibilité à un médicament ou à un anticorps administrés dans le cas des effets indésirables.

Le système suicide idéal doit répondre aux critères suivant (Bonini et al., 2007):

- Être non immunogène (transgènes d'origine humaine).
- Avoir un effet de déplétion rapide (engagement en quelques heures), n'interfère pas avec d'autres traitements.
- Agir de façon indépendante du cycle cellulaire (permettant de cibler les cellules quiescentes).
- Générer aucun effet secondaire

L'activation du système suicide peut être par voie métabolique (HSV-TK/Ganciclovir) ou par voie dépendante d'un anticorps monoclonal [tEGFR/Cetuximab (CTX) ou CD20/Rituximab (RTX)] ou par l'induction d'une dimérisation par une molécule chimique (**Figure 50**).





**Figure 50 : Mécanismes d'action d'induction de la mort cellulaire de gène suicide HSV-tk (a) ; iCasp9 (b) et tEGFR (c). (Kochenderfer et al., 2010)**

### 1. Système HSV-TK/ganciclovir :

L'insertion du virus de l'herpès simplex-thymidine kinase (HSV-TK) rend les cellules T sensibles à l'antiviral ganciclovir (Bonini et al., 1997). HSV-TK est le gène suicide le plus largement testé chez l'homme, et il a été développé à l'origine pour moduler la maladie du greffon contre l'hôte (GvHD) après la transplantation allogénique (Bonini et al., 1997). Étant donné que HSV-TK est une protéine hautement immunogène dérivée du virus, les cellules qui l'expriment peuvent être immunologiquement rejetées, compromettant ainsi la persistance cellulaire (Riddell et al., 1996). D'autres stratégies de suicide cellulaire ont été développées à l'aide de constructions dérivées de protéines humaines afin de réduire le risque d'épuisement immunitaire.

### 2. Système médié par un anticorps monoclonal

Le système consiste à faire exprimer par les CART-cells une protéine membranaire tronquée (dépourvue de son domaine de signalisation intracellulaire) qui n'est normalement pas

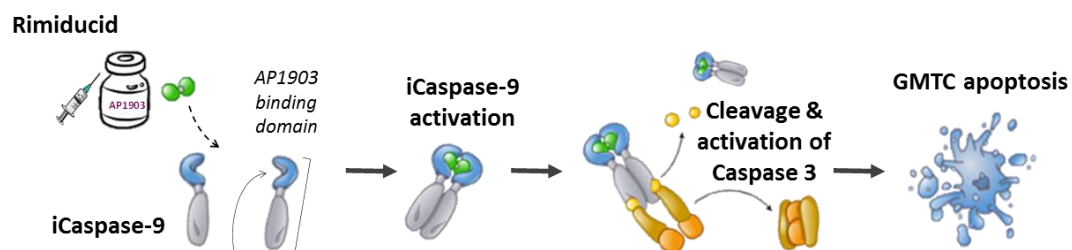
exprimée par les LT comme le CD20 ou l'EGFR. Ces deux antigènes entraînent la mort des cellules *via* le mécanisme de cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps (ADCC).

Après transduction, les LT qui expriment huEGFRt sont donc sélectionnés efficacement grâce à l'utilisation de CTX-biotinylé et de billes immuno-magnétiques anti-biotine de grade GMP. De plus, ce marqueur huEGFRt permet un suivi *in-vivo* des LT et bien évidemment leur élimination par traitement au CTX.

Contrairement au système CD20/RTX, l'utilisation de ce système présente l'avantage de ne pas dépléter les LB. Des modèles pré-cliniques ont montré que le CTX 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).

### 3. Système médié par dimérisation : iCasp9/AP1903:

La séquence de la caspase-9 humain dépourvue de son domaine d'activation endogène (CARD) est greffée sur une variante modifiée de la protéine de liaison FK506 humaine (Straathof et al., 2005). Cela permet la dimérisation et l'apoptose lors de la ligature avec un médicament dimérisant, l'AP1903. Le système suicide iCasp9 comporte une caspase 9 inductible qui en contact d'une petite molécule (AP1903) va se dimériser et permettre l'activation de la cascade des caspases : caspase 3, 6 et 7, qui vont induire et engager de façon irréversible l'apoptose des cellules (**Figure 51**).



**Figure 51 : iCaspase9/AP1903. L'AP1903 induit la dimérisation d'iCasp9, et par la suite son clivage. L'iCasp9 clivé active le caspse 3 et aboutit finalement à l'apoptose de LT génétiquement modifié (GMTC).**

L'activité in-vivo d'iCasp9 a été confirmée chez les patients atteints de GvHD aiguë après une injection de lymphocytes (modifiés par iCasp9) des donneurs allogéniques (Di Stasi et al., 2011a). Cette approche a été utilisée pour résoudre la maladie du greffon contre l'hôte (GVHD) et pourrait être utilisée aussi pour assurer la sécurité du patient lors de la thérapie par des CART-cells (Di Stasi et al., 2011a).

De plus, les cellules modifiées avec iCasp9 ont été détectées chez les patients pendant plus de 2 ans après le transfert (Zhou et al., 2014), ce qui indique que l'iCasp9 n'est pas immunogène.

## Objectif de ce travail de thèse

Dans le traitement de la LMC, avec le succès des ITKs, la problématique posée aujourd'hui est de cibler les cellules souches leucémiques (CSL) résistantes aux médicaments utilisés actuellement. Ces CSL sont identifiées par l'expression membranaire de la protéine IL-1RAP. Le ciblage de ces cellules pourrait éradiquer définitivement la maladie et éviter la rechute après l'arrêt du traitement par des ITKs suite à une rémission complète. Il reste également le cas des patients LMC dépités en phase accéléré ou blastique, pour lesquels l'allogreffe reste la seule alternative thérapeutique, avec les toxicités que l'on connaît. Enfin, les patients non répondeurs intolérants ou réfractaires aux ITKs sont des candidats à des traitements de substitution.

Les immunothérapies utilisant des Lymphocytes T (LT) modifiés pour exprimer un CAR (CART-cells) dirigés contre de CD19 ont montrés des résultats très prometteurs, voir exceptionnels dans le traitement des hémopathies B (LLC, Lymphomes, LAL-B) en rechutes ou réfractaires à plusieurs lignes de traitements, avec des taux de réponses objectives durables avoisinant les 90%.

Nous avons émis l'hypothèse que les IL-1RAP CART-cells pourraient être efficaces pour cibler les CSL résiduelles dans la LMC.

L'objectif de ce travail de thèse était de développer un CAR anti-IL-1RAP de troisième génération, sécurisé par un système suicide iCas9/AP1903. Et par la suite de tester les fonctionnalités sur des LT *in-vitro* et *in-vivo* contre des lignées leucémiques IL-1RAP+ ou cellules primaires de patient atteint de la LMC.

## Résumé de l'article

### **CML hematopoietic stem cells expressing IL-1RAP may be targets of chimeric antigen receptor (CAR)-engineered T cells**

Mots clés: *Leucémie Myéloïde Chronique (LMC), Lymphocytes T (LT), cellules souches hématopoïétiques (CSH), CAR.*

La leucémie myéloïde chronique (LMC) est un syndrome myéloprolifératif et qui est caractérisé par la présence d'un chromosome de Philadelphie (Ph1) issu de la recombinaison des gènes BCR et ABL situés respectivement sur les chromosomes 22 et 9. La protéine de fusion BCR-ABL a une activité tyrosine kinase constitutive entraînant la production et de la libération de tous les progéniteurs myéloïdes, sans arrêt de maturation dans la circulation sanguine. Les Inhibiteurs de Tyrosine Kinase (ITK) ont modifiés la prise en charge des patients amenant à une rémission hématologique chez 98% des patients. Les ITK de première génération, comme l'Imatinib Mesylate (IM), sont utilisés en première intention dans le traitement des patients atteints de LMC. La problématique posée aujourd'hui est de cibler les cellules souches leucémiques (CSL) pour des patients en réponse suboptimale ou intolérants aux ITKS, pour éviter la rechute de patient après l'arrêt de traitement par des ITK et éradiquer définitivement la maladie

Les immunothérapies utilisant des Lymphocytes T (LT) modifiés pour exprimer un CAR (CART-cells) dirigés contre des antigènes exprimés à la surface des cellules tumorales (CD19, BCMA ...) ont montrés des résultats très prometteurs, voir exceptionnels dans le traitement des hémopathies B (LLC, Lymphomes, LAL-B, myélome) en rechutes ou réfractaires à plusieurs lignes de traitements, avec des taux de réponses objectives durables avoisinant les 90%.

Actuellement plusieurs groupes de recherche tentent d'identifier des cibles appropriées pour développer une immunothérapie indépendante des ITK. Jaras et al. (PNAS, 2010) et Maria et al. (American Society of Hematology, 2013) ont identifié l'Interleukine-1 protéine accessoire du récepteur (IL-1RAP) comme une cible potentielle pour détruire les CSL (BCR-ABL1 positive) dans la LMC ou dans la Leucémie Aigue Myéloblastique (LAM).

**Nous proposons donc de développer une approche de thérapie cellulaire ciblant IL-1RAP, utilisant des Lymphocytes T (LT) redirigés par un CAR dans le traitement de la LMC et des LAM.**

Par immunisation des souris Balb/c avec la protéine recombinante IL-1RAP humaine, nous avons produit un anticorps monoclonal (AcMo) anti-IL-1RAP spécifique, nommé #A3C3.

Nous avons testé la spécificité de l'anticorps #A3C3 en cytométrie en flux, en Western blot, par immunohistochimie ou microscopie confocale, sur des lignées humaines IL-1RAP positives (KU812) ou IL-1RAP négatives (Raji). De plus, en utilisant cet anticorps, nous avons démontré par immunohistochimie, sur 20 tissus normaux différents que notre anticorps ne reconnaît ou très peu des cibles non spécifiques (off-target). Enfin, nous avons également démontré que cet anticorps permettait de détecter les CSL IL-1RAP positives dans des prélèvements primaires de moelle osseuse ou de sang périphérique de patients LMC au diagnostic ou après traitement ITK. Enfin, cet anticorps ne reconnaît pas ni les CSH normales du sang de cordon, ni les cellules endothéliales (lignée HMEC-1).

Par biologie moléculaire, nous avons séquencé et identifié les réarrangements des chaînes Lourdes (IgH) et légères (IgL) région codante pour les régions hypervariables issues des recombinaisons des domaines Variable (V), de Diversité (D) et de Jonction (J) et Variable Junction (VJ) respectivement des chaînes lourdes et légères d'#A3C3.

La séquence codante pour la « single chain fragment variable » (scFv), reliant les 2 chaînes IgH et IgL a été clonée dans un squelette lentiviral de 3<sup>e</sup> génération qui consiste à une single chain (scFv) composée de la séquence leader, d'un tag HA, des régions VDJ et VJ liées par une région « linker » (Hinge 1). Cette scFV est couplée par une 2<sup>e</sup> charnière aux gènes CD28, 4.1BB et CD3z codant pour la signalisation intracellulaire du lymphocyte T. Le vecteur CAR porte également une cassette de sécurisation composée d'un gène suicide, caspase 9 inductible (iCASP9), sensible à un agent dimérisant AP1903 et d'un gène de sélection, CD19 tronqué ( $\Delta$ CD19) dans sa partie intracellulaire. L'expression des transgènes est sous contrôle d'un promoteur EF1 $\alpha$ , addition de la séquence enhancer SP163. Le plasmide « Mock » représente le vecteur contrôle, identique, mais sans le CAR.

A l'aide de la lignée d'emballage 293T, nous avons produit des surnageant lentiviraux pour les vecteurs CAR et Mock. A partir de PBMC de donneurs sains, ou d'un patient atteint de la LMC, des CART-cells et des LT-mock ont été produits ex-vivo. L'efficacité de transduction est mesurée par l'expression CD3<sup>+</sup>/CD19<sup>+</sup> (82% en moyenne, n=5), en cytométrie en flux.

L'expression protéique de CAR a été vérifiée par western blot (bande obtenue à 55KDa) et en cytométrie par marquage avec la protéine IL-1RAP-biotinylée, attestant de son expression membranaire.

Nous avons ensuite testé la fonctionnalité de la cassette suicide iCaspase9/AP1903 sur CART-cells après 48h de traitement à l'AP1903. Nous avons montré que plus de 90% des CART-cells entrent en apoptose (Marquage 7-AAD en cytométrie en flux).

Nous avons ensuite réalisé des tests fonctionnels in-vitro et in-vivo des CART-cells contre des lignées LMC exprimant naturellement IL-1RAP ou contre des lignées transfectées pour exprimer la forme membranaire de IL-1RAP (traduite à partir du variant 1). Après co-culture des CART-cells en présence des cellules cibles IL-1RAP+ nous avons montré qu'ils prolifèrent (test CFSE), qu'ils sécrètent de l'interféron  $\gamma$  et des cytokines inflammatoires (marquage intracellulaire et dosage Cytokines Bead Array), qu'ils sont capables de dégranuler (marquage CD107a & b). Enfin, par marquage 7-AAD, nous avons démontré la cytotoxicité des CART-cells contre des lignées ou des cellules primaires leucémiques IL1-RAP+. Ces CART-cells ne reconnaissent pas des cellules transfectées pour exprimer la forme soluble d'IL1-RAP, et la présence de cette forme soluble n'altère pas avec la fonction cytotoxique des cellules.

Finalement, nous avons montré l'efficacité des CART-cells in-vivo, dans un modèle de xéno greffe tumorales dans des souris immunodéficiences NSG greffées par la lignée K562-IL-1RAP+ / Luciférase +. On constate une diminution de la masse tumorale 4 jours après injection des CART-cells, jusqu'à disparition totale de la tumeur.

En conclusion, à partir d'un AcMo produit, caractérisé et identifié moléculairement au sein de notre laboratoire, nous avons produit un vecteur lentiviral sécurisé (par un système suicide) permettant de produire des CART-cells cytotoxiques et cytolytiques, in-vitro et in-vivo, contre des cibles exprimant IL1-RAP. Cette preuve de concept laisse entrevoir des perspectives thérapeutiques alternatives dans le traitement de la LMC ou LAM, qui devront être optimiser dans des modèles murins (séquence et nombres d'injection, nombres de cellules, associations avec ITKs ou autres chimiothérapies) afin de conduire un essai clinique de phase I, pour démontrer la faisabilité et la sécurité de l'approche pour envisager une démonstration d'efficacité chez l'homme. La sécurisation par la cassette suicide permet d'envisager l'utilisation des CART-cells en situation autologue ou allogénique (*Donor Lymphocytes infusion, DLI*).

## Résultats (Article soumis)

### **CML hematopoietic stem cells expressing IL-1RAP may be targets of chimeric antigen receptor (CAR)-engineered T cells**

Scientific category: Myeloid neoplasia

Title page: CART cells in CML

Key points: CART cells specifically eliminate IL-1RAP-expressing CML stem cells

Walid Warda<sup>1,2</sup>, Fabrice Larosa<sup>3</sup>, Mathieu Neto Da Rocha<sup>1</sup>, Eric Deconinck<sup>1,3</sup>, Ziad Fajloun<sup>2</sup>, Cyril Faure<sup>4</sup>, Denis Caillot<sup>5</sup>, Marius Moldovan<sup>6</sup>, Severine Degano-Valmary<sup>7</sup>, Etienne Daguידau<sup>1,3</sup>, Francine Garnache-Ottou<sup>1</sup>, Olivier Adotevi<sup>1</sup>, Marina Deschamps<sup>1</sup>, Christophe Ferrand<sup>1</sup>

1 INSERM UMR1098, EFS BFC, Univ. Bourgogne Franche-Comté, F-25000 Besançon, France

2 Laboratory of Applied Biotechnology, Azm Centre for Research in Biotechnology and its Applications, EDST & Faculty of Sciences 3, Lebanese University, 1300, Tripoli, Liban

3 Department of Hematology, University Hospital of Besancon, Besancon, F-25000, France.

4 Department of internal medicine, Hospital of Haute Saone, Vesoul, F-70000, France.

5 Department of Hematology, University Hospital of Dijon, Dijon, F-21000, France.

6 Department of internal medicine, Hospital Nord Franche -Comté, Belfort, F-90000, France.

7 Department of pathology, Department of pathology, Besancon, F-25000, France.

#### Authorship

Corresponding author & reprints request:

Christophe Ferrand, PhD

Laboratoire de Thérapeutiques Immuno-Moléculaires et cellulaires des cancers, INSERM UMR1098, Etablissement Français du Sang – Bourgogne / Franche-Comté

1, Bd Alexandre Fleming, 25020 Besançon cedex, France

Tel: 33-3-81615615 Fax: 33-3-81615617

E-mail: christophe.ferrand@efs.sante.fr



## Abstract:

Chronic myeloid leukemia (CML) is a chronic disease resulting in expansion of myeloid cells through expression of the BCR-ABL1 fusion transcript. Tyrosine kinase inhibitors (TKIs) have considerably increased survival of CML patients, and minimal residual disease/deep-responder patients may consider stopping this treatment. However, more than 50% of patients relapse and must restart TKIs for their lifetime, with unknown toxicity consequences, suggesting that TKIs are not curative. Because CML is an immune system-sensitive disease, we hypothesized that chimeric antigen receptor (CAR) T (CART) cells targeting interleukin-1 receptor-accessory protein (IL-1RAP) expressed in quiescent CML stem cells may offer a new opening to a permanent cure. We produced and molecularly characterized a specific monoclonal anti-IL-1RAP antibody, from which fragment antigen-binding nucleotide coding sequences were cloned as a single chain into a lentiviral backbone, secured with a suicide gene system (chemical-inducible caspase 9/AP1903). We demonstrated *in vitro* and in an *in vivo* xenograft murine model that IL-1RAP CART cells can be activated in the presence of IL-1RAP-expressing cell lines or primary CML cells and specifically kill them. Overall, we demonstrated the proof of concept of a CART cell immunotherapy approach in the context of CML, applicable for young patients, patients for whom TKI treatment fails, or patients who have intolerance and are allograft candidates. In the context of a CML allograft, the allogeneic effect combined with a specific anti-tumoral benefit (e.g., Smart-DLI or donor lymphocyte infusion) must be evaluated in clinical trials.

## Introduction

Chronic myeloid leukemia (CML) is characterized by the presence of the t(9;22) chromosome translocation, giving rise to the expression of in-frame BCR-ABL1 fusion transcripts coding for a constitutively activated p210 BCR-ABL1 oncoprotein and resulting in myeloid cell expansion.<sup>1,2</sup> From radiotherapy to cytoreduction using conventional chemotherapy to targeted therapies with tyrosine kinase inhibitors (TKIs) *via* allogeneic stem cell transplantation (allo-SCT) associated or not with interferon (IFN) $\alpha$ ,<sup>3</sup> CML treatment has progressed to the point that most patients have a predicted normal life expectancy.<sup>4,5</sup>

Nevertheless, TKI discontinuation rates can be substantial,<sup>6</sup> in part because of intolerance and toxicities, potential risk in pregnancy, or medico-economic reasons.<sup>7</sup> The results of the pivotal Stop Imatinib (STIM) study<sup>8</sup> have been confirmed by many others,<sup>9</sup> and also with the second-generation TKIs,<sup>10</sup> making it possible to stop treatment for about 40% of patients who have an undetectable minimal residual disease state. The remaining portion of patients relapse at the level of superior molecular response (RM3.0), even if TKI reintroduction allows return to a deep molecular response.

Results of TKI discontinuation studies indicate that current TKIs are more of a suppressive rather than curative therapy, requiring continuous long-term administration

with unexpected and unknown adverse events. Moreover, long-term TKI administration in young CML patients may present some unforeseen future challenges.<sup>11</sup>

Detection of the BCR-ABL1 breakpoint DNA fusion gene by long-range or reverse PCR<sup>12</sup> and cell division studies<sup>13</sup> has revealed that a quiescent primitive CML stem cell compartment persists after TKI treatment by remaining insensitive and thus presenting a source of relapse. Obviously, the next challenge is to cure CML disease to avoid the need for continuous TKI treatment.

A graft-versus-leukemia immunological effect of allo-SCT, as well as efficacy of donor lymphocyte infusion, are the only therapies that allow for durable disease remission, if not cure, despite treatment-related mortality.<sup>14</sup> Thus, the persistent TKI-resistant quiescent CML precursors need to be eliminated by new approaches while avoiding as far as possible allo-SCT. Signaling pathways that regulate maintenance and self-renewal of CML stem cells – mainly Alox5, sonic hedgehog, Wnt/ $\beta$ -catenin, JAK/STAT, transforming growth factor- $\beta$ /forkhead box O, and mTOR (mammalian target of rapamycin) – are potential targets.<sup>15</sup>

In addition to the well-known graft-versus-leukemia effect of allo-SCT, other features point to CML as an immune-sensitive disease. These characteristics include immune surveillance evasion after major histocompatibility complex (MHC)-II downregulation expression by CML cells,<sup>16</sup> BCR-ABL fusion region peptides that elicit CML-specific T-cell responses,<sup>17</sup> the potential for autologous dendritic cell vaccination, the role of natural killer (NK) cells,<sup>18</sup> the anti-BCR-ABL efficacy of T-helper or cytotoxic T lymphocytes,<sup>19,20</sup> and the restoration of immune control associated with PD1 inhibition in the molecular (RM3.0) or deeper-response CML patients.<sup>21</sup> Thus, CML is a candidate for new immunotherapies. Among the options, T-cell lymphocytes that are genetically modified to express a chimeric antigen receptor (CAR) directed against a cell surface tumor-associated antigen have shown unexpected and unprecedented success not only in refractory/relapse acute lymphoblastic leukemia (ALL)<sup>22</sup> and chronic lymphoblastic leukemia<sup>23</sup> but also in solid tumors<sup>24</sup> and in many other promising preclinical studies in the field of hematology, mainly multiple myeloma (CD38, CD44v6, or CS1), acute myeloid leukemia (AML) (CD33 or CD123), T-cell malignancies (CD5), or lymphomas (CD30).<sup>25</sup>

In CML and AML,<sup>26</sup> gene expression profiling studies<sup>27,28</sup> have revealed a cell surface biomarker, interleukin-1 receptor accessory protein (IL-1RAP, IL-1R3), that is expressed by the leukemic but not the normal CD34<sup>+</sup>/CD38<sup>-</sup> hematopoietic stem cell (HSC) compartment. *In vitro* studies with CD34<sup>+</sup> cord blood cells retrovirally transduced by major (e13-or e14-a2) BCR-ABL1 transcripts confirmed upregulation of IL-1RAP.<sup>27</sup> Moreover, IL-1RAP expression is correlated with tumor burden and the clinical phase of CML.<sup>29,30</sup>

The IL-1RAP protein is a co-receptor of the IL-1 and IL-33 receptor, involved in the IL-1 signaling that activates different signaling pathways, including MAP kinase, p38, NF $\kappa$ B, and other genes implicated in inflammation and proliferation.<sup>31</sup> Its tumor cell surface expression makes IL-1RAP an ideal candidate to target and eradicate in AML or CML HSCs, which are

thought to be the origin of relapse. Antibody-dependent-cellular cytotoxicity (ADCC) evaluated using an IL-1RAP antibody not only selectively kills HSCs *in vitro*<sup>26,27</sup> but also in a xenograft murine model of CD34+/CD38- AML<sup>32</sup> or CML<sup>33</sup> HSCs.

IL-1RAP is thus a promising cell surface tumor-associated antigen eligible for targeting with novel, lower toxicity and higher efficacy immunotherapy approaches such as CAR T (CART) cells. Here, we hypothesized that T cells expressing a CAR directed against IL-1RAP may eliminate leukemic stem cell in the context of CML. This work describes the preclinical evaluation of an IL-1RAP CAR from the production and selection of the monoclonal antibody (mAb) to validation of proof of concept for this approach *in vitro* as well as in a mouse model.

## Methods

### Patient samples, healthy donor blood samples, cell lines

CML sample collection was established from patients at diagnosis and follow-up after TKI treatment (included within a non-interventional trial; ClinicalTrials.gov: NCT02842320). Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated by Ficoll gradient density centrifugation using Ficoll-Paque (Velizy-Villacoublay, France) from anonymous blood samples of healthy donors collected at the French blood center (Besançon, France). Patients and donors signed written consent in accordance with the ethical approval of the CPP-Est committee. Human tumor KU812 (CRL-2099™) and K562 (CCL-243™) or epithelial 239T (CRL-3216™) and HT1080 (CCL-121™) or HMEC-1 (CRL-3243™) cell lines were from the America Type Culture Collection and stored in a master cell bank.

### Monoclonal antibody production, selection, and molecular characterization

A mouse anti-hIL-1RAP mAb was generated by standard hybridoma technique. Briefly, BALB/c mice were immunized either by foot pad (n=3) or intraperitoneally (n=5) with a recombinant fusion protein consisting of the extracellular part of IL-1RAP and the Fc part of human immunoglobulin (Ig)G1 (R&D Systems, Lille, France). Lymph node or spleen cells and blood samples were harvested, and cells were fused with the mouse myeloma cell line, then screened by FACS analysis against positive (KU812) and negative (Raji, KG1) cell lines. A selected antibody (clone #A3C3) was more deeply characterized by western blotting, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) against recombinant IL-1RAP protein, immunohistochemistry (IHC), confocal microscopy, and primary samples of CML patients. Molecular characterization was performed by Sanger sequencing of cloned and amplified PCR product obtained using degenerate primers specific for the FR1 and constant regions of the VH and VL chains.<sup>34</sup> Identification of V-D-J-C gene rearrangement and the CDR3 region was made after alignment of consensus nucleotide sequences against the IMGT® database using the V-QUEST online tool.<sup>35</sup>

## **Lentiviral constructs, supernatant production, and genetically modified CART cell preparation**

The CAR lentiviral construct (pSDY-iC9-IL-1RAPCAR-dCD19) was prepared by cloning the synthetically produced single-chain fragment variable (scFv; derived from the #A3C3 IL-1RAP hybridoma) into the SIN-pSDY backbone (kindly provided by Dr. Mateo Negroni, CNRS-UPR 9002, Strasbourg). Lentiviral vector supernatant stock was harvested at 48 and 72 hours from subconfluent transfected 293T cells and PEG-concentrated. Titration was then performed to adjust multiplicity of infection (MOI). Activated T cells were established from healthy donors and transduced with lentiviral supernatant encoding the Mock or the CAR IL-1RAP constructs according to the procedure described in Figure 7A. Briefly, a 9-day process comprised activation (CD3/CD28 beads), IL-2 transduction at day 2, and magnetic selection for CD19<sup>+</sup> cell surface expression. Gene-modified T cell (GMTC) CD3<sup>+</sup>/CD19<sup>+</sup> cells (mainly expressing CAR) were evaluated by flow cytometry.

### **CAR expression at the T cell surface**

The CEM cell line or primary T cells were transduced either with Mock or CAR IL-1RAP. Cells were then incubated in the presence of increasing amounts of recombinant IL-1RAP labeled with biotin. Staining was performed with an anti-biotin fluorescent antibody and analyzed by flow cytometry. Percentage of biotin<sup>+</sup>/CD19<sup>+</sup> CEM or T cells was plotted against amount of labeled biotin recombinant protein. Dot plots of cytometry analyses were provided for representative staining, including maximum. Untransduced cells (C0) or Mock T cells are used as control. (B) Effect of IL-1RAP recombinant protein on CART cell cytotoxicity. Serial amounts (from 0.125 ng/mL to 10 µg/mL) of IL-1RAP recombinant protein were added for 24 h in E:T (1:1) co-culture with KU812. Gating on target IL-1RAP<sup>+</sup> cells allowed for evaluation of persisting cells.

### **Western blotting, subcellular fractioning, immunohistochemistry, tissue microarray, and confocal microscopy**

Whole-cell, subcellular, or secreted protein fractions of cells were obtained after sonication and suspended in RIPA buffer supplemented with a protease inhibitor cocktail. Transferred proteins on membranes were probed overnight with primary IL-1RAP #A3C3 (diluted at 1:10<sup>3</sup>), CD3ζ, or β-actin, respectively, for IL-1RAP, CAR, or β-actin expression. Detection was performed with a camera and Bio-1D software (Vilber-Lourmat, Collegien, France). IHC was performed on paraffin-embedded or frozen IL-1RAP–positive or –negative cell line pellets. A US Food and Drug Administration standard frozen tissue array, including 90 tissue cores (30 organs) of three individual donors per organ (US Biomax, Rockville, MD, United States), was incubated in the same conditions as above. Confocal microscopy was assessed on KU812 and Raji cell lines concentrated on slides (Superfrost™ Plus, 4951PLUS4, ThermoFisher Scientific) by Cytospin.

## **Flow cytometry**

HSCs from CML patients were tracked using a panel containing CD45, CD34, CD38 and including our murine Alexa Fluor 488–labeled IL-1RAP mAb. Clone #A3C3 transduced cells were stained using a panel of antibodies including CD3, CD4, CD8, and CD19 to differentiate helper or cytotoxic GMTCs. Cells were collected with a CANTO II cytometer (BD Biosciences, Le Pont-de-Claix, France) and analyzed with DIVA 7.0 software (BD Biosciences, Le Pont-de-Claix, France). The mAbs used for phenotyping, intracellular staining, and cytometry and other cytometry reagents are described in Table S1.

## **CD107 degranulation assay**

T-cell–mediated cytotoxic activity was analyzed with a CD107 degranulation assay. CD107a&b degranulation assay. T cells transduced or not (with Mock or IL-1RAP CAR) were co-cultured at an E:T=1:5 for 6 h with target cells expressing or not IL-1RAP. Effector was treated with monensin (BD Biosciences, 51–2092 KZ) and stained with CD107a and CD107b mAbs for 1 h at 37°C. After 5 h, CD3<sup>+</sup>/CD19<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> cells were analyzed by flow cytometry for CD107a and CD107b staining. PMA/Iono activation was used as control.

## **Test of cell cytotoxicity**

Effector cells were labeled with e-Fluor-v450, prior to co-culturing at a 1:1 E:T ratio, in the presence or not of target cells expressing or not IL-1RAP. Gating of cells against FSC and 7-AAD labeling allowed discrimination of target cells from effectors and from living cells. Percentage of persisting target cells in the presence or not of effectors was determine in the gate FSC<sup>+</sup>/7-AAD<sup>-</sup>. Untransduced or mock-transduced T cells were used as control.

## **Test of iCaspase9/AP1903 system function**

Activation of the chemical-inducible caspase 9 (iCASP9) safety switch was performed at 10 nM of dimerizer (AP1903), and induction of apoptosis was monitored 24 or 48 hours later using Annexin-V/ 7-Amino actinomycin D (7-AAD). The absolute cell-death quantification was determined with Trucount tubes based on 5000 fluorescent-bead cytometry acquisition.<sup>36</sup>

## **IFN $\gamma$ intracellular staining and cytokine release within culture supernatants by multiplex analysis**

The K562-IL-1RAP-variants 1 or 5, KU812 cells were mixed with 2.106 T or CART cells at a predefined 1:5 E:T ratio for studying effector IFN $\gamma$  synthesis by intracellular staining. We use the human Th1/Th2/Th17 Cytokines Bead Array Kit (BD Biosciences) allowing quantification of human IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , and IL-17A secretion, in accordance with the manufacturer's instructions. Briefly, supernatants of overnight culture of 1.10E5 CART cells in the presence of target cells (ratio 1:5) or not (control) were incubated for 3h with beads and phycoerythrin (PE) conjugated anti-cytokine antibodies. Beads were washed and acquired by standardized flow cytometry assay. Data were analyzed using FACSDiva™ Software Version 7.0 (BD

Biosciences). As a control, we measured the supernatant collected from target cells only. For co-culture of IL-1RAP-positive cell culture supernatant with effectors, supernatants were diluted at 1 in 3. Medium and PMA/Iono were used as negative and positive controls, respectively.

### **Test of cell proliferation**

CART cell proliferation was analyzed by measuring the carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE) Gating strategy for flow cytometry CFSE dilution analysis. Untransduced (C0) and Mock (MockT) or IL-1RAP CAR (IL-1RAP CART) transduced T cells were cultured in medium alone or in contact with IL-1RAP-, cell surface- (K562-v1 and KU812), or soluble (K562-v5) IL-1RAP+-expressing target cells, at an E:T ratio of 1:1. Effectors were previously labeled with 0.5  $\mu$ M CFSE without IL-2 supplementation. After 96 h of co-culture without IL-2 supplementation, divisions of live CD3+/CD19+ gated cells were assessed by flow cytometry to measure CFSE dye dilution.

### **Xenograft murine models**

Animal protocols were performed under control of the animal care and use committee of the University of Besançon.

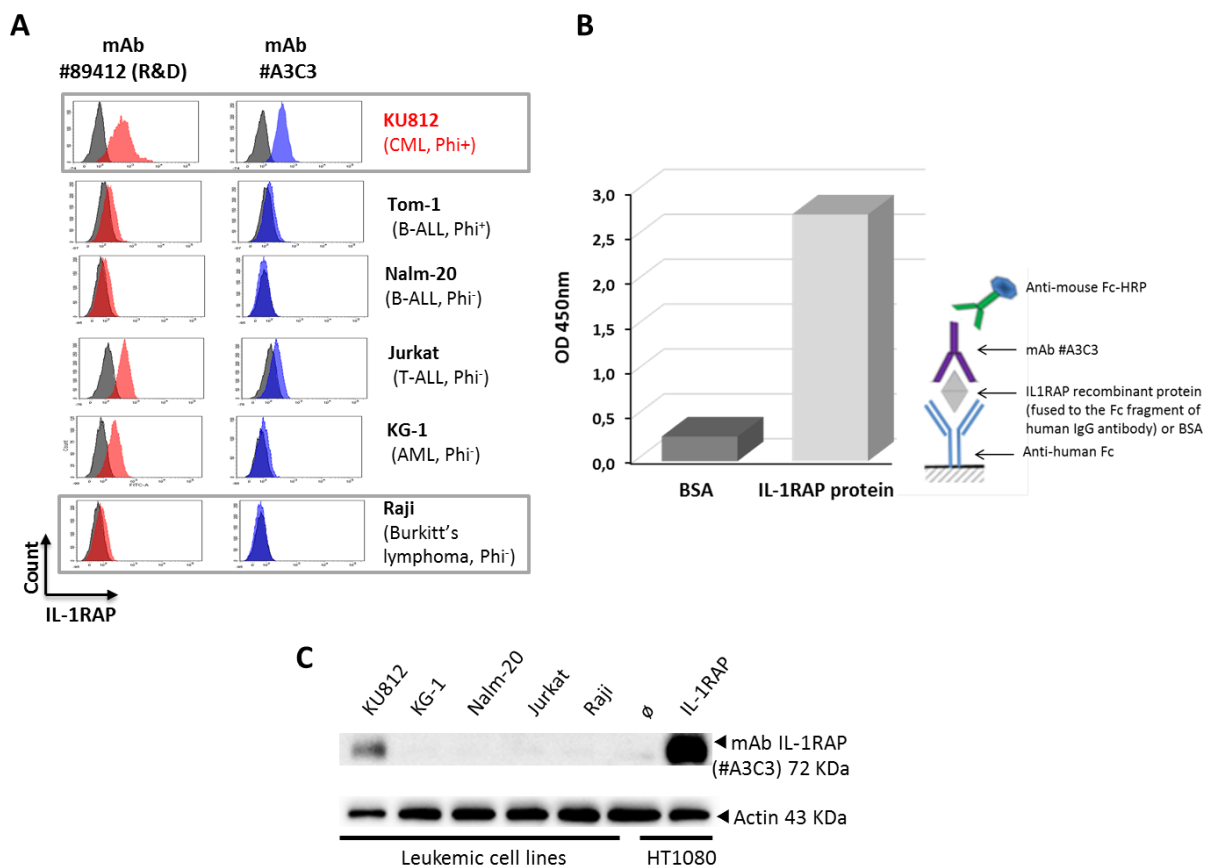
NSG mouse K562 xenograft model were sub-lethally irradiated at a dose of 2 Gy (n=3/group or n=6/group in the second experience) 24 h before tumor transplantation. Ten $\times$ 10E6 bulk cells of K562-v1, containing 97.3% of IL-1RAP<sup>+</sup>-, luciferase<sup>+</sup>-, and green fluorescent protein (GFP) positive-expressing cell line (K562-v1<sup>IL-1RAP+/GFP+/Luc+</sup>) and 2.7% K562-v1<sup>IL-1RAP-/GFP-/Luc+</sup>) were then transplanted by i.p. injection. MockT or IL-1RAP CART cells were injected once i.p. 4 days after tumor injection. A group of K562-v1<sup>IL-1RAP+/GFP+/Luc+</sup> -injected mice but untreated by T cells was used also as controls. Tumor burden were analyzed every week either bioluminescence analysis (i.p injection of D-Luciferin 200ng/mice). We are used Bioluminescence imaging on a Nightowl until D46.

## Results

### Anti-IL-1RAP mAb, clone #A3C3, exhibits specific recognition of human IL-1RAP antigen

The monoclonal IL-1RAP antibody used in this study was generated by a standard hybridoma technique after intraperitoneal or footpad mouse immunization with human IL-1RAP recombinant protein. Screening of the hybridoma allowed for selection of #A3C3 mAb subclone with a ratio fluorescent intensity (RFI) >2 the IL-1RAP–positive cells (KU812, Phi<sup>+</sup>p210 CML) from negative cell lines (Tom-1, NALM-20, Jurkat, or Raji, respectively Phi<sup>+</sup>p190 B-ALL, Phi<sup>-</sup> B-ALL, T-ALL, or Burkitt’s lymphoma) (Figure 1A).

We also confirmed by ELISA that #A3C3 mAb recognizes the IL-1RAP recombinant protein (Figure 1B). Moreover, the use of the #A3C3 mAb in western blot also recognizes IL-1RAP protein at the expected length 72KDa (Figure 1C).



**Figure 1. IL-1RAP mAb (#A3C3) characterization. (A) Screening of produced IL-1RAP mAbs using different hematopoietic CML, ALL, AML, or lymphoma T or B cell lines (Phi<sup>+</sup> or Phi<sup>-</sup>) cell lines. (B) *In vitro* detection of recombinant IL-1RAP protein by ELISA test. BSA=bovine serum albumin; OD=optical density. An anti-IL-1RAP murine mAb (IgG1 Clone# 89412, R&D Systems) was used as staining comparison. Ratio of fluorescence intensity (RFI) for each IL-1RAP staining is provided. (C) Western blotting on whole cellular lysates of different cell lines probed with the #A3C3 IL-1RAP antibody. A transfected HT1080 cell line with IL-1RAP cDNA variant 1 was used as a positive control. Actin was revealed as a protein loading control.**

Confocal microscopy clearly showed cell membrane staining corresponding to the IL-1RAP expression (Figure 2A). Immunohistochemistry on cell lines confirmed the specificity of this mAb by staining for IL-1RAP<sup>+</sup> (KU812) but not IL-1RAP<sup>-</sup> (Raji) cells (Figure 2B).

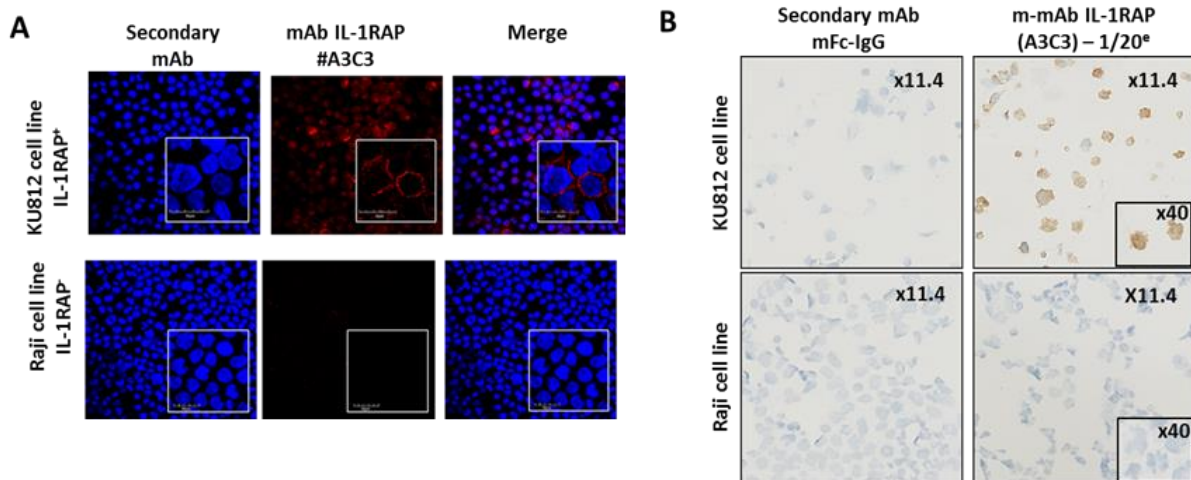


Figure 2. IL-1RAP mAb characterization in (A) Confocal microscopy and (B) immunohistochemistry on KU812 and Raji cell lines.

### Anti-IL-1RAP mAb, clone #A3C3 recognize specifically the CML leukemic stem cells

The integration of the #A3C3 mAb into a panel of antibodies allowed discrimination of IL-1RAP<sup>+</sup> leukemia-expressing CD34<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup> or CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> stem cell subpopulations in bone marrow or peripheral blood of patients at diagnosis or after 12 months of imatinib (Figure 3). Moreover, mAb #A3C3 did not detect the few HSCs or progenitors from normal cord blood (Figure 3).

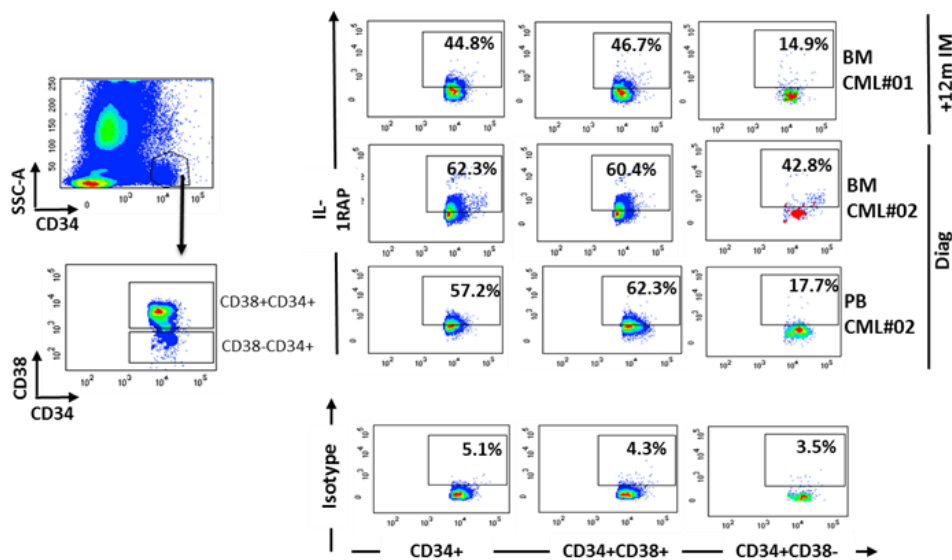
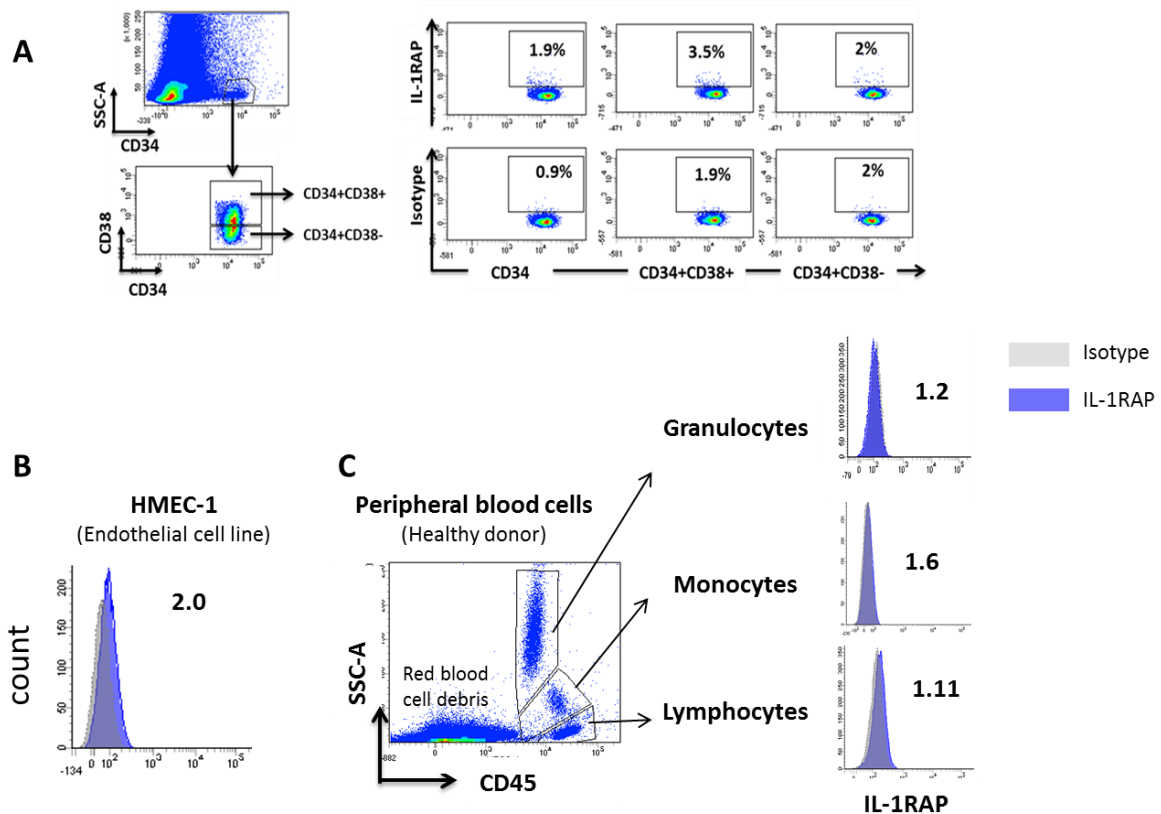


Figure 3. A3C3 detect IL-1RAP expression on the leukemic cell surface . Flow cytometry analysis on primary cells from CML patient. Immunophenotyping on peripheral blood (PB) or bone marrow (BM) of 2 CML-positive patients at diagnosis (Diag) or after imatinib (IM) treatment. IL-1RAP (#A3C3) was used in combination with CD34<sup>+</sup> and CD38<sup>-</sup> fluorescent staining. Fluorochrome-conjugated isotype control mAbs from the different mAbs were systematically used.



Contrariwise, #A3C3 mAb doesn't recognize normal HSCs in cord blood (Figure 4A), or recognize endothelial cells (HMEC-1 endothelial cell line) (Figure 4B). In addition, #A3C3 mAb does not recognize monocytes, granulocytes or lymphocytes in peripheral blood from healthy donor (Figure 4C).

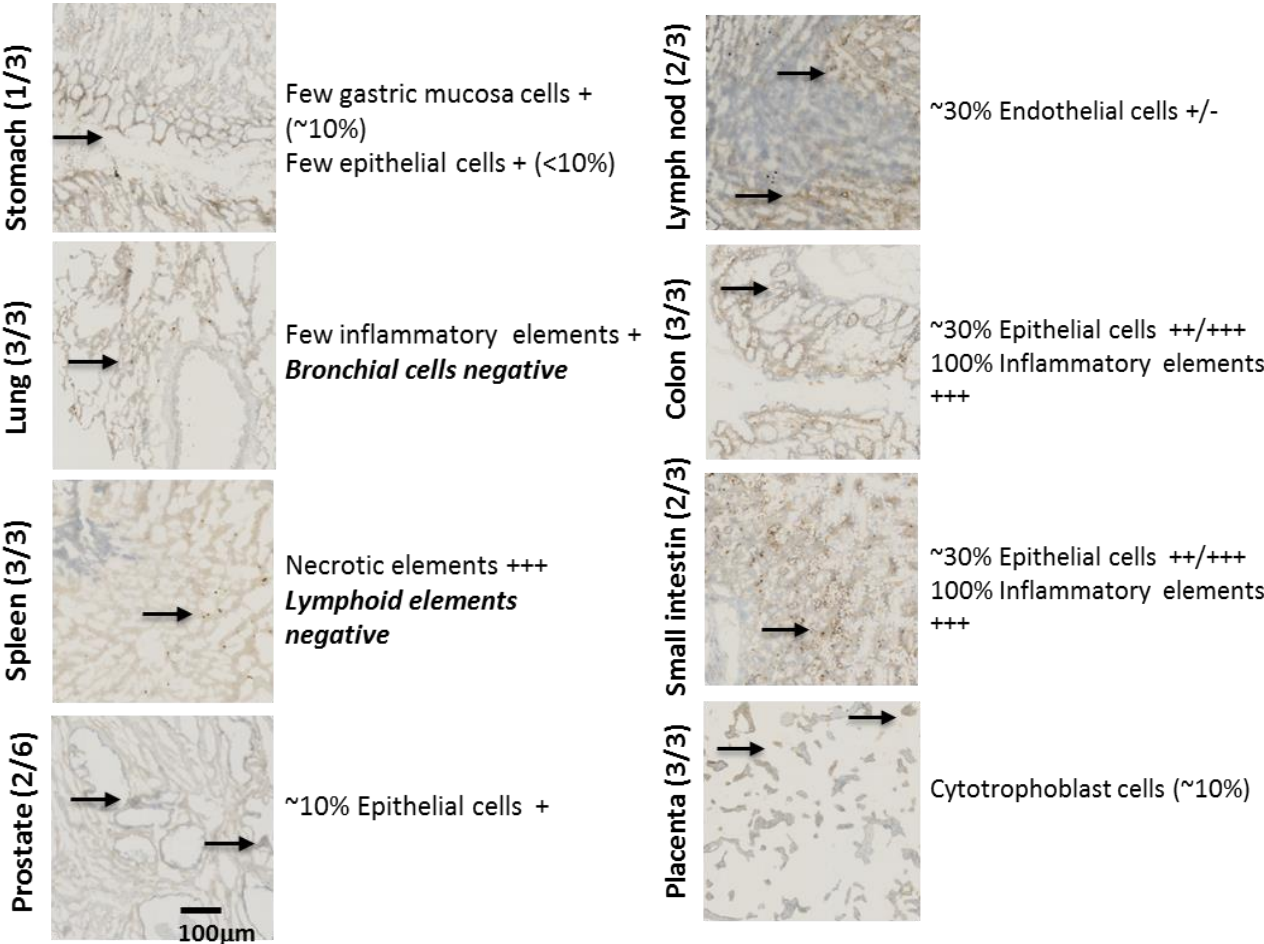


**Figure 4. A3C3 doesn't stain normal hematopoietic cells or endothelial cell line .** Flow cytometry analysis on primary CD34+ cells in cord blood. Immunophenotyping on peripheral blood (PB). IL-1RAP (#A3C3) was used in combination with CD34+ and CD38- fluorescent staining. Fluoroconjugated isotype control mAbs from the different mAbs were systematically used. **(B) Immunophenotyping on endothelial cell line (HMEC-1)** by IL-1RAP (#A3C3) or **(C) peripheral blood cells:** monocytes cells or granulocytes or lymphocytes, by IL-1RAP (#A3C3) and CD45 staining (Blue color). A IgG isotype (Gray color) was used.

### Anti-IL-1RAP mAb, clone #A3C3 doesn't or weakly recognize the normal tissues

To study specific or non-target tissue binding we investigated IL-1RAP expression using a tissue microarray of 30 normal human tissues and the #A3C3 mAb. Staining was detected in only six Tissues – lymph node, colon, small intestine, placenta, stomach, and prostate – mainly in epithelial or endothelial cells at various intensities (Figure 5).

Taken together, these results indicate that the #A3C3 IL-1RAP mAb is a good candidate for a CAR design and that CART cell immunotherapy may be associated with low side effects.



**Figure 5.** (A) Tissue microarray. To study specific or non-target tissue binding, a US Food and Drug Administration standard frozen tissue array, including 90 tissue cores (30 organs) of 3 individual donors per organ (US Biomax, Rockville, MD, USA), was incubated in the same conditions as described in Figure 1. Immunostaining was detected using the UltraView Universal DAB Detection Kit (Ventana, USA). Images were acquired and analyzed with NDP.view 2 software. The staining intensity was graded as follows: negative (0), weak (1+), moderate (2+), or strong (3+). High IL-1RAP (KU812)- or negative (Raji)-expressing cell lines were respectively used as positive or negative controls. Representative (1 of n=3) IL-1RAP staining of whole human cord blood cells (upper panel) and of CD34+/CD38- and CD34+/CD38+ HSC subpopulations (lower panel).

**Table 1.** IL-1RAP (mAb#A3C3) immunostaining of normal tissues.

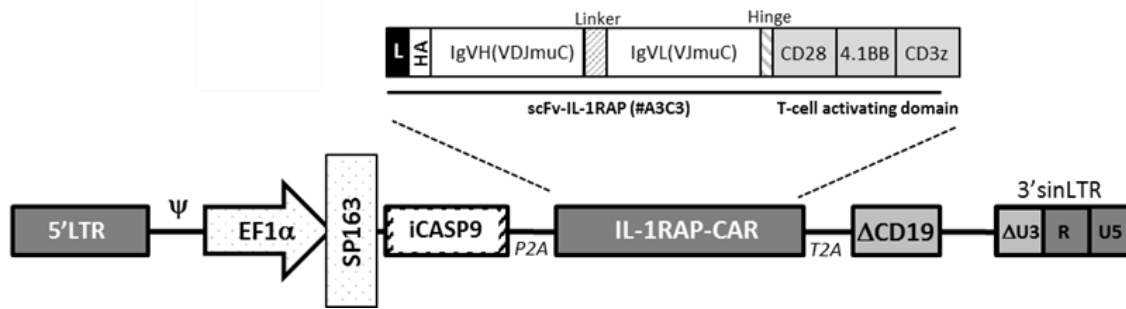
A US Food and Drug Administration standard frozen tissue array, including 90 tissue cores (30 organs) of 3 individual donors per organ. The staining intensity was graded as follows: negative (0), weak (1+), moderate (2+), or strong (3+). High IL-1RAP (KU812)- or negative (Raji)-expressing cell lines were respectively used as positive or negative controls.

Tissues (replicates)	Staining intensity of IL-1RAI (0 to 3+)	Comments
Lymph node 1	2+	~30% of endothelial cells
Lymph node 2		
Lymph node 3	1+	
Skeletal muscle 1	1+	~10% of endothelial cells
Skeletal muscle 2	0	
Skeletal muscle 3	0	
Prostate 1	1+	~10% of endothelial cells
Prostate 2	1+	
Prostate 3	0	
Prostate 4	0	
Prostate 5	0	
Prostate 6	0	
Kidney 1	0	
Kidney 2	0	
Kidney 3	0	
Liver 1	0	
Liver 2	0	
Liver 3	0	
Lung 1	2+	Few inflammatory elements
Lung 2	2+	
Lung 3	2+	
Stomach 1	1+	Few gastric mucosa cells (~10%); few epithelial cells <10%
Stomach 2	0	
Stomach 3	0	
Esophagus 1	0	
Esophagus 2	0	
Esophagus 3	0	
Heart 1	0	
Heart 2	0	
Heart 3	0	
Colon 1	3+	Epithelial cells (~30%); inflammatory elements (100%)
Colon 2	3+	
Colon 3	3+	
Small intestine 1	2+	Epithelial cells (~30%); inflammatory elements (100%)
Small intestine 2	0	
Small intestine 3	1+	Epithelial cells (~30%); inflammatory elements (100%)
Peripheral nerve 1	0	
Peripheral nerve 2	0	
Peripheral nerve 3	0	
Smooth muscle 1	0	
Smooth muscle 2	0	
Smooth muscle 3	0	
Cerebellum tissue 1	0	
Cerebellum tissue 2	0	
Cerebellum tissue 3	0	
Ovary 1	0	
Ovary 2	0	
Ovary 3	0	

Pancreas 1	1+	Cytotrophoblast cells (~10%)
Pancreas 2	1+	
Pancreas 3	1+	
Salivary gland 1	0	
Salivary gland 2	0	
Salivary gland 3	0	
Pituitary gland 1	0	
Pituitary gland 2	0	
Pituitary gland 3	0	
Placenta 1	0	
Placenta 2	0	
Placenta 3	0	
Skin 1	0	
Skin 2	0	
Skin 3	0	
Spinal cord 1	0	
Spinal cord 2	0	
Spinal cord 3	0	
Spleen 1	3+	Necrotic elements
Spleen 2	3+	
Spleen 3	3+	
Skeletal muscle 1	0	
Skeletal muscle 2	0	
Skeletal muscle 3	0	
Testis 1	0	
Testis 2	0	
Testis 3	0	
Adrenal gland 1	0	
Adrenal gland 2	0	
Adrenal gland 3	0	
Thyroid gland 1	0	
Thyroid gland 2	0	
Thyroid gland 3	0	
Ureter 1	0	
Ureter 2	0	
Uterine cervix 1	0	
Uterine cervix 2	0	
Uterine cervix 3	0	

### Construction of chimeric antigen receptor, secured by iCasp9 suicide gene

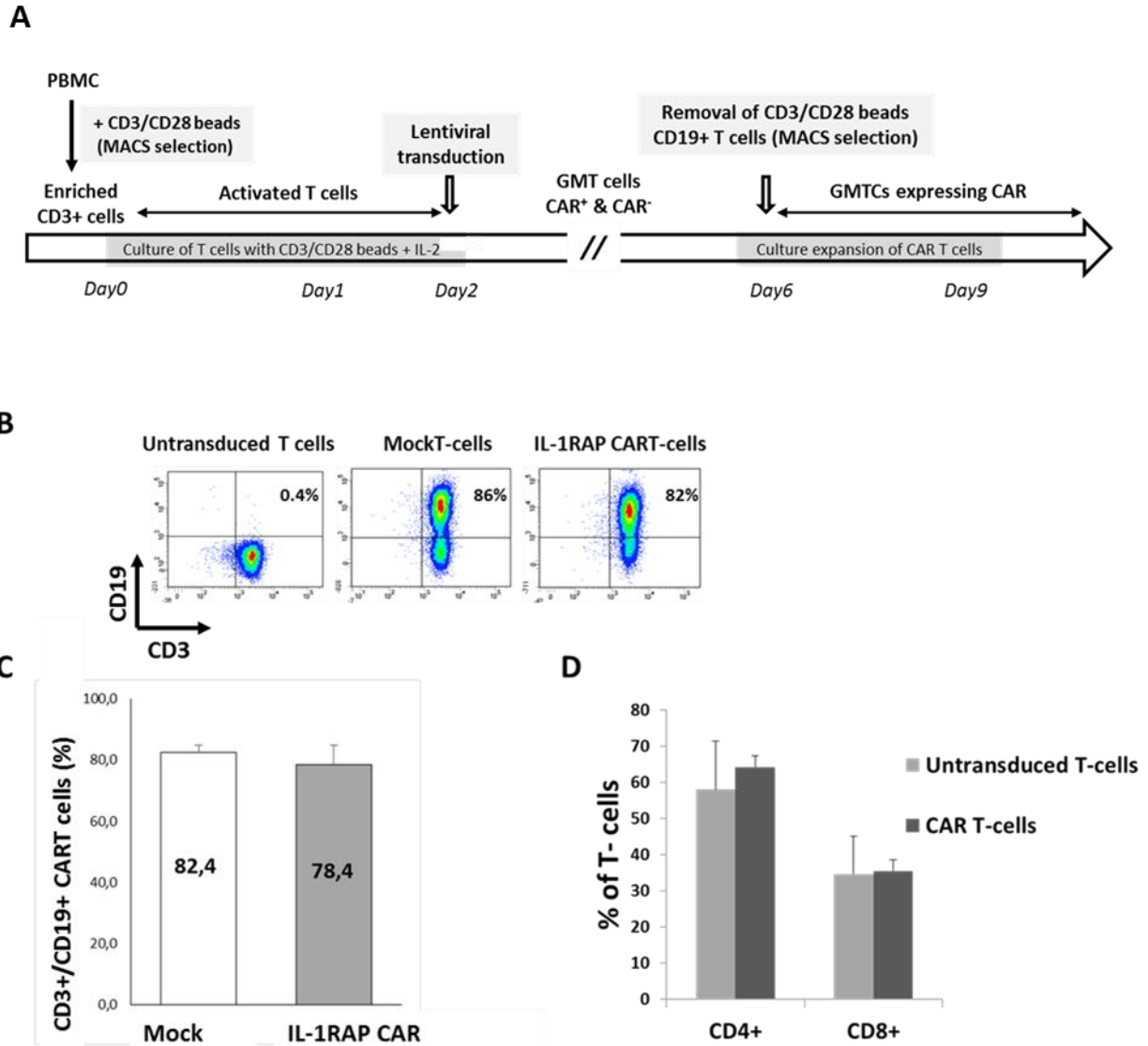
Based on molecular sequencing of VDJ or VJ rearrangements and CDR3 nucleotide sequence determination, we designed a self-inactivating lentiviral construct carrying the safety cassette iCASP9, the scFv of mAb #A3C3, and a cell surface-expressed marker  $\Delta$ CD19 for monitoring and potential cell selection. All three transgenes were separated by 2A peptide cleavage sequences and under control of the elongation factor 1 alpha (EF1) promoter plus the SP163 enhancer sequence (Figure 6).



**Figure 6. Generation of IL-1RAP CAR-expressing gene-modified T cells.** Schematic overview of the IL-1RAP lentiviral vector. The construct carries three different parts, the suicide safety cassette iCASP9, the IL-1RAP CAR, and a cell surface and selection marker such as  $\Delta$ CD19 (CD19 truncated at the intracellular part to avoid signaling), separated by 2 different 2A ribosomal skip sequences (P2A and T2A) under control of the EF1 $\alpha$  promoter with the SP163 enhancer added. The scFv, consisting of variable regions of the VH and VL sequence chains of the #A3C3 immunoglobulin is cloned in-frame with the CD28-4.1BB-CD3 $\zeta$  signaling chain and under control of the EF1 $\alpha$  promoter and the SP163 enhancer. The IL-1RAP CAR contains scFv associated with a leader sequence (L), tagged with human influenza hemagglutinin (HA), and connected through a hinge domain to a T-cell activating domain consisting of 2 co-stimulatory domains (modified transmembrane and intracellular signaling CD28 and 4-1BB) and CD3 $\zeta$  intracellular signaling.  $\Psi$ : HIV-1 packaging signal required for the packaging of viral RNA into virus.  $\Delta$ U3RU5 LTR: A truncated version of the HIV-1 3' long terminal repeat that deletes the U3 region; SIN: Self inactivating. Mock T consists of the same construct without IL-1RAP scFv.

### Efficient generation of IL-1RAP CAR-expressing T cells using lentiviral gene transfer

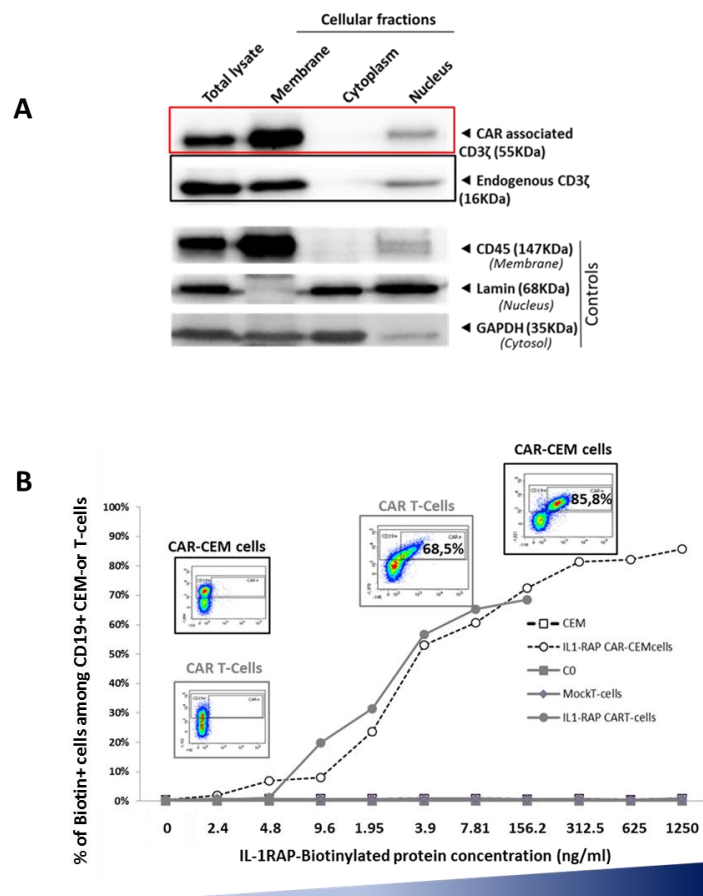
The *in vitro* production process (Figure 7A) with lentiviral supernatant (SN) allowed for transduction of primary T cells from 82.4% $\pm$ 2.09 to 78.4% $\pm$ 7.39, respectively, at MOIs of 2 (n=4; 1.56.10E<sup>6</sup> and 1.98.10E<sup>6</sup> infectious viral particles/mL, respectively, for Mock or CAR IL-1RAP supernatant) (Figure 7B and C). We chose to use an MOI of 2 that produced a high transduction efficiency to generate sufficient cells for functional studies. Our GMTC manufacturing process using CD3/CD28 beads and IL-2 (500U/mL) for the activation step allowed for preservation of the initial CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> ratio found in PBMCs (means 55.25 $\pm$ 7.89 vs 57.98 $\pm$ 13.58 and 34.28 $\pm$ 10.1589 vs 42.68 $\pm$ 8.66, respectively, for CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> cells; n=4) (Figure 7D).



**Figure 7. (A) Diagram summarizing the procedure for generating IL-1RAP CART cells.** CD3<sup>+</sup> T lymphocytes from healthy donor PBMCs were activated with anti-CD3/CD28 beads according to the manufacturer's instructions, and then isolated over a magnetic column. On day 2, activated T cells were transduced by spinoculation, in contact with the SN. Transduction efficiency was determined by performing flow cytometric analysis to identify  $\Delta$ CD19 cell surface marker expression. Four days after transduction, CD19-positive cells labeled with CD19 microbeads were magnetically separated using a MACS column. The isolated CD19-expressing cells were expanded in complete X-vivo medium and cryopreserved. **(B) CD3<sup>+</sup>/CD19<sup>+</sup> staining of untransduced cells (C0), MockT cells, and IL-1RAP CART cells.** Gating for negative/positive threshold (CD19<sup>+</sup>) determination is given by the C0 (lower left panel). **(C)** Transduction results obtained with 100 $\times$  concentrated lentiviral supernatant (MockT and CAR) are shown as mean $\pm$ standard deviation (SD) from 6 independent transductions of 6 different donor PBMCs (lower right panel). **(D) Lymphocyte CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> subsets phenotyping in GMTC compared to initial PMBCs.** CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> percentages within PBMCs prior to transduction and within IL-1RAP CAR gene-modified T cells. Mean $\pm$ SD from 4 independent CART cell production experiments is also reported.

## Determination of the surface expression of CAR transduced T cells

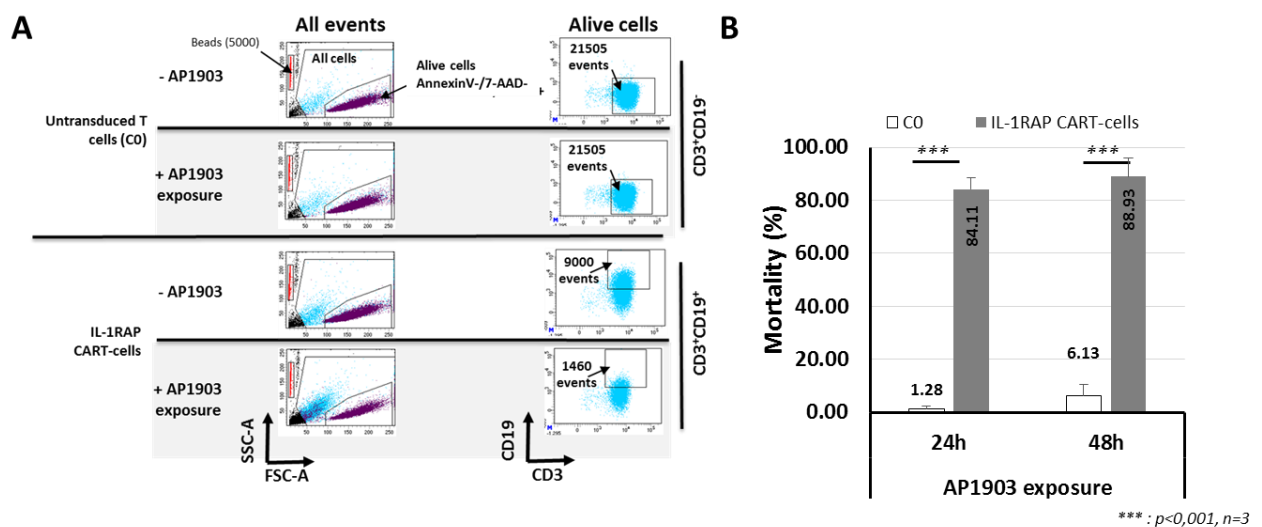
Western blotting on subcellular fractions showed that the IL-1RAP CAR is associated with CD3 $\zeta$  signaling (signal at 55 kDa compared to the expected endogenous CD3 $\zeta$  signal at 16 kDa) (Figure 8A). Additional analysis using serial dilution of biotinylated IL-1RAP protein (from 0 to 1250 ng/mL) and FACS analysis allowed detection of either IL-1RAP CAR transduced CEM T cell line or primary T cells. A single experiment showed that different amounts of recombinant protein (7.81 and 1250ng/ml) are respectively required for recruiting the maximum of CEM (85.8%) or primary (68.5%) GMTCs (Figure 8B). This finding suggests that more CARs are expressed at the cell surface of CEM than primary T cells.



**Figure 8. CAR expression at the T cell surface.** (A) Western blot analysis of IL-1RAP CAR expression. Whole protein lysate or protein extracted from membrane, cytoplasm or nuclear cellular subfractions of IL-1RAP–transduced T cells were probed with a mouse anti-human CD3 $\zeta$  antibody. Sizing allowed discrimination of associated CD3 $\zeta$  with CAR (55 kDa) from the endogenous form (16 kDa). Additional probing with CD45, lamin, and GAPDH antibodies confirmed fraction enrichment. (B) **IL-1RAP CAR T cell staining.** CAR expression at the T cell surface was analyzed using the recombinant IL-1RAP biotinylated protein and revealed by flow cytometry using a secondary anti-biotin antibody. The CEM cell line or primary T cells were transduced either with Mock or CAR IL-1RAP. Cells were then incubated in the presence of increasing amounts of recombinant IL-1RAP labeled with biotin. Staining was performed with an anti-biotin fluorescent antibody and analyzed by flow cytometry. Percentage of biotin+/CD19+ CEM or T cells was plotted against amount of labeled biotin recombinant protein. Dot plots of cytometry analyses were provided for representative staining, including maximum. Untransduced cells (C0) or Mock T cells are used as control.

## Elimination of CAR T cells upon activation of the iC9 suicide gene

We then evaluated the safety switch of the iCASP9/AP1903 suicide system cassette after chemical inducer dimerizer (10 nM CID) exposure. Cytometry analysis showed in a mixed population of T cells expressing (CD19+) or not (CD19-) IL-1RAP CAR that after 24 hours of CID exposure, only the CD19- CD3+ cells persisted (Figure 9A). More precisely, using a quantitative Annexin V/7AAD assay of apoptosis, we showed that 84.11% and 88.93% of IL-1RAP CART cells were eliminated after 24 hours or 48 hours of CID exposure compared, respectively, to untransduced T cells (C0) (1.28% and 6.13%, respectively, at 24 or 48 hours) ( $p < 0.001$ ,  $n = 3$ ) (Figure 9).



**Figure 9. Efficiency of the safety suicide gene iCASP9 cassette. (A) Flow cytometry analysis of IL-1RAP CART cells after CID AP1903 exposure.** Gating strategy and analysis for absolute count of CID AP1903-induced cell death. Untransduced (C0) or IL-1RAP CART cells were both exposed to medium alone or medium +CID (10 nM, 24 h). Precise cell death was first assessed by flow cytometry after Annexin-V/7-AAD gating according to the manufacturer's instructions (Beckman Coulter, IM3614). Fluorescence analysis was gated on CD3<sup>+</sup>/CD19<sup>+</sup>-positive cells. The quantification was determined after acquiring 5000 fluorescent beads. Killing efficiency was normalized against control cells (untreated cells). Cell killing was calculated as follows: % Dead cells =  $[1 - (\text{absolute number of viable cells in AP1903-treated cells} / \text{absolute number of viable cells in untreated cells})] \times 100$ . **(B) Absolute percentage of mortality.** 24 h or 48 h C0 or IL-1RAP CART (gated on CD3<sup>+</sup>/CD19<sup>+</sup>) cell CID exposure. Results are mean  $\pm$  SD from 3 independent experiments. \*\*\*:  $p < 0.001$ .

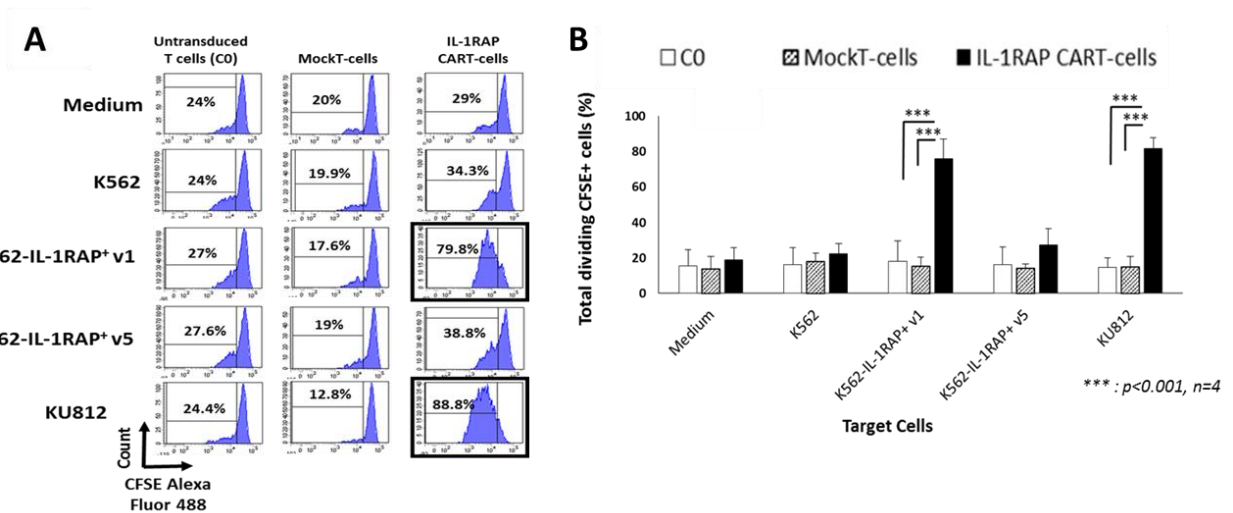
## IL-1RAP-dependent proliferation and cytokine secretion of IL-1RAP CAR-expressing T cells

To analyze proliferative and, more broadly, functional properties of IL-1RAP CART cells, in addition to the naturally IL-1RAP-expressing cell line KU812, we generated a deficient MHC class I cell line K562, expressing either the membrane (isoform 1) or the soluble (isoform 3) forms of IL-1RAP, respectively translated from variant 1 (v1) or 5 (v5) transcripts.



Using flow cytometry and western blotting, we confirmed that isoform 1 (v1) is well expressed at the cell surface and that isoform 3 (v5) was detectable in the culture supernatant of K562-v5 but not of -v1 (Figure S2). Of interest, we showed that IL-1RAP expression of transfected K562-v1 is higher than in the naturally IL-1RAP-expressing KU812 cell line (RFI=10.57 vs 33.46; Figure S2).

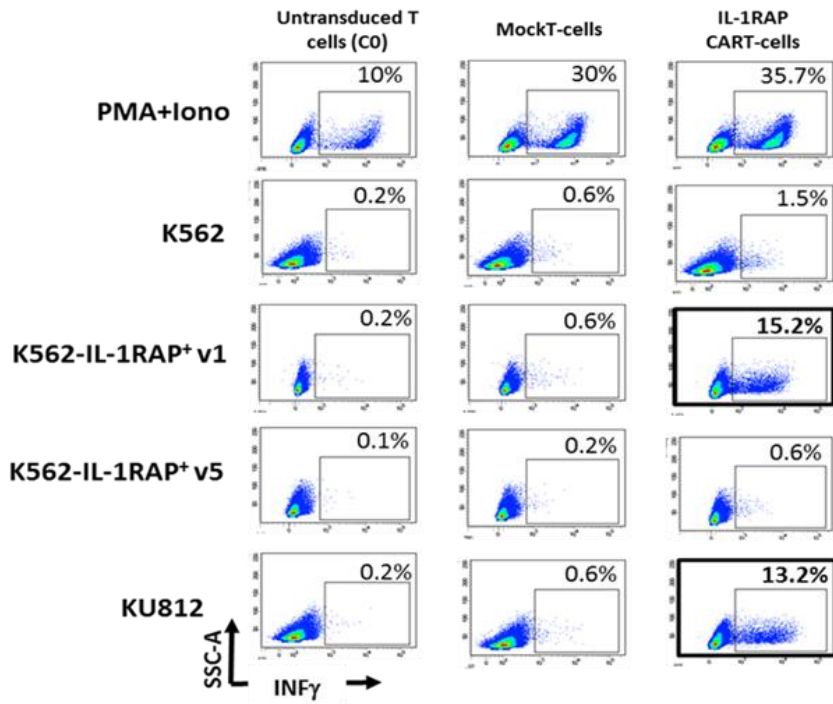
To determine the proliferative capability of IL-1RAP CART cells triggered by the IL-1RAP target-expressing cells, we performed a co-culture (E:T=1:1) of CFSE-stained (C0), Mock, or IL-1RAP CART cells in the presence of K562, K562-v1, -v5, or KU812 cell lines. We noted that compared to C0 or Mock cells, effector IL-1RAP CART cells divided significantly only in response to the presence of IL-1RAP cell surface-expressing K562-v1 (76.1%±10.9) and KU812 cells (81.6%±6.16), and at the lowest level against K562-v5 (27.3%±9.03) or medium only (18.8%±7.02) (Figure 4A, B) ( $p < 0.001$ ,  $n = 4$ ).



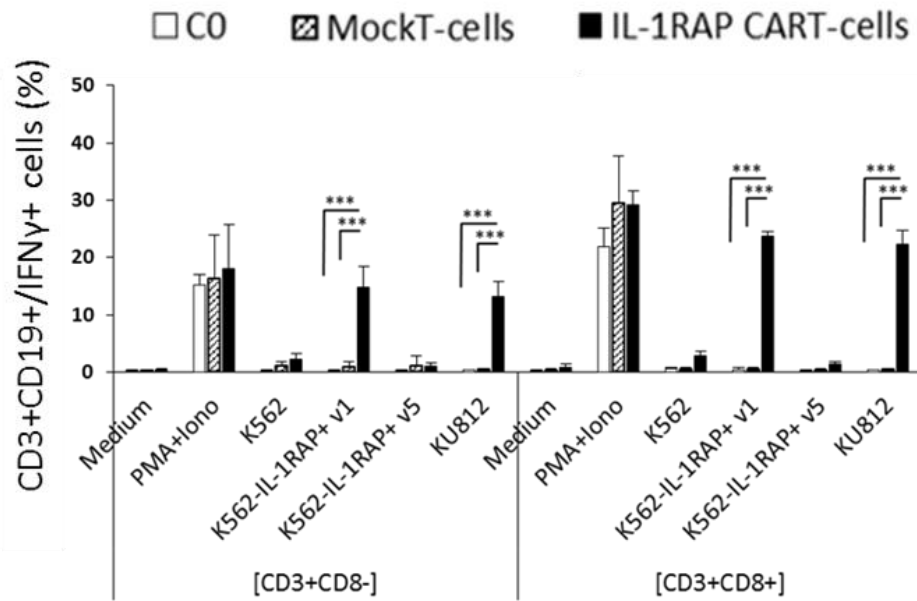
**Figure 10. IL-1RAP CART cells proliferate in co-culture with IL-1RAP cell surface-expressing target cells. (A) Gating strategy for flow cytometry CFSE dilution analysis.** Untransduced (C0) and Mock (MockT) or IL-1RAP CAR (IL-1RAP CART) transduced T cells were cultured in medium alone or in contact with IL-1RAP<sup>+</sup> cell surface- (K562-v1 and KU812), or soluble (K562-v5) IL-1RAP<sup>+</sup>-expressing target cells, at an E:T ratio of 1:1. Effectors were previously labeled with 0.5  $\mu$ M CFSE without IL-2 supplementation. After 48 or 96 h of co-culture without IL-2 supplementation, divisions of live CD3<sup>+</sup>/CD19<sup>+</sup> gated cells were assessed by flow cytometry to measure CFSE dye dilution. **(B) Percentage of total dividing CFSE-positive cells.** Results are mean±SD from 4 independent experiments. \*\*\*:  $p < 0.001$ .

In the same manner, but at E:T=1:5, we assessed by intracellular IFN $\gamma$  staining how CART cells can produce IFN $\gamma$  in the presence of IL-1RAP<sup>+</sup> target cells. IL-1RAP CART CD8<sup>+</sup> or CD8<sup>-</sup> cells, but not C0 or Mock cells, produced IFN $\gamma$  and exclusively against IL-1RAP-expressing target cells K562-v1 (CD8<sup>+</sup>: 23.7±0.71% and CD8<sup>-</sup>: 14.8±3.58%) and KU812 (CD8<sup>+</sup>: 22.3±2.39% and CD8<sup>-</sup>: 13.1±2.79%) ( $p < 0.001$ ,  $n = 4$ ). Of interest, we noted no response against K562 alone or K562-v5 (Figure 11A,B).

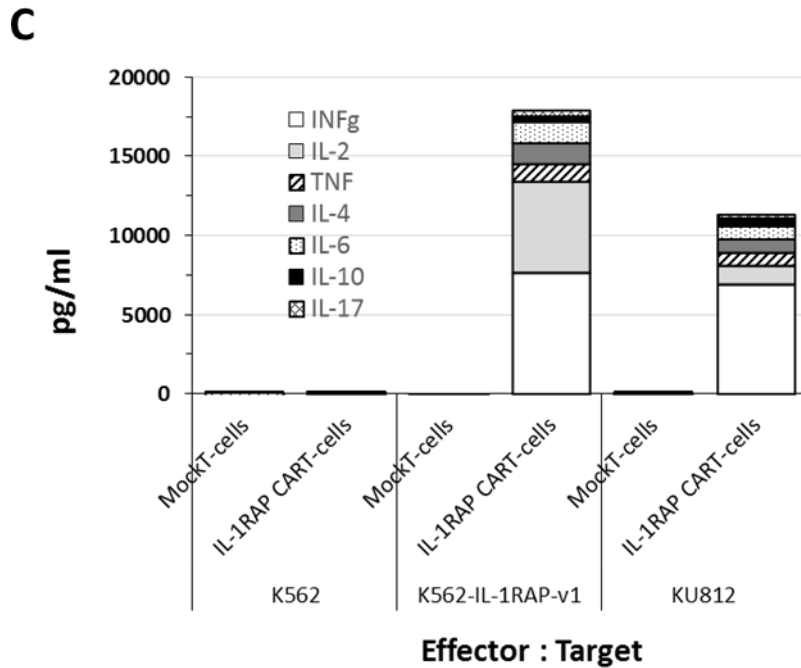
**A**



**B**



\*\*\* :  $p < 0,001$ ,  $n = 4$

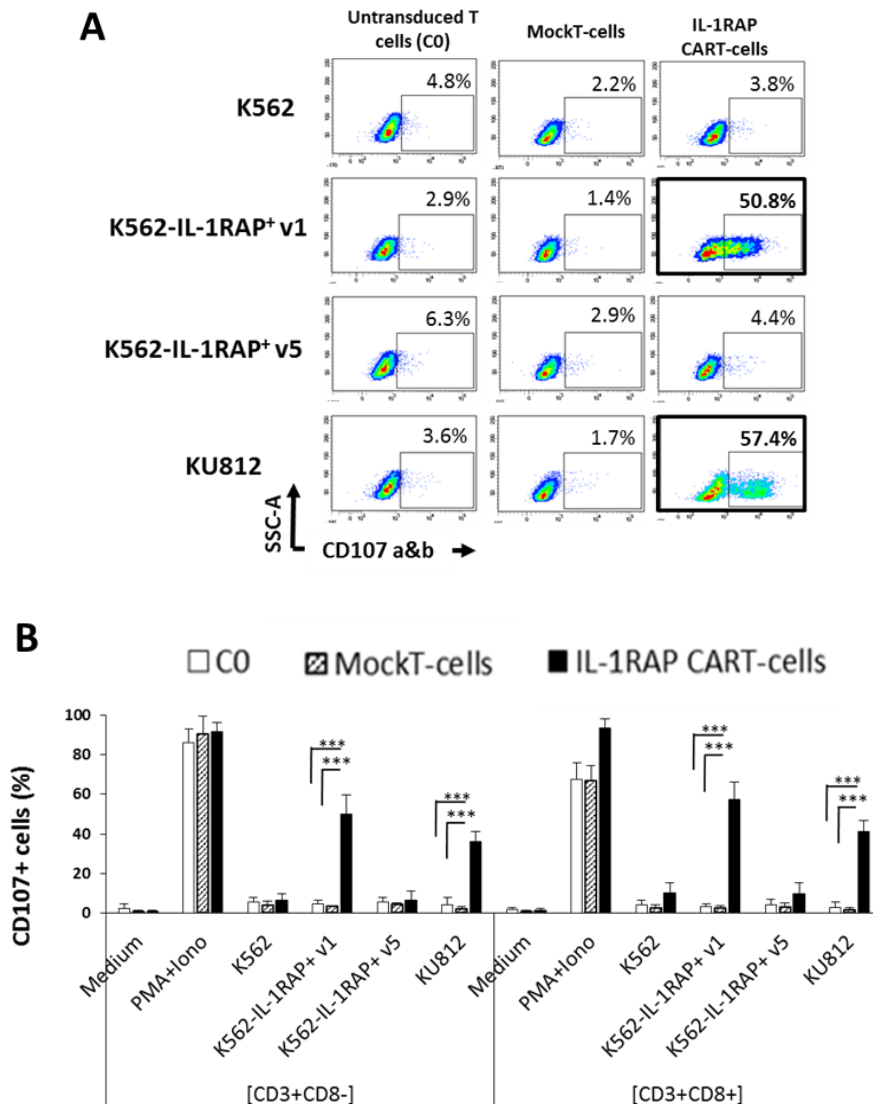


**Figure 11. Quantification of IFN $\gamma$  and cytokine release in medium supernatant by IL-1RAP CART cells.** (A) Gating strategy for intracellular IFN $\gamma$  cytokine detection. CO, MockT, or IL-1RAP CART cells were co-cultured at least 16 h at an E:T of 1:5 in the presence of target cells expressing or not IL-1RAP at the surface. As a positive control for cytokine production, cells stimulated with 10 ng/mL phorbol myristate acetate (PMA) and 1  $\mu$ g/mL ionomycin (Sigma-Aldrich) were used as positive controls. IFN $\gamma$  labeling was performed after brefeldin A treatment and cell permeabilization. Fluorescent IFN $\gamma$  signal was detected after gating on CD3<sup>+</sup>/CD19<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> or /CD8<sup>-</sup> populations. (B) Percentage of total intracellular IFN $\gamma$ -producing cells. Results are mean $\pm$ SD from 4 independent experiments for CD8<sup>+</sup> and CD8<sup>-</sup> (mainly CD4<sup>+</sup>) cells. (C) Dosage of secreted IFN $\gamma$  and other cytokines. Cytokine-binding assay was used for capturing secreted IFN $\gamma$ , IL-2, TNF, IL-4, IL-6, IL-10, and IL-17 cytokines secreted within the culture medium. Fluorescent signal was analyzed by flow cytometry. Absolute quantification (cytokine concentration) was assessed using serial dilutions of specific cytokine standards. Signal was deduced from the untransduced cells/target co-cultured cells. PMA/Iono was used as control. \*\*\*: p<0.001.

Finally, in addition to confirming that stimulation of IL-1RAP CART cells leads to a Th1-like cytokine secretion profile, we measured Th1/Th2/Th17 cytokines in the supernatant after co-culturing with CO, Mock, or CART cells (E:T=1:1). We showed that only IL-1RAP cell surface-expressing K562-v1 and KU812 cells could trigger cytokine secretion with robust IFN $\gamma$  and IL-2 secretion, moderate TNF $\alpha$ , and low IL-4, IL-6, and IL-10 but not IL-17 secretion, indicating a specific Th1 profile (Figure 11C and Figure S3).

## IL-1RAP–dependent CAR cytotoxicity and lysis of IL-1RAP–expressing tumor target cell lines

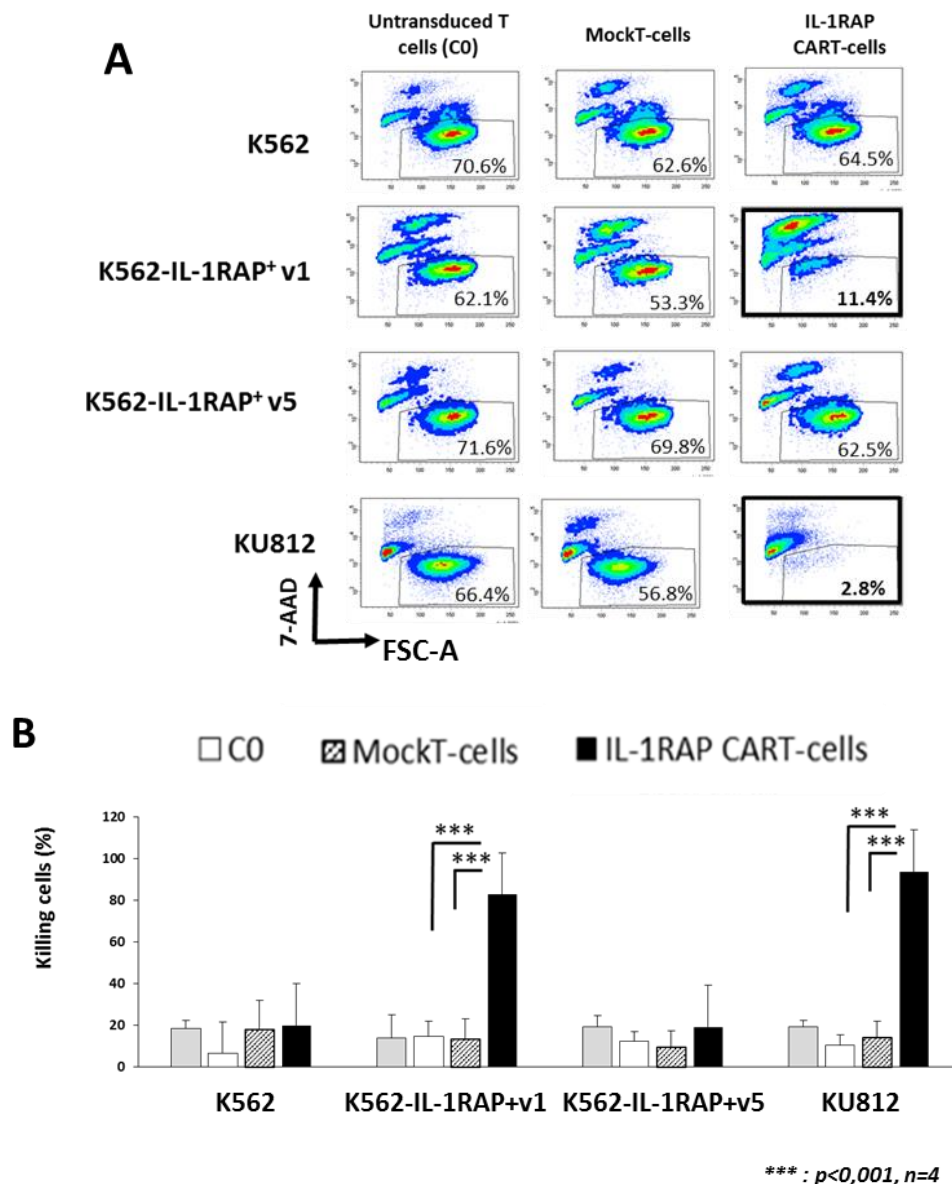
The CD107a&b degranulation assay applied to IL-1RAP CART cells, co-cultured at an E:T ratio of 1:5, against IL-1RAP+ (K532-V1, KU812)-expressing target cells allowed us to show a significant cell surface mobilization of CD107a&b in both the CD8- (mainly CD4+) and CD8+ compartments of IL-1RAP–specific T cells. This mobilization was not seen against cell surface IL-1RAP<sup>-</sup> (K562, K562-v5)-expressing cells, while Mock or untransduced (C0) cells from the donor showed no appreciable degranulation ( $p < 0.001$ ,  $n = 4$ ) (Figure 12A,B).



**Figure 12. Perforin and granzyme degranulation assay. (A) Gating strategy for flow cytometry CD107a&b expression analysis.** T cells transduced or not (with Mock or IL-1RAP CAR) were co-cultured at an E:T=1:5 for 6 h with target cells expressing or not IL-1RAP. Effector was treated with monensin and stained with CD107a and CD107b mAbs for 1 h at 37°C. After 5 h, CD3<sup>+</sup>/CD19<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> cells were analyzed by flow cytometry for CD107a and CD107b staining. PMA/Iono activation was used as control. **(B) Percentage of total CD107a&b-positive CD8<sup>+</sup> or CD8<sup>-</sup> cells.** Results are mean±SD from 4 independent experiments. \*\*\*:  $p < 0.001$ .

To determine the IL-1RAP dependent cytotoxicity potency of IL-1RAP CAR-expressing T cells *in vitro*, we used fluorescent (eFluor) and 7-AAD staining to discriminate, respectively, CART cells and living cells.

As expected, co-culture at an E:T ratio of 1:1 and compared to C0 or Mock T cells showed statistically significant lytic activity characterized by the disappearance of cells in the gate 7-AAD<sup>-</sup>/eFluor<sup>-</sup> between IL-1RAP<sup>+</sup> (K562-v1 and KU812) target cells and IL-1RAP<sup>-</sup> (K562, K562-v5) target cells ( $p < 0.001$ ,  $n = 4$ ). (Figure 13A,B).

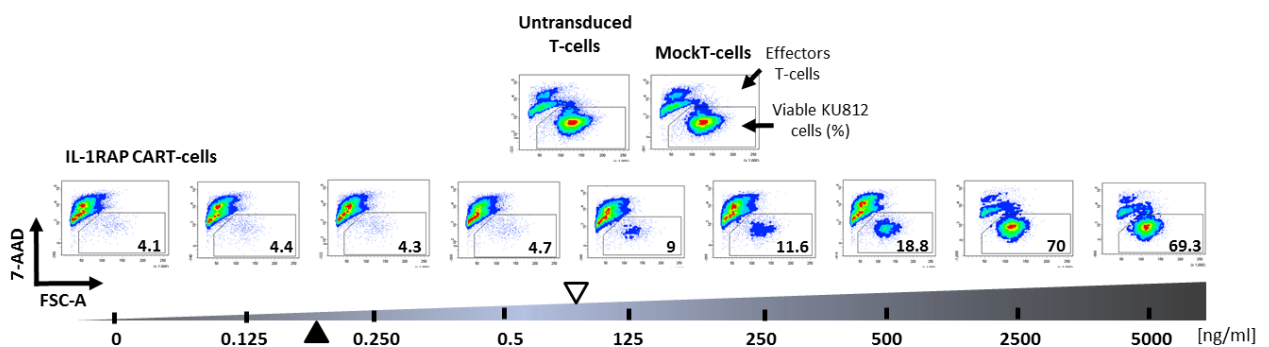


**Figure 13. Efficacy of IL-1RAP CART cells at lysing cell surface IL-1RAP-expressing cells.** Effector cells were co-cultured. Effectors were labeled with e-Fluor prior to co-culturing at a 1:1 E:T ratio, in the presence or not of target cells expressing or not IL-1RAP. Gating of cells against FSC and 7-AAD labeling allowed discrimination of target cells from effectors and from living cells. Percentage of persisting target cells in the presence or not of effectors was determined in the gate FSC<sup>+</sup>/7-AAD<sup>-</sup>. Untransduced or mock-transduced T cells were used as control. **(B) Percentage of total killed target cells.** Results are mean±SD from 4 independent experiments. \*\*\*:  $p < 0.001$ .

## CAR-mediated T-cell response is not inhibited by the presence of soluble antigen

We evaluated CAR lytic activity by blocking interactions of the CAR with IL-1RAP on the target cell using progressively increasing concentrations of cold recombinant IL-1RAP protein in the assay.

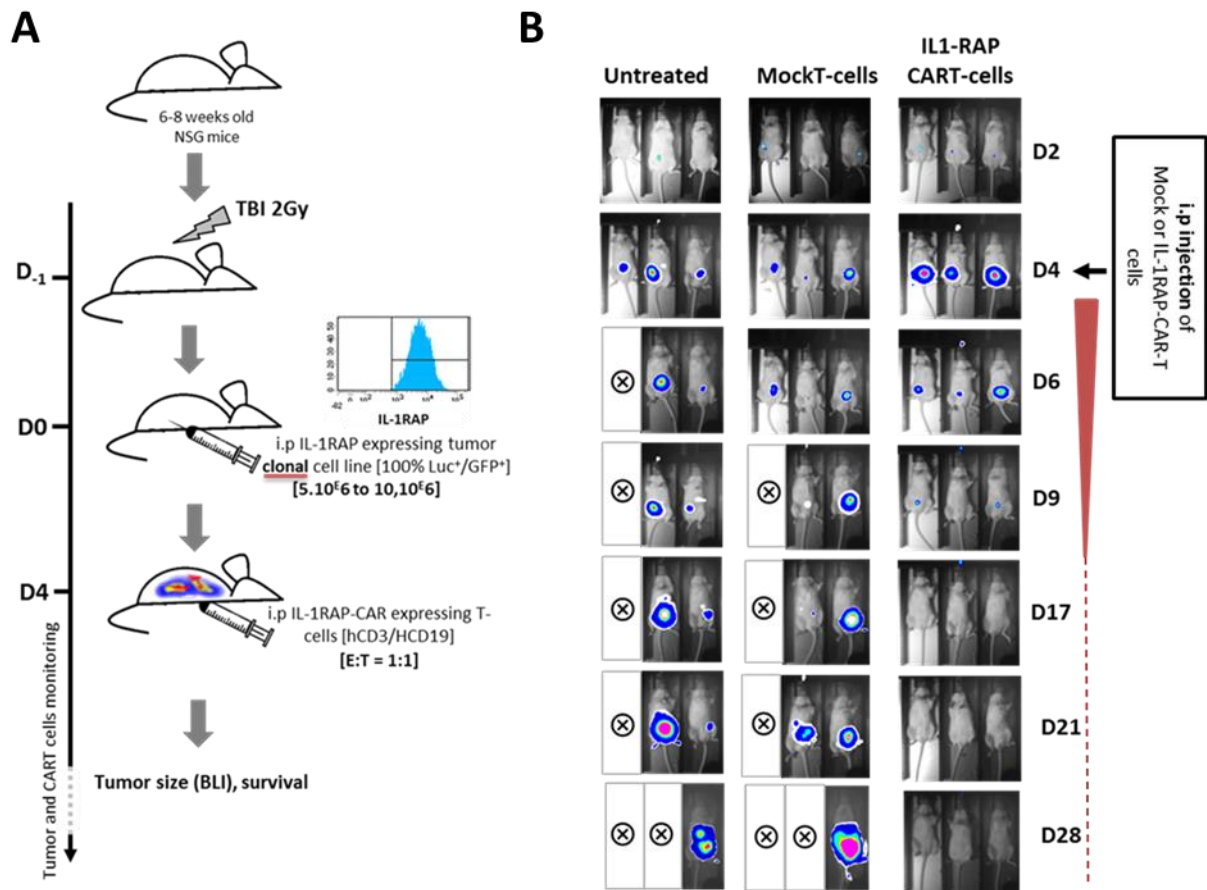
As shown in Figure 7, addition to E:T co-culture of equivalent amounts of sIL-1RAP plasma levels (up to 500 pg/mL) did not affect the cytotoxicity of the IL-1RAP CART cells, but a higher amount (from 125 ng/mL to 10  $\mu$ g/mL) of IL-1RAP protein led to a significant inhibition of the effector cytotoxicity (Figure 14). Moreover, this result gives the evidence of CAR-specific recognition and binding of IL-1RAP protein.



**Figure 14. Effect of IL-1RAP recombinant protein on CART cell cytotoxicity.** Serial amounts (from 0.125 ng/mL to 10  $\mu$ g/mL) of IL-1RAP recombinant protein were added for 24 h in E:T (1:1) co-culture of CAR T-cells with KU812 cells. Gating on target IL-1RAP+ cells allowed for evaluation of persisting cells, by 7-AAD staining in cytometry in flux. Black (▲) and white (▽) arrows represent respectively the level of sIL-1RAP circulating within serum of healthy donors and the limit down which the cytotoxicity of CART-cells is not affected by soluble cold recombinant IL-1RAP protein

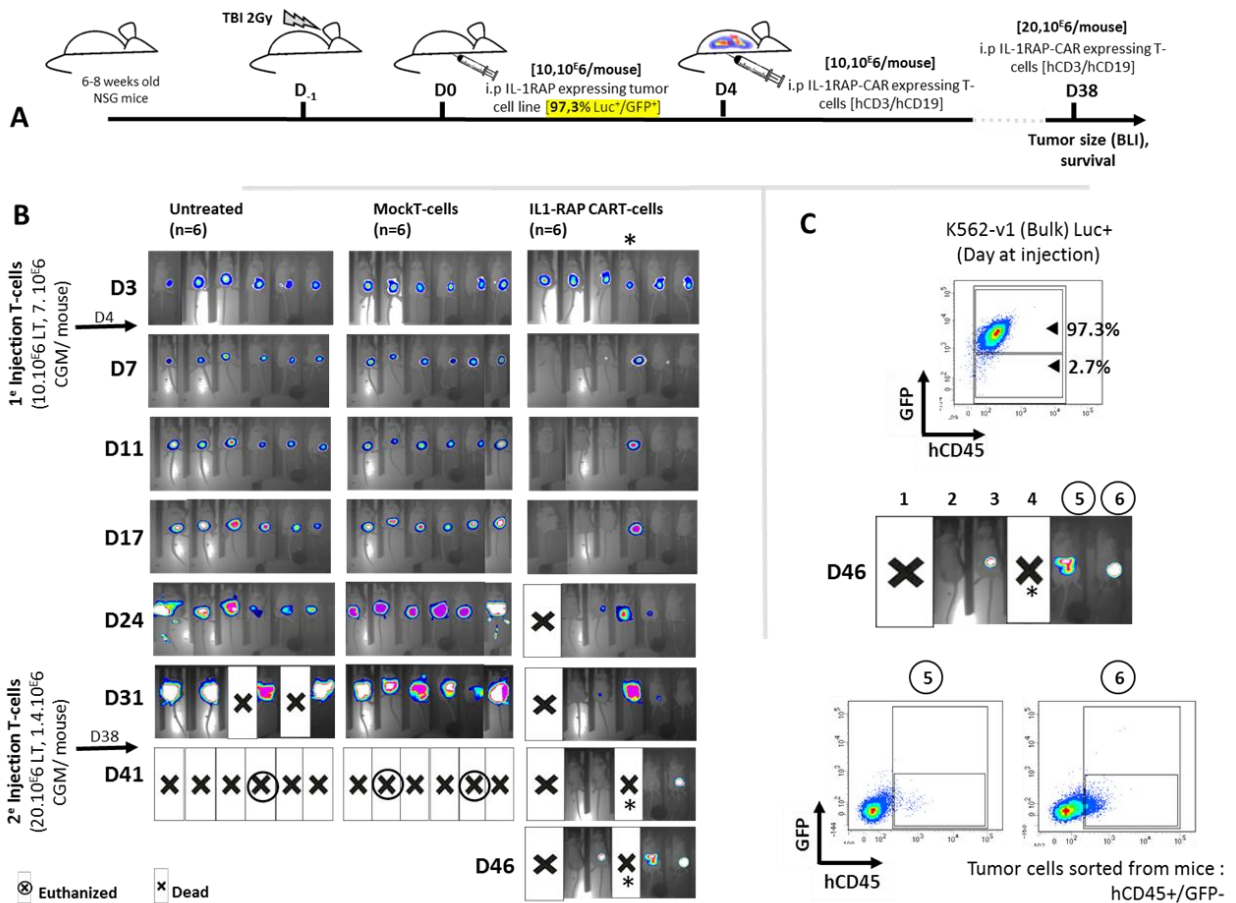
## Xenograft murine model

We evaluated the ability of IL-1RAP CART cells to eliminate IL-1RAP-expressing cells *in vivo*. Following tumor engraftment (D4), IL-1RAP CART cells (E:T=1:1) were allowed to target K562-v1 IL-1RAP+/Luc+ tumors until a decrease in size (D4 to D9) was noted, leading to complete elimination (at >D9) (Figure 15). In contrast, we noticed tumor progression in untreated or Mock T-cell-treated mice, leading to death (2/3 in both groups, respectively, at D28), while no mice died in the CART cell-treated group. Of note, tumors continued to grow in the absence of CART cells in surviving mice of untreated or Mock T-cell-treated groups.



**Figure 15. Murine experiment. (A) NSG mouse K562 xenograft model. Mice were sub-lethally irradiated at a dose of 2 Gy (n=3/group) 24 h before tumor transplantation. 5×10<sup>6</sup> clonal cells of K562-v1, an IL-1RAP<sup>+</sup>, luciferase<sup>+</sup>, and green fluorescent protein (GFP) positive–expressing cell line (K562-v1<sup>IL-1RAP<sup>+</sup>/GFP<sup>+</sup>/Luc<sup>+</sup></sup>) were then transplanted into 6–8-week-old NOD.Cg-Prkdcscid Il2rgtm1Wjl/SzJ (NSG) mice (The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME) using intraperitoneal (i.p.) injection. At an E:T 1:1, MockT or IL-1RAP CART cells were injected once i.p. 4 days after tumor injection. A group of K562-v1<sup>IL-1RAP<sup>+</sup>/GFP<sup>+</sup>/Luc<sup>+</sup></sup>–injected mice but untreated by T cells was used also as controls. For tracking K562-v1<sup>IL-1RAP<sup>+</sup>/GFP<sup>+</sup>/Luc<sup>+</sup></sup> tumor burden, mice were weekly injected intraperitoneally with 50 mg/g D-luciferin (Promega, Lyon, France) 10 min prior to imaging on a NightOwl (Berthold Technologies, Thoiry, France) under isoflurane anesthesia. (B) BLI analysis of mice of different groups from days 2 to 28. (x): dead mice, (⊗): euthanized mice (➔) the time of gene-modified T cell (IL-1RAP CAR- or Mock T cells) injection.**

In a second animal experiment, where mice (n=6/group) were grafted with bulk tumor cells (97.3% K562-v1 IL-1RAP<sup>+</sup>/GFP<sup>+</sup>/Luc<sup>+</sup>) containing residual (2.7%) IL-1RAP<sup>-</sup>/GFP<sup>-</sup>/Luc<sup>+</sup> cells, we noticed, after first objective response (D7, in 5/6 mice) and despite a second CART-cells injection, recurrence of Luc<sup>+</sup> cells (D24). Flow cytometry analysis of human (hCD45<sup>+</sup>) tumor cells sorted from 2 mice revealed that cells are GFP<sup>-</sup>, thus IL-1RAP<sup>-</sup>, and escape to the IL-1RAP CART-cells targeting because of TAA cell surface expression (Figure 16).

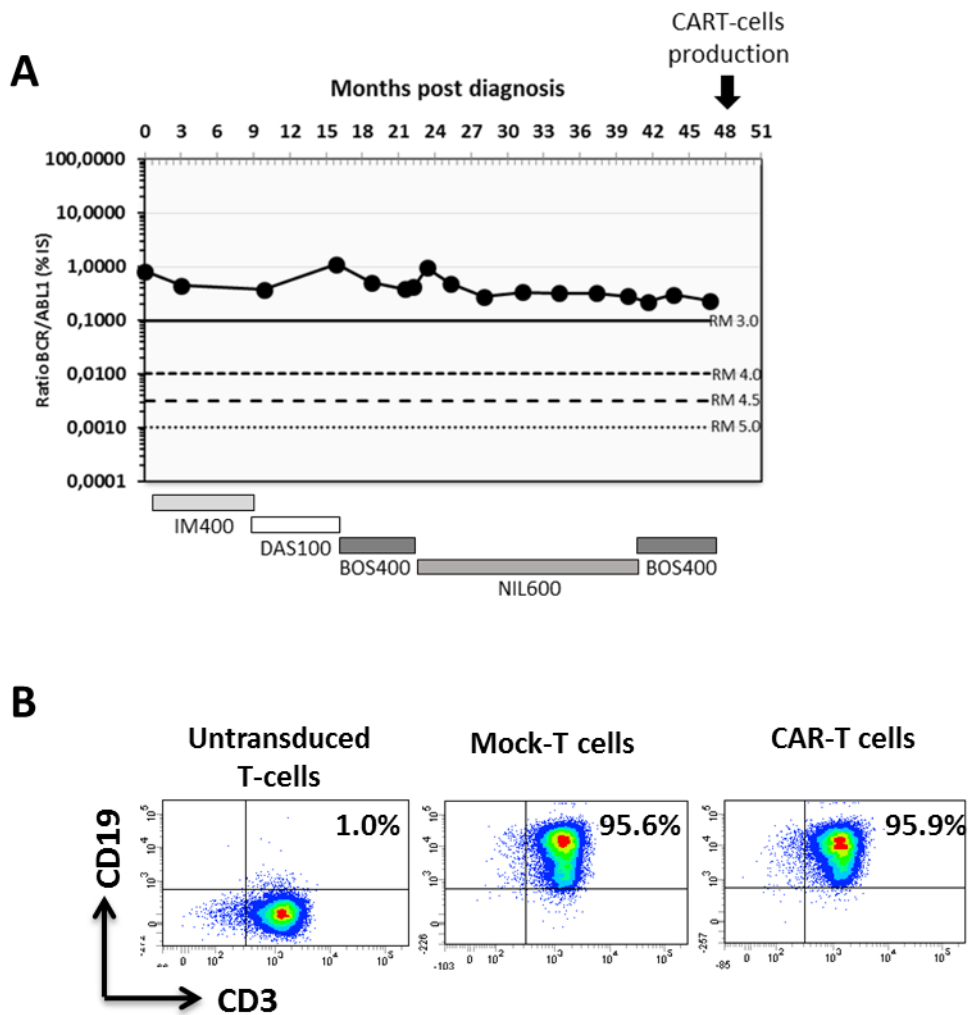


**Figure 16. (A) NSG mouse K562 xenograft model** were sub-lethally irradiated at a dose of 2 Gy (n=6/group) 24 h before tumor transplantation. Ten×10E6 bulk cells of K562-v1, containing 97.3% of IL-1RAP<sup>+</sup>, luciferase<sup>+</sup>, and green fluorescent protein (GFP) positive-expressing cell line (K562-v1<sup>IL-1RAP+/GFP+/Luc+</sup>) and 2.7% K562-v1<sup>IL-1RAP-/GFP-/Luc+</sup> were then transplanted i.p. injection. MockT or IL-1RAP CART cells were injected once i.p. 4 days after tumor injection. A group of K562-v1<sup>IL-1RAP+/GFP+/Luc+</sup> injected mice but untreated by T cells was used also as controls. **(B) Bioluminescence imaging** on a Nightowl until D46. (x): dead mice, (⊗): euthanized mice, (\*) CART cells injection outside the peritoneal cavity (►) the time (D4 D38) of gene-modified T cell (IL-1RAP CAR- or Mock T cells) injection. **(C) Flow cytometry analysis of human cells (hCD45+) withdrawn from mice 5 and 6.**

### T cells from CML patient can be genetically modified to express IL-1RAP CAR and specifically target autologous tumor CML cells

From a CML suboptimal responder patient (> RM3.0) to 5 lines of 4 TKIs treatment (figure 15A), for a period of 4 years, we were able to produced CART cells with a transduction efficiency of 95.5% (Figure 18A, B).

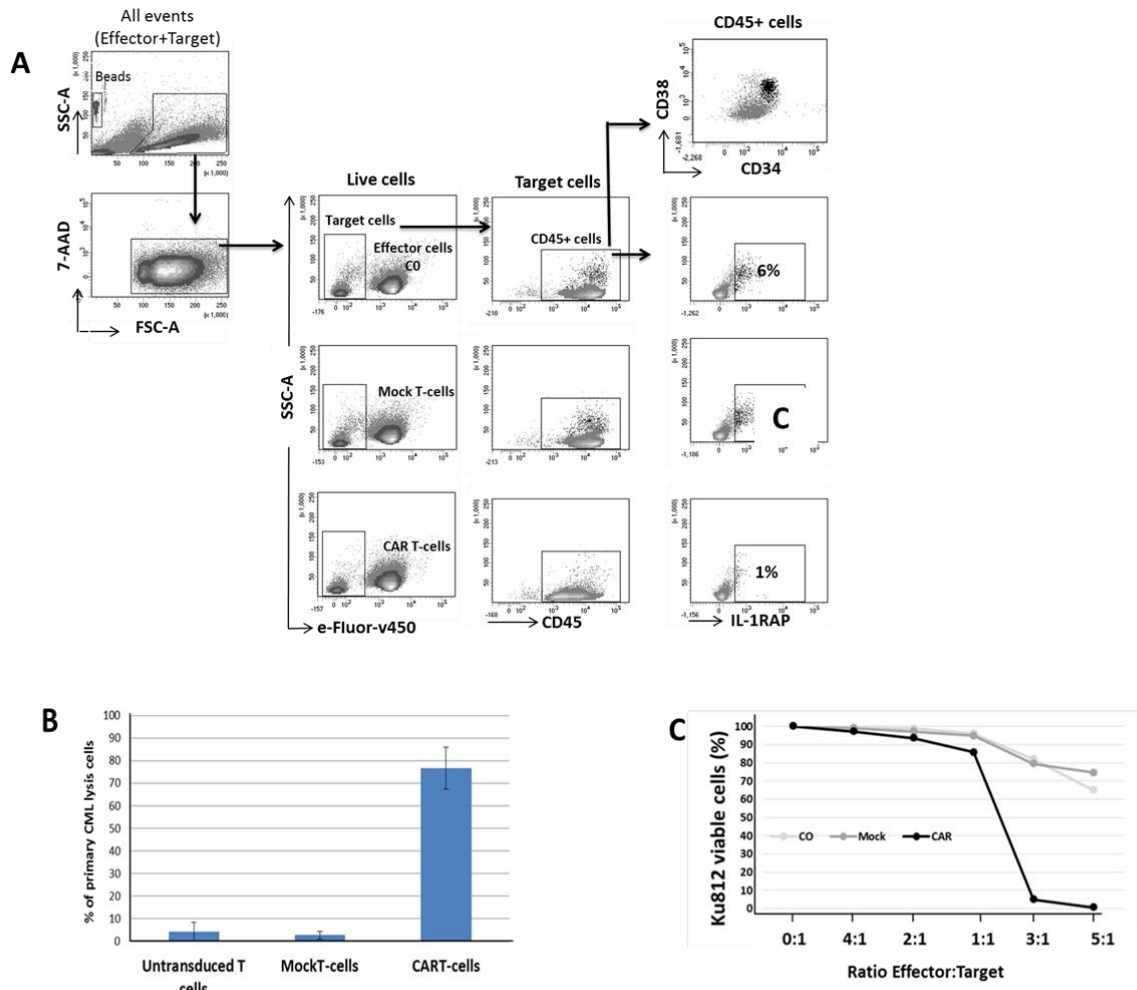




**Figure 18. (A) Quantification of *BCR-ABL* transcripts follow-up during treatment by ITKs.** IM: Imatinib, DAS: Dasatinib, Bos: Bosutinib, Nil: Nilotinib with time. Reverse transcription (RT) and quantitative real time-PCR (RQ-PCR) to quantify *BCR-ABL* fusion transcript and *ABL* control gene. **(B) Transduction efficiency of patient T-cells with mock or CAR vector** measured by staining with CD3, CD19 antibodies in flow cytometry.

Next, we investigated the cytotoxicity potential of CML-patient–derived CAR T-cells against KU812 cell line but also against autologous CD45+ target cells in a 24-hour 7-AAD staining assay.

Co-culture of autologous IL-1RAP CART cells against CML patient PBMC showed disappearance of IL-1RAP+/CD34+ cells after 24h (Figure 19A, B). Compared with control C0 and Mock T-cells, CAR T-cells demonstrated significant cytotoxicity ( $80 \pm 2.79\%$  of target dead cells) against CD34+ IL-1RAP+ cells (Figure 16A,B) or KU812 cell line (Figure 16C).



**Figure 19. (A) Lysis efficiency of IL-1RAP CART cells against IL-1RAP–cell surface expressing cells of CML patient.** Effectors were labeled with e-Fluor prior to co-culturing at a 30:1 E:T ratio, in the presence of target cells expressing or not IL-1RAP. Gating of cells against FSC and 7-AAD labeling allowed discrimination of target cells from effectors and from living cells. Percentage of persisting target cells in the presence or not of effectors was determine in the gate FSC<sup>+</sup>/7-AAD<sup>-</sup>. Untransduced or mock-transduced T cells were used as control. **(B) Percentage of total killed target cells.** Results are mean±SD from duplicate experiments. 10000 beads were acquired in order to normalized samples for absolute cell number quantification. **(C) Effector cells CO, mock or CAR T-cells were co-cultured with KU812 cell line in the indicated ratio.** Percentage of total killed target cells. Results are mean±SD from duplicate experiments. 10000 beads were acquired in order to normalized samples for absolute cell number quantification.

## Discussion

Immunotherapy approaches using gene-modified T cells expressing a CAR have emerged as powerful tools for patients with solid or liquid tumors. Evident positive results have been obtained in hematology,<sup>25</sup> particularly with CART cells directed against CD19 antigen in patients with relapsed/refractory ALL, resulting in a high rate of long-lasting remissions.<sup>37</sup>

Based on the identification of a cell surface biomarker, IL-1RAP, allowing discrimination of CML from normal HSCs<sup>27,28,30</sup> and measurement of CML tumor burden,<sup>29</sup> we investigated a cell-based killing strategy to target CML HSCs. Despite very high efficiency of TKI treatments in CML, we need to provide new approaches to eradicate this disease.

IL-1RAP is an interesting target because it is a rare cell surface marker that is upregulated in all leukemic CML, but not in normal HSCs, whereas the other CML HSC markers CD25 or CD26 are expressed only in a portion of BCR-ABL1<sup>+</sup> cells.<sup>28</sup> Of additional interest is that IL-1RAP is overexpressed in AML and high-risk MDS (Myelodysplastic syndromes) and also correlated, in this case, with poor clinical outcome.<sup>38</sup> In fact, it has been demonstrated that anti-IL-1RAP antibody may kill *in vitro* primary cells from AML patients<sup>26</sup> and in a xenograft AML murine model.<sup>32</sup> Thus, IL-1RAP is an additional target for new cell immunotherapy in AML, in addition to CD123, CD33, or CD44v6 targeting.

In the clinical setting, with the success of TKI treatments, TKIs clearly remain the best, safest, and easiest-to-manage first-line therapy for CML, although they do not eradicate residual CML stem cells and thus do not cure the disease. CML disease is highly susceptible to the allogeneic immune system, as evidenced by allo-SCT<sup>39</sup> or donor lymphocyte infusion (DLI),<sup>40</sup> making it an ideal candidate for allogeneic donor-derived CART cell immunotherapy (DLI administration), in case of advanced phases of CML, high-risk disease, or disease in the chronic phase that is resistant or intolerant to TKIs.

In this context, matched human leukocyte antigen donor T cells may be used as a source of GMTCs in sequential association with TKIs or allo-SCT. This source may circumvent CART cell manufacturing failures arising from the use of T cells from the heavily treated patient<sup>41</sup>. Moreover, especially in CML, using these donors CART-will enhance anti-leukemic effects by combining alloreactivity and specific cytotoxicity of IL-1RAP antigen targeting. The major concern when infusing allogeneic T cells is potentially inducing graft-versus-host disease, which may be controlled by activating the suicide iCASP9/AP1903 system,<sup>42</sup> carried out by our lentiviral construct. The suicide system also may be activated in case of adverse events such as cytokine release syndrome, cerebral nervous system toxicity, off-target toxicity, or tumor lysis syndrome.<sup>43</sup>

IL-1RAP ADCC (Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity) produces elimination of CML stem cells<sup>27,33</sup> and of primary AML cells<sup>32</sup> through an IL-1/IL-1RAP signaling blockade by proliferation and expansion of the suppressing mechanism of cells responsive to IL-1. The same work highlights this mechanism of lysis by IL-1RAP, ADCC, which recruits effector NK cells to activate the immune response. In CML, TKI treatment has a different effect, with a

significant increase or decrease in the immune NK effector population, respectively, after dasatinib or nilotinib treatments.<sup>44</sup> Moreover, even if NK cells play an important role in mediating treatment-free remission in CML, in contrast, half of patients who cease TKI therapy relapse by a failure of the immune system.<sup>45</sup> In this context, a defect in the NK cell population will reduce ADCC efficiency, so that these patients will need alternative immunotherapy approaches, such as CART cells, to achieve a cure. Here we provide a new therapeutic approach with direct recognition of the IL-1RAP cell surface protein and without the need for accessory immunocompetent NK cells.

In addition to the transmembrane form of IL-1RAP, alternative splicing results in a mRNA encoding a secreted and soluble (sIL-1RAP) form, characterized by the extracellular domain of the protein. The soluble form may interfere with membrane IL-1RAP-expressing tumor cells by saturating the CAR. In healthy people, circulating levels of soluble IL-1RAP are detected at a mean concentration of 200 pg/mL.<sup>46</sup> We demonstrated *in vitro* that a higher concentration (2400 pg/mL) of IL-1RAP recombinant protein did not result in staining for IL-1RAP CAR-expressing T cells. Moreover, both recombinant IL-1RAP protein below a concentration of 125ng/ml (Figure 14) and the culture supernatant of K562-v5, secreting sIL-1RAP, did not affect CART cytotoxicity against IL-1RAP-expressing targets (Figure S4). Overall, these findings suggest that sIL-1RAP would not interfere with IL-1RAP tumor cell recognition although an accurate sIL-1RAP dosage needs to be identified in a cohort of CML or AML patients for precise quantification of the expression level.

In the present pre-clinical work, we report for the first time the whole production and validation process of CART cells directed against IL-1RAP-expressing CML stem cells, from development and characterization of the mAb to the final *in vitro* and *in vivo* functional studies of gene-modified CART cells. We demonstrated also that multi-TKIs treatment over a 4 years period doesn't affect transduction efficiency, but also cytotoxic activity of autologous CART cells. Although the demonstration has been performed on a CML model, where the application would be limited, but beneficial to TKIs -non-responders or -intolerant CML patient's, to young or accelerated/blastic phase CML patients, all candidate to allograft, this promising CART-cells immunotherapy approach may be used in other clinical critical acute hematologic disease such as AML. In this context (CML or AML), use of IL-RAP CART cells would constitute a bridge towards allograft. This new potentially curative immunotherapy for CML could also help with medico-economic considerations. Toxicity remain to be carefully evaluated before moving in a clinical trial.

## References

1. Rowley JD. Letter: A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. *Nature*. 1973;243(5405):290-293.
2. Deininger MW, Goldman JM, Melo JV. The molecular biology of chronic myeloid leukemia. *Blood*. 2000;96(10):3343-3356.
3. Pavlovsky C, Kantarjian H, Cortes JE. First-line therapy for chronic myeloid leukemia: Past, present, and future. *Am J Hematol*. 2009;84(5):287-293.
4. Bower H, Bjorkholm M, Dickman PW, Hoglund M, Lambert PC, Andersson TM. Life Expectancy of Patients With Chronic Myeloid Leukemia Approaches the Life Expectancy of the General Population. *J Clin Oncol*. 2016;34(24):2851-2857.
5. Kantarjian H, O'Brien S, Jabbour E, et al. Improved survival in chronic myeloid leukemia since the introduction of imatinib therapy: a single-institution historical experience. *Blood*. 2012;119(9):1981-1987.
6. Experts in Chronic Myeloid L. The price of drugs for chronic myeloid leukemia (CML) is a reflection of the unsustainable prices of cancer drugs: from the perspective of a large group of CML experts. *Blood*. 2013;121(22):4439-4442.
7. Dusetzina SB, Winn AN, Abel GA, Huskamp HA, Keating NL. Cost sharing and adherence to tyrosine kinase inhibitors for patients with chronic myeloid leukemia. *J Clin Oncol*. 2014;32(4):306-311.
8. Mahon FX, Rea D, Guilhot J, et al. Discontinuation of imatinib in patients with chronic myeloid leukaemia who have maintained complete molecular remission for at least 2 years: the prospective, multicentre Stop Imatinib (STIM) trial. *Lancet Oncol*. 2010;11(11):1029-1035.
9. Bhalla S, Tremblay D, Mascarenhas J. Discontinuing Tyrosine Kinase Inhibitor Therapy in Chronic Myelogenous Leukemia: Current Understanding and Future Directions. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*. 2016;16(9):488-494.
10. Rea D, Nicolini FE, Tulliez M, et al. Discontinuation of dasatinib or nilotinib in chronic myeloid leukemia: interim analysis of the STOP 2G-TKI study. *Blood*. 2016.
11. Jiang Q, Liu ZC, Zhang SX, Gale RP. Young age and high cost are associated with future preference for stopping tyrosine kinase inhibitor therapy in Chinese with chronic myeloid leukemia. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2016;142(7):1539-1547.
12. Sobrinho-Simoes M, Wilczek V, Score J, Cross NC, Apperley JF, Melo JV. In search of the original leukemic clone in chronic myeloid leukemia patients in complete molecular remission after stem cell transplantation or imatinib. *Blood*. 2010;116(8):1329-1335.
13. Graham SM, Jorgensen HG, Allan E, et al. Primitive, quiescent, Philadelphia-positive stem cells from patients with chronic myeloid leukemia are insensitive to STI571 in vitro. *Blood*. 2002;99(1):319-325.

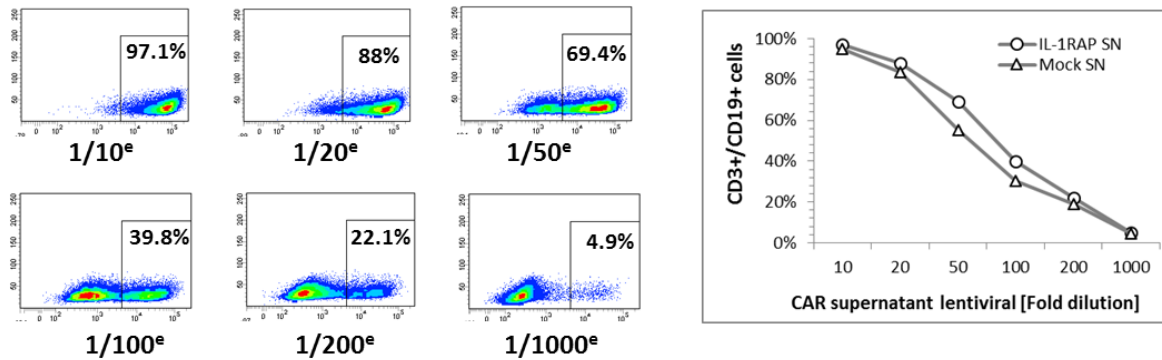
14. Chalandon Y, Passweg JR, Schmid C, et al. Outcome of patients developing GVHD after DLI given to treat CML relapse: a study by the Chronic Leukemia Working Party of the EBMT. *Bone Marrow Transplant*. 2010;45(3):558-564.
15. Hamad A, Sahli Z, El Sabban M, Mouteirik M, Nasr R. Emerging therapeutic strategies for targeting chronic myeloid leukemia stem cells. *Stem Cells Int*. 2013;2013:724360.
16. Tarafdar A, Hopcroft LE, Gallipoli P, et al. CML cells actively evade host immune surveillance through cytokine-mediated downregulation of MHC-II expression. *Blood*. 2017;129(2):199-208.
17. Rojas JM, Knight K, Wang L, Clark RE. Clinical evaluation of BCR-ABL peptide immunisation in chronic myeloid leukaemia: results of the EPIC study. *Leukemia*. 2007;21(11):2287-2295.
18. Ilander M, Olsson-Stromberg U, Schlums H, et al. Increased proportion of mature NK cells is associated with successful imatinib discontinuation in chronic myeloid leukemia. *Leukemia*. 2016.
19. Held SA, Heine A, Mayer KT, Kapelle M, Wolf DG, Brossart P. Advances in immunotherapy of chronic myeloid leukemia CML. *Curr Cancer Drug Targets*. 2013;13(7):768-774.
20. Comoli P, Basso S, Riva G, et al. BCR-ABL-specific T-cell therapy in Ph+ ALL patients on tyrosine-kinase inhibitors. *Blood*. 2017;129(5):582-586.
21. Hughes A, Clarkson J, Tang C, et al. CML patients with deep molecular responses to TKI have restored immune effectors, decreased PD-1 and immune suppressors. *Blood*. 2017.
22. Maude SL, Frey N, Shaw PA, et al. Chimeric antigen receptor T cells for sustained remissions in leukemia. *N Engl J Med*. 2014;371(16):1507-1517.
23. Porter DL, Levine BL, Kalos M, Bagg A, June CH. Chimeric antigen receptor-modified T cells in chronic lymphoid leukemia. *N Engl J Med*. 2011;365(8):725-733.
24. Brown CE, Alizadeh D, Starr R, et al. Regression of Glioblastoma after Chimeric Antigen Receptor T-Cell Therapy. *N Engl J Med*. 2016;375(26):2561-2569.
25. Maus MV, Grupp SA, Porter DL, June CH. Antibody-modified T cells: CARs take the front seat for hematologic malignancies. *Blood*. 2014;123(17):2625-2635.
26. Askmyr M, Agerstam H, Hansen N, et al. Selective killing of candidate AML stem cells by antibody targeting of IL1RAP. *Blood*. 2013;121(18):3709-3713.
27. Jaras M, Johnels P, Hansen N, et al. Isolation and killing of candidate chronic myeloid leukemia stem cells by antibody targeting of IL-1 receptor accessory protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(37):16280-16285.
28. Warfvinge R, Geironson Ulfsson L, Sommarin MN, et al. Single-cell molecular analysis defines therapy response and immunophenotype of stem cell subpopulations in CML. *Blood*. 2017.
29. Landberg N, Hansen N, Askmyr M, et al. IL1RAP expression as a measure of leukemic stem cell burden at diagnosis of chronic myeloid leukemia predicts therapy outcome. *Leukemia*. 2016;30(1):253-257.
30. Zhao K, Yin LL, Zhao DM, et al. IL1RAP as a surface marker for leukemia stem cells is related to clinical phase of chronic myeloid leukemia patients. *Int J Clin Exp Med*. 2014;7(12):4787-4798.

31. Guay S, Michaud N, Bourcier N, et al. Distinct expression of the soluble and the membrane-bound forms of interleukin-1 receptor accessory protein in the endometrium of women with endometriosis. *Fertil Steril*. 2011;95(4):1284-1290.
32. Agerstam H, Karlsson C, Hansen N, et al. Antibodies targeting human IL1RAP (IL1R3) show therapeutic effects in xenograft models of acute myeloid leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015;112(34):10786-10791.
33. Agerstam H, Hansen N, von Palffy S, et al. IL1RAP antibodies block IL-1-induced expansion of candidate CML stem cells and mediate cell killing in xenograft models. *Blood*. 2016;128(23):2683-2693.
34. Wang Z, Raifu M, Howard M, et al. Universal PCR amplification of mouse immunoglobulin gene variABLE regions: the design of degenerate primers and an assessment of the effect of DNA polymerase 3' to 5' exonuclease activity. *J Immunol Methods*. 2000;233(1-2):167-177.
35. Brochet X, Lefranc MP, Giudicelli V. IMGT/V-QUEST: the highly customized and integrated system for IG and TR standardized V-J and V-D-J sequence analysis. *Nucleic Acids Res*. 2008;36(Web Server issue):W503-508.
36. Bole-Richard E, Gamonet C, Certoux JM, et al. Exposure to hypomethylating agent, 5-azacytidine, may improve iCasp9 suicide gene therapy for treating GvHD in allografts. *Gene Ther*. 2016;23(8-9):664-672.
37. Ramos CA, Savoldo B, Dotti G. CD19-CAR trials. *Cancer J*. 2014;20(2):112-118.
38. Barreyro L, Will B, Bartholdy B, et al. Overexpression of IL-1 receptor accessory protein in stem and progenitor cells and outcome correlation in AML and MDS. *Blood*. 2012;120(6):1290-1298.
39. Gratwohl A, Heim D. Current role of stem cell transplantation in chronic myeloid leukaemia. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2009;22(3):431-443.
40. Basak GW, de Wreede LC, van Biezen A, et al. Donor lymphocyte infusions for the treatment of chronic myeloid leukemia relapse following peripheral blood or bone marrow stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 2013;48(6):837-842.
41. Grupp SA, Kalos M, Barrett D, et al. Chimeric antigen receptor-modified T cells for acute lymphoid leukemia. *N Engl J Med*. 2013;368(16):1509-1518.
42. Budde LE, Berger C, Lin Y, 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(12):e82742.
43. Bonifant CL, Jackson HJ, Brentjens RJ, Curran KJ. Toxicity and management in CAR T-cell therapy. *Mol Ther Oncolytics*. 2016;3:16011.
44. Hayashi Y, Nakamae H, Katayama T, et al. Different immunoprofiles in patients with chronic myeloid leukemia treated with imatinib, nilotinib or dasatinib. *Leuk Lymphoma*. 2012;53(6):1084-1089.
45. Hughes A, Yong ASM. Immune Effector Recovery in Chronic Myeloid Leukemia and Treatment-Free Remission. *Front Immunol*. 2017;8:469.

46. Michaud N, Al-Akoum M, Akoum A. Blood soluble interleukin 1 receptor accessory protein levels are consistently low throughout the menstrual cycle of women with endometriosis. *Reprod Biol Endocrinol*. 2014;12:51.
47. 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(8):913-924.

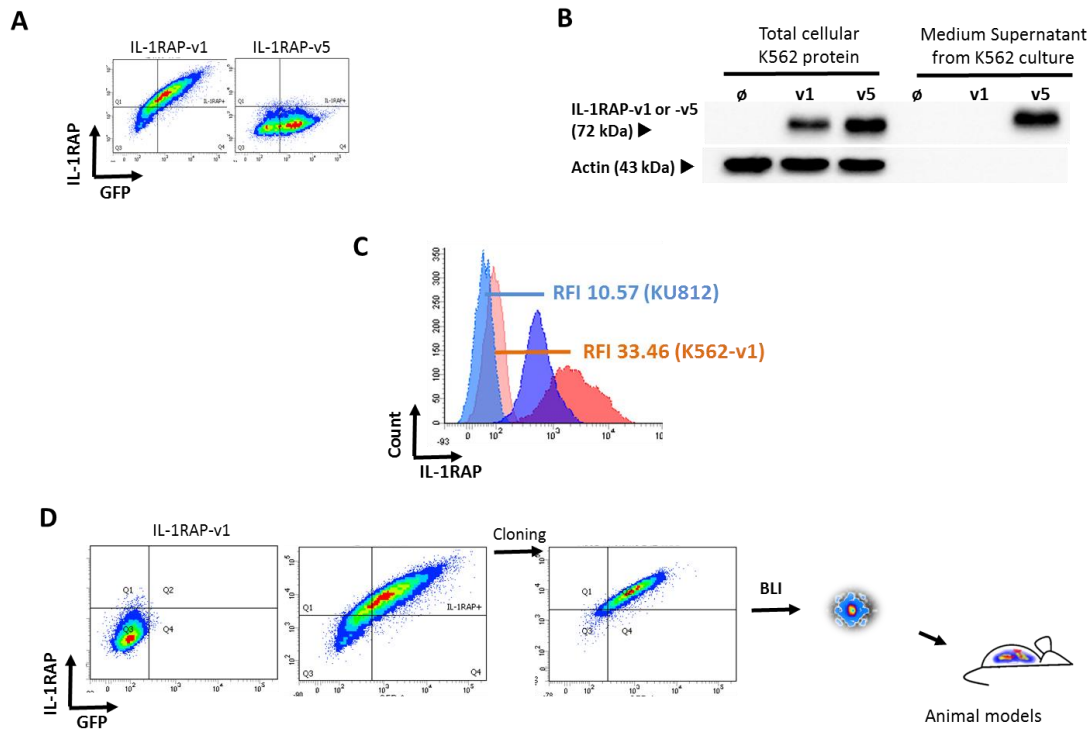


## Supplementary Data

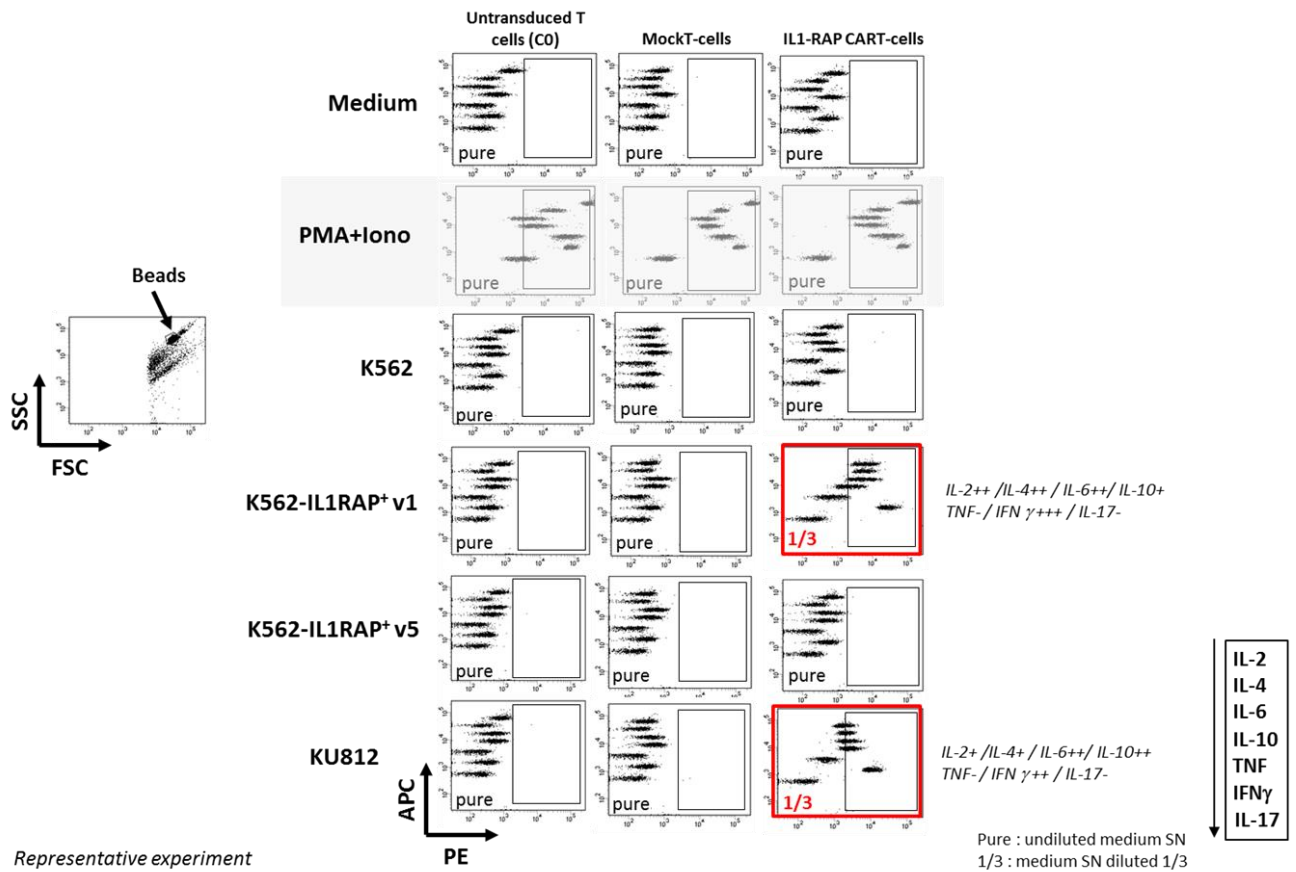


**Figure S1. Lentiviral transduction of donor T cells.** Lentiviral vector supernatant stocks were produced by transient co-transfection of subconfluent 293T cells using the CaCl<sub>2</sub> method with helper plasmids encoding the vesicular stomatitis virus envelope, and the GAG/POL packaging plasmids. Viral supernatant was harvested 48 and 72 hours later, concentrated using PEG and low-speed centrifugation (3000 ×g, overnight), then stored at -80°C until use. The same lentiviral construct (Mock) without IL-1RAP scFv was used as control. Titration of the lentiviral SN was established by 293T permissive cell transduction using serial dilution of SN. Transduction efficiency was measured by flow cytometry (upper panel). MOI was deduced from SN titration according to the number of starting cells. Representative flow cytometry plot, after CD3<sup>+</sup>/CD19<sup>+</sup> staining of untransduced cells (C0), MockT cells, and IL-1RAP CART cells. Gating for negative/positive threshold (CD19<sup>+</sup>) determination is given by the C0 (lower left panel). Transduction results obtained with 100× concentrated lentiviral supernatant (MockT and CAR) are shown as mean±standard deviation (SD) from 6 independent transductions of 6 different donor PBMCs (lower right panel).

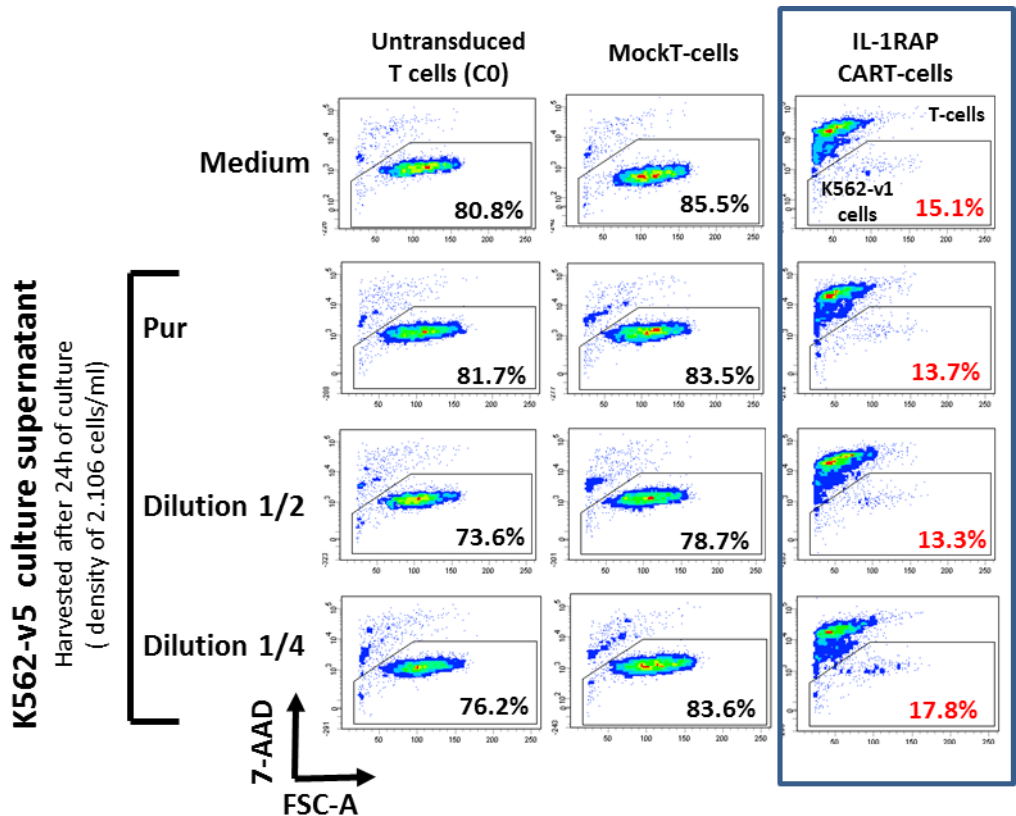
Intensity staining was assessed and graded from 0 (negative) to +, from 1 to 3



**Figure S2.** (A) Flow cytometry analysis of IL-1RAP–transfected K562 cells. For producing a membrane (mb) or soluble (s) IL-1RAP–expressing cell line, K562 cells were transfected respectively with variant 1 (isoform 1, NM\_002182.2) or variant 5 (isoform 2, NM\_001167930) open reading frame clones (pCMV6-AC-GFP vector, Origen; or pEZ-M61, GeneCopoeia). Stable mb- or s-IL-1RAP–expressing K562 cells were then transduced with the pLenti CMV V5-LUC Blast (Addgene, plasmid #21474). (B) Western blotting analysis. Whole-cell (total cellular) or secreted protein (medium supernatant) fraction was obtained from the transfected K562 cell line, after sonication in RIPA buffer supplemented with a protease inhibitor cocktail (complete Mini EDTA-free; Roche, Bâle, Switzerland). Twenty micrograms of protein were subjected to SDS-PAGE, then electrotransferred onto polyvinylidene fluoride membranes. Membranes were probed overnight with primary IL-1RAP #A3C3 (diluted at 1:103) for IL-1RAP expression.  $\beta$ -actin mAb staining (1:103, clone AC15, #A5441, Sigma-Aldrich) was used for protein loading evaluation. Immunodetection staining was performed with a secondary polyclonal antibody sheep anti-mouse IgG (#515-035-062, Jackson). Chemiluminescence detection was assessed with a camera and Bio-1D software (Vilber-Lourmat, Collegien, France). (C) IL-1RAP cell surface expression analysis by cytometry. K562-v1 (dark) and KU812 (light) were stained with IL-1 RAP antibody (red histograms) and compared to unlabeled cells (blue histograms). RFI values provided by the software are reported. (D) Cloning of K562-v1 cells. Cellular cloning (0.3 cells/well) of transfected K562 cells was performed to select a high luciferase–expressing clone for an animal xenograft model. D-luciferin (Promega, Lyon, France) was added in the well 10 min prior imaging on a NightOwl.



**Figure S3.** To determine the profile of cytokines produced by CART cells, we used the human Th1/Th2/Th17 Cytokines Bead Array Kit (BD Biosciences), allowing quantification of human IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , and IL-17A secretion, in accordance with the manufacturer's instructions. Briefly, supernatants of overnight culture of  $1.10E5$  CART cells in the presence of target cells (ratio 1:1) or not (control) were incubated for 3 h with beads and phycoerythrin (PE) conjugated anti-cytokine antibodies. Beads were washed and acquired by standardized flow cytometry assay. Data were analyzed using FCAP Array™ Software Version 3.0 (BD Biosciences). As a control, we measured the supernatant collected from target cells only. Representative capture bead fluorescence analysis of culture supernatant of untransduced, Mock, or CAR IL-1RAP T cells in presence or not (Medium, PMA/Iono) of targets expressing IL-1RAP (K562-IL-1RAP<sup>+</sup>v1, KU812) or not (K562). For co-culture of IL-1RAP-positive cell culture supernatant with effectors, supernatants were diluted at 1 in 3. Medium and PMA/Iono were used as negative and positive controls, respectively. FSC : Forware Scatter. SSC : Side Scatter



**Figure S4.** To determine the impact of sIL-1RAP, a 24 h K562-IL-1RAPv5 culture supernatant was added at various concentrations (pure, 0.5, and 0.25) to E (labeled with eFluor):T (1:5) culture. Cytotoxicity was determined by cytometry of target lysis in the gate  $FSC^+/7-AAD^-$ , after gating on the eFluor-negative cells.

## Supplementary tables

**Table S1: Antibodies and kits**

Antibodies and kits used for cytometry in flux	Supplier	Clone
Alexa Fluor 488 Mouse Anti-Human IL-1RACP	R&D Systems	# 89412
BV421 Mouse Anti-Human CD34	BD Biosciences	581
APC-H7 Mouse Anti-Human CD38	BD Biosciences	HB7
V500 Anti-Human CD45	BD Biosciences	HI30
PercP-Cy5.5 Anti-Human CD33	BD Biosciences	P67.6 (CE/IVD)
PE Anti-Human CD133	Miltenyi Biotec	AC133
APC Anti-Human CD117	Miltenyi Biotec	A3C6E2
Vio-Blue Mouse Anti-Human CD3	Miltenyi Biotec	BW264/56
APC Mouse Anti-CD19	Miltenyi Biotec	LT19
PE Mouse Anti-Human CD107b	BD Biosciences	H4B4 (RUO)
PE Mouse Anti-Human CD107a	BD Biosciences	H4A3 (RUO)
PE Mouse Anti-Human IFN- $\gamma$	BD Biosciences	27 (RUO)
FITC Mouse Anti-Human CD62L	Biolegend	DREG-56
PE Mouse Anti-Human CD95	OZYME	DX2
PerCP Cy 5.5 Mouse Anti-Human CD8	Biolegend	SK1
FITC Mouse Anti-Human CD8	Diaclone	B-Z31
PE-Cy7 Mouse Anti-Human CD3	Beckman Coulter	UCHT1
APC Mouse Anti-Human CD45RA	Biolegend	HI100
APC-Vio 770 Mouse Anti-Human CD19	Miltenyi Biotec	LT19
Pacific Blue Mouse Anti-Human CD197 (CCR7)	Biolegend	G043H7
BV510 Mouse Anti-Human CD4	BD Biosciences	SK3
APC Anti-Biotin	Miltenyi Biotec	Bio3-18E7
BD Cytofix/Cytoperm™ Solution Kit	BD Biosciences	BD 554714
Monoclonal Anti- $\beta$ -Actin	Sigma-Aldrich	AC15
Sheep IgG anti-mouse IgG (H+L)-HRPO	Interchim	Polyclonal
Mouse Anti-Human CD247	BD Biosciences	8D3
Anti-Human CD247 (CD3 $\zeta$ )	BD Pharmingen	8D3

Anti-Lamin B1	Abcam	Polyclonal
Anti-Human CD45	Abcam	Polyclonal
Anti-Human GAPDH	Sigma-Aldrich	Polyclonal

## Discussion générale et perspectives

L'objectif de ce travail de thèse, réalisé en cotutelle avec l'Université Libanaise a été le développement d'immunothérapie anti-cancéreuse en utilisant un outil innovant de thérapie cellulaire, le CAR.

Les travaux mené durant cette thèse ont permis d'aboutir à un dépôt de **brevet auprès de l'Institut National de la Propriété Industrielle (INPI; CAR B17-4492EP : CAR-T CELLS AND THEIR USE)** et sont actuellement soumis pour publication.

A notre connaissance ce travail représente la première preuve de concept de développement d'un CAR anti-IL-1RAP de troisième génération sécurisé par le système suicide iCasp9/AP1903 portant le gène de sélection  $\Delta$ CD19 et produit à partir de particules lentivirales.

### A. IL-1RAP est une cible potentielle dans la LMC et la LAM

Plusieurs équipes ont montré la persistance des cellules souches résiduelles (CD34+CD38-/Ph1+) chez des patients en rémissions cytogénétiques et/ou moléculaires profondes (Chomel et al., 2011).

La persistance à long terme de ces cellules résiduelles pourrait expliquer les rechutes moléculaires observées chez environ la moitié des patients après arrêt du traitement par ITK (Chomel and Turhan, 2011). Par contre, nous pouvons supposer que l'absence de rechute chez la deuxième moitié des patients est liée à un rôle de leur système immunitaire, dans la destruction des cellules tumorales résiduelles.

Au vu du succès de l'immunothérapie adoptif par les CART-cells, dans le domaine de l'hématologie et en particulier des LAL-B. Les taux de réponses complètes observés varient de 70 à 90 % dans les deux principales études (Maude et al., 2014) (Lee et al., 2015).

Nous avons proposé de développer un CAR comme traitement additionnel ou alternatif aux ITKs dans la LMC.

L'antigène cible idéal d'un CAR doit être exprimé à la surface des cellules cibles et doit être fortement exprimé par les cellules tumorales et faiblement exprimée par les cellules saines.

Plusieurs marqueurs ont été définies comme étant des antigènes surexprimés à la surface des cellules souches leucémiques dans la LMC, y compris IL-1RAP (Järås et al., 2010), mais également CD25 (IL2RA) (Herrmann et al., 2014), CD26 (DPP4) (Herrmann et al., 2014), CD123 (IL3RA) (Nievergall et al., 2014), CD117 (KIT) (Florian et al., 2006) et ST2 (IL1RL1

ou IL33R) (Levescot et al., 2014). Parmi ces antigènes, seul IL-1RAP a été défini comme un marqueur sélectif des CSL (CD34+CD38low/Phi+) alors que les autres antigènes sont exprimés aussi par les CSH « normales » (CD34+CD38low/Phi-) (Wild and Krützfeldt, 2010) (Herrmann et al., 2014).

L'expression d'IL-1RAP dans la cellule leucémique ne dépend pas seulement de l'activité de la protéine de fusion BCR-ABL, car le traitement des cellules BCR-ABL+ avec l'imatinib® n'induit pas une diminution de l'expression d'IL-1RAP. Les cellules résistantes au traitement par ITK ainsi que les cellules leucémiques de la phase blastique dans la LMC surexpriment aussi la protéine IL-1RAP (Järås et al., 2010).

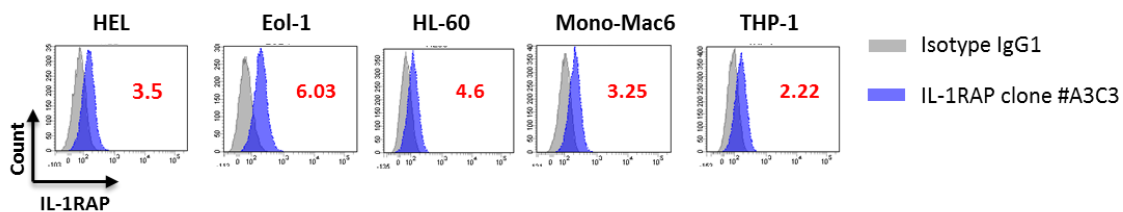
Ces démonstrations montrent que les cellules leucémiques conservent l'expression d'IL-1RAP à leur surface. Donc, il y aura moins de risque d'échappement de ces cellules à la cytotoxicité d'anti-IL-1RAP CART-cells.

De plus, de manière très intéressante, ce CAR anti-IL-1RAP pourrait être utilisé dans le traitement de la LAM dont la protéine IL-1RAP est aussi surexprimée à la surface des cellules leucémiques de LAM. Et son expression est également corrélée à un mauvais pronostic clinique (Ågerstam et al., 2016) . Malgré les progrès acquis ces dix dernières années dans le traitement de la LAM, la survie des patients n'a pas été améliorée significativement, du essentiellement aux rechutes. Les fortes interactions des blastes avec le système immunitaire, laissent entrevoir des pistes d'amélioration des traitements, garce aux approches d'immunothérapies.

Actuellement plusieurs groupes de recherche tentent d'identifier des cibles appropriées pour développer des immunothérapies alternatives permettant de traiter des patients réfractaires, en rechute de traitements conventionnelles ou traiter par des immunothérapies existantes (Järås et al., 2010). Ces équipes ont identifié IL-1RAP comme une cible potentielle pour détruire les cellules leucémiques dans la LAM, par un anticorps monoclonal spécifique d'IL-1RAP *in-vivo* par ADCC ou ADCP dans un modèle murin de xénogreffe (Askmyr et al., 2013).

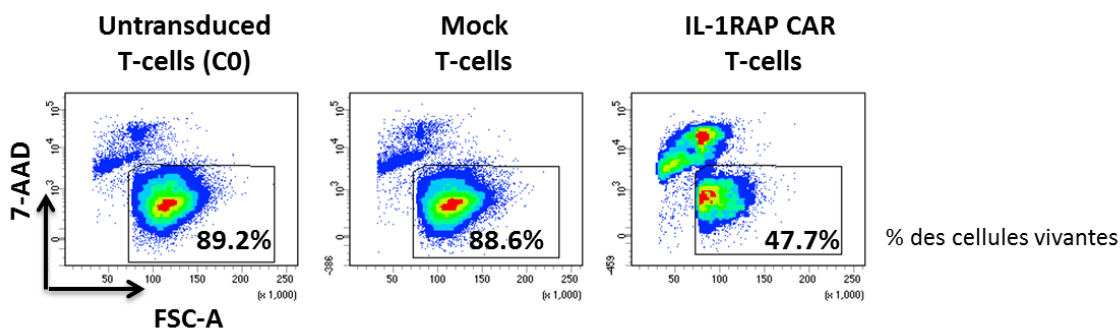
Dans notre laboratoire, en utilisant notre anticorps anti-IL-1RAP (#A3C3), lors de travaux préliminaires, nous avons détecté l'expression d'IL-1RAP à la surface de plusieurs lignées de LAM (HL-60, HEL, Eol-1, Mono-mac-6, et THP-1) avec des niveaux d'expression différents (**Figure 52**).





**Figure 52 : Expression d'IL-1RAP à la surface des lignées de LAM. Marquage en cytométrie en flux avec l'anticorps A3C3-FITC. Un anticorps IgG isotype couplé au FITC a été utilisé (Couleur gris). RFI IL-1RAP/isotype est mesuré (RFI relative fluorescence intensity (RFI= Mean fluorescence intensity (MFI) du marquage avec l'anticorps #A3C3/MFI du marquage avec l'isotype).**

De plus, les premiers résultats (non optimisés) de cytotoxicité contre la lignée HL-60.révèle une efficacité intéressante (Figure 53).



**Figure 53 : Test de cytotoxicité d'IL-1RAP CAR T-cells sur les cellules de la lignée HL-60. Marquage 7-AAD en CMF après co-culture des LT (C0), Mock ou CAR T-cells avec les cellules de la lignée HL-60, pendant 24h, à un ratio Effecteurs : cibles de 1 :1. Les pourcentages des cellules HL-60 vivantes dans les différentes conditions de co-cultures sont présentés sur la graphique.**

Nous allons poursuivre nos travaux sur la démonstration de l'efficacité de notre CAR dans le ciblage des cellules leucémiques de LAM *in-vitro* et *in-vivo* dans un modèle murin de xénogreffe. Dans le but de proposer notre CAR anti-IL-1RAP comme un traitement alternatif aux approches utilisant des CAR-T cells ciblant classiquement CD33 ou CD123 (Cummins and Gill, 2017). De plus, notre CAR, par la présence d'un système suicide, pourra être utilisé en situation allogénique lors d'une greffe hématopoïétique et constituer un pont entre la phase d'induction (LAM) et l'allogreffe

D'autre part, la spécificité du CAR contre les cellules leucémiques co-exprimant IL-1RAP et CD123 sera envisagée. La construction d'un CAR bispécifique (Dual-CAR) aux antigènes IL-1RAP et CD123 permettra de mieux cibler la cellule leucémique et s'affranchir de potentielles échappement par downregulation des antigènes de surfaces et limiter la toxicité contre les tissus sains, décrit notamment avec CD123. Dans cette construction, une première hypothèse

de construction sera la fusion de la scFv anti-IL-1RAP au fragment cytotoxique de CAR (CD3 $\zeta$ ) et la scFv d'anti-CD123 sera attachée aux fragments de costimulation (CD28 et 41-BB). La construction alternative scFv CD123/CD3 $\zeta$  et scFv IL-1RAP/CD28 et 41-BB servira de référence. Il sera également nécessaire de valider différentes charnières en rapport avec la confirmation tridimensionnelle de l'antigène. Ce type de CAR, pourrait réduire les risques des cytotoxicités non spécifique de type «on-target/off-tumor» chez le patient traité.

Finalement, CAR-IL-1RAP pourrait utiliser dans le cas de la tumeur solide d'où IL-1RAP est aussi décrit comme une cible intéressante, notamment pour le cancer du pancréas, du poumon, du sein du colon et dans le mélanome. En octobre 2017, des essais cliniques de Phase I et II (NCT03267316) d'un anticorps anti-IL-1RAP (nommé CAN04) ont débuté pour des patientes atteintes de cancer du sein et pour des patients atteints de cancer du côlon en phase métastatique. Une première investigation sera de vérifier que notre anticorps #A3C3 reconnaît les tissus tumoraux de cancers

## B. Stratégie de développement de CAR anti-IL-1RAP

Dans toutes les démarches expérimentales que nous avons suivies pour développer ce CAR, nous avons pris en compte, autant que possible les exigences réglementaires en vue d'une application clinique.

La connaissance de la spécificité de l'anticorps qui va servir à construire le CAR, est cruciale pour prévoir la cytotoxicité chez le patient. Nous avons démontré la spécificité de notre anticorps #A3C3 par plusieurs techniques. D'abord par criblage sur des lignées exprimant ou pas IL-1RAP en CMF, puis par ELISA, et finalement, par la détection de la protéine IL-1RAP en western blotting à la taille attendue (72KDa) sur la lignée KU812 ou K562 transfectée avec les plasmides d'IL-1RAP. Ensuite, sur des cellules primaires de patients atteints de LMC, nous avons montré l'efficacité de l'anticorps #A3C3 à détecter l'IL-1RAP exprimé à la surface des cellules souches CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>IL-1RAP<sup>+</sup>, qui représente la population cible de notre CART-cell. Cet anticorps pourrait d'ailleurs être évalué dans le monitoring des CSL.

D'une manière intéressante, l'efficacité de l'anticorps #A3C3 en immunohistochimie, sur KU812, nous a permis de l'utiliser en TMA sur des tissus sains. Par ce test, nous avons montré que notre anticorps ne reconnaît pas les cellules saines ou très faiblement dans différents types tissulaires (système nerveux, digestif, respiratoire, circulatoire,..). De plus,

nous avons montré l'absence de marquage d'IL-1RAP par les cellules endothéliales ou par les cellules hématopoïétiques saines (les granulocytes, les monocytes, les lymphocytes). Toutes ces démonstrations nous permettent d'estimer le faible risque d'avoir une cytotoxicité de nos CART-cells de type on-target/off-tumor chez le patient.

Le choix d'un CAR de troisième génération a été fait, avec CD28 et 41-BB comme domaines de costimulations, car le CD28 (molécules de costimulation) induit la sécrétion des cytokines inflammatoires (IL-2, IFN $\gamma$  et TNF $\alpha$  et d'autres cytokines) par les CART-cells activées. Ce qui améliore leur fonction cytotoxique contre les cellules tumorales cibles. De plus, la présence de la molécule de survie 41-BB augmente la viabilité des CART-cells *in-vivo* par comparaison à la viabilité des CART-cells de deuxième génération (Qasim et al., 2017).

Dans le plasmide utilisé, le promoteur EF1 $\alpha$  (promoteur puissant) a été choisi, renforcé par un *enhancer* (SP163). Ce promoteur permet une transcription d'un seul grand ARNm qui comprend la séquence du gène suicide iCasp9, du CAR et celle du gène de sélection  $\Delta$ CD19. Ces trois transgènes sont séparés par les séquences P2A et T2A séquence de clivage de 20 acides aminés qui permet la production en quantité équimolaire d'ARNm.

Dans cette construction, le placement du gène suicide iCasp9 juste après le promoteur est importante pour son expression et sa fonctionnalité. Car il a été déjà rapporté que le placement de la séquence d'iCasp9 après la séquence du CAR, aboutit à une perte de l'expression et de la fonction du système suicide (Budde et al., 2013).

D'autre part, la place du gène de sélection  $\Delta$ CD19 (protéine CD19 avec sa partie intracellulaire tronquée) à la fin de la construction est indispensable pour l'utiliser comme un gène rapporteur de l'expression d'iCasp9 et du CAR dans les cellules transduites avec ce vecteur. Ce système de sélection permettra d'obtenir une population de CART cells pure, permettant d'envisager une utilisation en situation allogénique afin d'éliminer si besoin ces CART-cells par infusion d'AP1903.

Les techniques les plus utilisées pour la transduction du génome codant pour un CAR dans les LT sont celles recourant à un vecteur lentiviral ou gamma-rétroviral. Nous avons utilisé un vecteur lentiviral car il présente plusieurs avantages en comparaison avec le vecteur rétroviral. Ces principaux avantages sont la capacité de porter et d'insérer de grands fragments d'ADN (plus de 10kbp) comme notre construction (iCasp9 + CAR +  $\Delta$ CD19, taille >10kbp).

Quoiqu'il n'a pas été rapporté de complication lié à l'insertion mutationnelle de matériel génétique exogène dans des LT primaires, les lentivirus ont un risque de mutagenèse

insertionnelle amoindri par rapport au rétrovirus et ont la capacité de transduire les cellules qui ne sont pas en division (cellules quiescentes), à l'inverse des particules rétrovirales qui ne peuvent transduire que des cellules en division.

Ces caractéristiques des lentivirus nous ont permis d'obtenir une très bonne efficacité de transduction des CART-cells à partir des LT d'un donneur sain (>80% des LT transduites sont CD3+CD19+) ou d'un patient de LMC (95% des LT transduites sont CD3+CD19+) sous traitement par des ITKs de 3<sup>ème</sup> génération (Bosutinib), après plusieurs lignes (4 années) d'ITKs.

Pour une utilisation clinique, l'efficacité de transduction recommandée doit être au moins de 10%. Et une efficacité de transduction au-dessus de 50% n'est pas préférable car elle augmente le risque de mutagenèse insertionnelle de type off-target dans le génome des LT. Pour cela, nous avons montré que nous pouvons diminuer cette efficacité de transduction des LT par une dilution du surnageant lentiviral.

Enfin, la prochaine étape de ce travail sera le transfert de notre système de production des CART cells, dans un système de production de CART-cells compatible avec les conditions GMP et la réglementation Européenne des médicaments de thérapie innovantes (MTI).

Nous avons eu recours à l'utilisation de la lignée K562 pour évaluer la fonction de nos CART-cells pour deux raisons. Le premier, est que cette lignée est dépourvu de CMH de classe I et par conséquent il y a moins de risque de développer une réaction d'allo-réactivité. La deuxième, est qu'elle est IL-1RAP négative, ce qui nous a permis de la transformer par transfection avec le vecteur codant pour la forme membranaire (K562-IL-1RAP-v1) ou soluble d'IL-1RAP (K562-IL-1RAP-v5).

Par CMF nous avons caractérisé l'expression membranaire d'IL-1RAP par la K562-IL-1RAP-v1 et par western-blotting nous avons pu montrer la sécrétion d'IL-1RAP dans le milieu de culture de K562-IL-1RAP-v5. Nous avons utilisé la lignée K562 (*wild type*) comme un contrôle négatif, pour les conditions de tests de co-cultures de CART-cells avec les K562-IL-1RAP-v1 ou v5. Avec ces modèles de cellules cibles, nous avons pu évaluer la spécificité d'activation de nos CART-cells. D'une manière intéressante, nous avons trouvé que la lignée K562-IL-1RAP-v1 exprime trois fois plus, la protéine IL-1RAP que la lignée KU812 qui exprime naturellement l'IL-1RAP.

Cette différence d'expression nous a permis d'évaluer la fonction de CART-cells sur deux niveaux différents d'expression de l'antigène cible. Mais malgré cette différence, aucune

différence significative a été trouvée dans la fonction des CAR T-cells (Dégranulation, et cytotoxicité) activées par co-culture avec KU812 ou K562-IL-1RAP+v1.

Nous avons montré, à partir du sang d'un patient en réponse suboptimale aux différents ITKs, que le traitement n'altère pas la production des CART-cells cytotoxiques contre les cellules blastiques CD34+ IL-1RAP+ en conditions autologues in vitro.

Nous disposons au laboratoire des prélèvements cryoconservés de la moelle osseuse (cellules CD34+), au diagnostic de trois patients atteints de la LMC. A partir des PBMC de ces trois patients, toujours en vie et sous traitement ITK, et après obtention de leur consentement, produire et tester la fonctionnalité de leurs CART-cells en face de leurs CML+/CD34+. Une demande d'autorisation au CPP (Comité de protection de personnes) est en cours pour amandé le protocole CAR-LMC (constitution d'une collection de patients LMC).

Les CART- cells ont été activées spécifiquement et seulement par les cellules qui expriment la forme membranaire d'IL-1RAP (K562-IL-1RAP-v1 et KU812). Elles ont proliféré (marquage CFSE), ont été cytotoxiques (induire la mort des cellules cibles par la sécrétion des granzymes et des perforines) et ont secrété des grandes quantités des cytokines inflammatoires de Th1 comme l'IL-2, l'IFN $\gamma$  et le TNF $\alpha$  et moins de cytokine inflammatoire de Th2 tel que l'IL-4, l'IL-6 et l'IL-10. La sécrétion de ces cytokines montre la fonction de la molécule de costimulation CD28 du CAR (Finney et al., 2004).

Cette sécrétion importante des cytokines inflammatoires reflète un syndrome de relargage cytokinique retrouvé chez les patients traités par des CART-cells dans les quelques jours suivant l'injection (Brudno and Kochenderfer, 2016). Ce SLC est lié à une réponse inflammatoire systémique avec des taux très élevés de cytokines circulantes telles que l'IL-6, l'IL-10, ou l'IFN $\gamma$ . Cette augmentation est associée à l'activation et à la prolifération des CART-cells injectées.

Le SLC est corrélé à l'efficacité des CART-cells, c'est pourquoi l'objectif est de contrôler le SLC avec une prévention des complications sévères plutôt que son éradication complète. Sachant que dans notre construction du CAR, la présence du système suicide iCasp9/AP1903 nous permettra d'éliminer rapidement les CART-cells chez le patient.

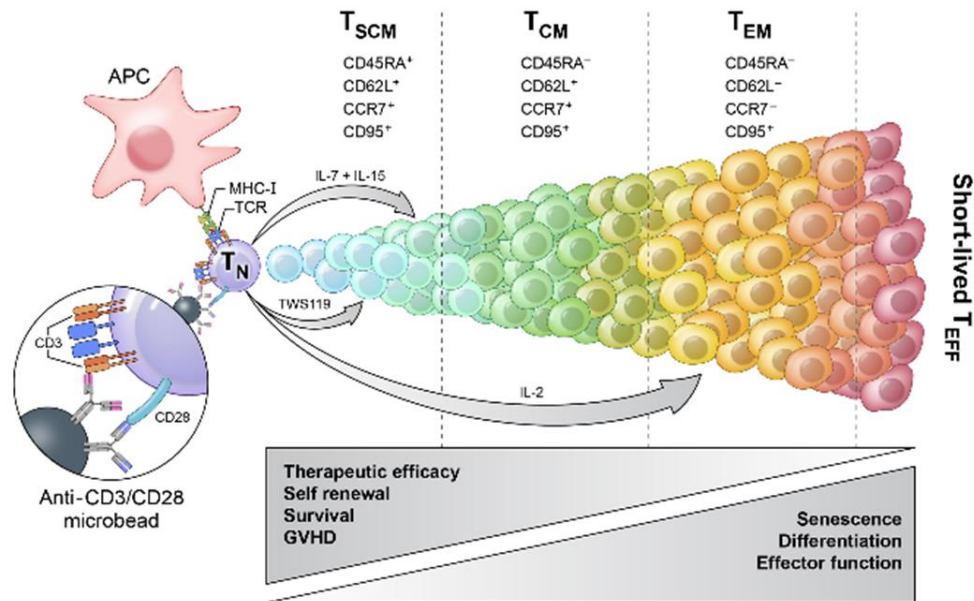
Des études précédentes ont montré l'efficacité de ce système : chez 4 patients ayant développé une GvHD suite à une greffe de cellules souches hématopoïétiques et de

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., 2011b).

A l'inverse de la forme membranaire d'IL-1RAP, la forme soluble sécrétée d'IL-1RAP n'a pas eu d'effet sur l'activation des CART-cells. Et sa présence dans le milieu de culture à une forte concentration (125ng/ml) n'altère pas la fonction cytotoxique de CART-cells contre KU812 exprimant la forme membranaire d'IL-1RAP. Notant que la concentration d'IL-1RAP sérique chez un donneur sain est très faible (200pg/ml) (Michaud et al., 2014) par comparaison avec la concentration nécessaire pour bloquer la réaction cytotoxique de CART-cell (>125ng/ml). Donc, il nous semble que la forme soluble n'aura pas d'effet bloquant sur le CAR chez le patient, mais il faudrait confirmer cette hypothèse par un dosage du taux d'IL-1RAP soluble dans le plasma de patient de LMC. Un test ELISA avec l'anticorps #A3C3 permettra de répondre à cette question. Il sera appliqué sur la collection de patients atteints de la LMC (Numéro d'enregistrement dans Clinical Trial: NCT02842320).

Dans le protocole que nous avons utilisé pour la production des CART-cells, les LT ont été activés avec des billes CD3/CD28, en présence de très forte concentration d'IL-2. Cette condition induit la différenciation des LT naïfs vers un phénotype effecteur tardif (**Figure 54**) (Gattinoni et al., 2011).

En effet, les essais actuels de transfert adoptif de LT utilisent des LT non sélectionnées et sans enrichissement d'une sous-population ou d'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, de différenciation et de la survie à long terme *in-vivo*. 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 stem cell central memory (TSCM).



**Figure 54 : Phénotype et fonction de LT en fonction de cytokines utilisés pendant l'activation par des billes CD3/CD28. T<sub>SCM</sub> : Stem cell centre memory T cells, T<sub>CM</sub> : Center memory T cells, T<sub>EM</sub>: Effector memory T cells, T<sub>EFF</sub>: Effector T cells (Gattinoni et al., 2011)**

Cette population présente le même phénotype que des LT naïfs (CD45RA<sup>+</sup> CD45RO<sup>-</sup> CCR7<sup>+</sup> CD62L<sup>+</sup> CD27<sup>+</sup> CD28<sup>+</sup>) mais exprime également le CD95, particulièrement présent sur les LT mémoires. Il est également présent chez les T effecteur, le CD95 correspond à FASL qui permet la cytotoxicité, c'est pourquoi cette population mémoire est intéressante, elle de bonne propriété de renouvellement, de différenciation et de survie et peut tuer les cibles. Ces T<sub>SCM</sub> présentent des propriétés de cellules souches : ils sont multipotents, possèdent des capacités d'auto-renouveaulement et peuvent générer l'ensemble des groupes de LT mémoires et effecteurs.

Dans un modèle de xéno greffe tumorales dans des souris immunodéficiences NSG greffées par la lignée K562-IL-1RAP<sup>+</sup>/Luciférase<sup>+</sup>. On constate une diminution de la masse tumorale 4 jours après injection des CART-cells, jusqu'à disparition totale. Nous allons tester encore dans ce modèle, la cinétique de la prolifération et la persistance des CART-cells (par marquage en CFM sur des prélèvements du sang retro-orbitales). Aussi, nous allons évaluer la relation entre le nombre et les phénotypes de CART-cells et leur fonction cytotoxique.

### C. Possibilité d'utilisation de notre CART-cells en allogreffe

Dans les essais cliniques de CAR, les LT proviennent très majoritairement du patient (situation autologue).

La LMC est très sensible au système immunitaire allogénique dont l'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques constituait jusqu'à récemment l'approche d'immunothérapie cellulaire la plus utilisée pour traiter des hémopathies malignes par une réaction de GvL (Gratwohl and Heim, 2009), sans toutefois cibler spécifiquement les cellules tumorales.

L'efficacité des réponses GvL dans l'élimination des tumeurs a été définitivement démontrée par l'utilisation des perfusions de lymphocytes du donneur (*DLI: Donor Lymphocytes Infusion*) pour traiter la LMC récidivante après la greffe de CSH (Kolb et al., 1990).

En outre, en particulier dans la LMC, l'utilisation de LT du donneur allogénique compatible pour produire des CART-cells, améliorera les effets anti-leucémiques de ces DLI en combinant l'alloréactivité et la cytotoxicité spécifique de l'antigène IL-1RAP, en cas de patient avec une phase avancée de LMC à haut risque ou en phase chronique résistante ou intolérante aux ITKs. Cette source peut contourner les échecs de fabrication des CART-cells à partir des LT du patient lourdement traité (Grupp et al., 2013b).

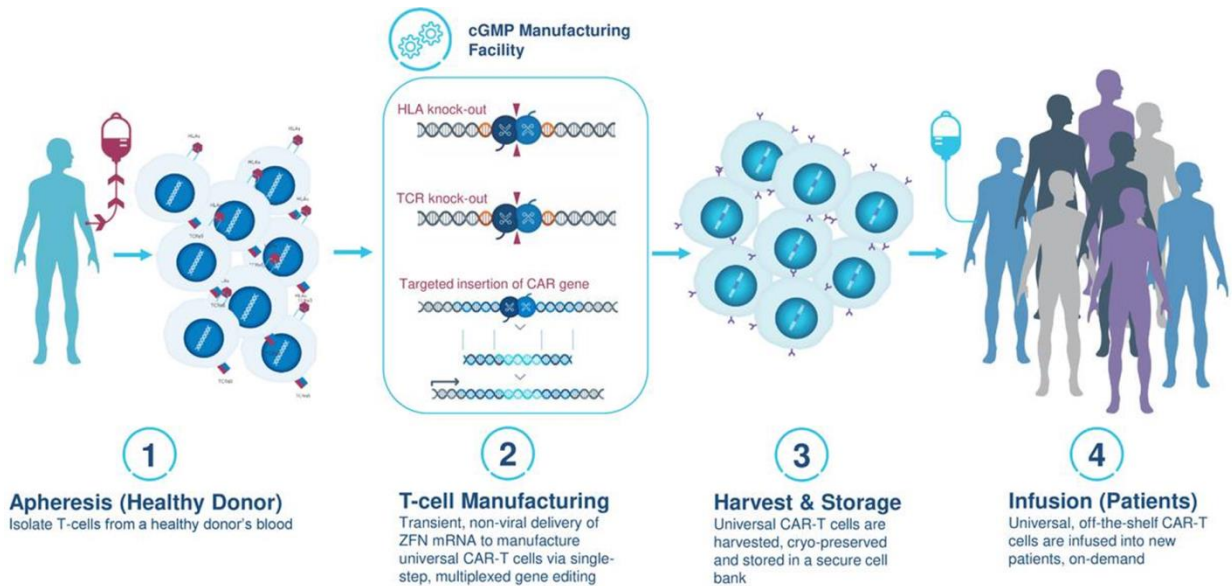
Le principal risque lors de la perfusion de LT allogéniques est le développement d'une maladie du greffon contre l'hôte (GvHD), avec des complications graves, parfois mortelle. Nous pourrions contrôler ce problème en activant le système suicide iCASP9/AP1903 apporté par notre construction lentivirale. Le système de gène suicide peut également être activé en cas d'événements indésirables tels que le SLC, la toxicité du système nerveux cérébral, la toxicité hors cible ou le syndrome de lyse tumorale.

Dans le cas de CAR allogéniques (Donneur avec un HLA haplo-, géno- ou phéno-identique), la cytotoxicité de CART-cell est médiée par deux voies : la voie anti-leucémique de reconnaissance par le récepteur chimérique CAR et la voie allogénique médiée par le récepteur T (GvL). Ces CART-cells allogéniques peuvent être utilisés en DLI. Dans le cas de CAR universels, la cytotoxicité de CART-cell est médiée uniquement par la voie du CAR.

D'autre part, le traitement par les CART-cells allogéniques est restreint aux patients qui possèdent un HLA compatible au HLA du donneur. Alors que, le traitement par le CAR



universel est envisagé à tous les patients (pas de besoin à une compatibilité HLA) (**Figure 55**). La préparation de banques de cellules CART « ready to use » représente donc un intérêt important pour le développement future de ces immunothérapies



**Figure 55 : Stratégie et modalité du traitement du patient par un CAR universel. Par la technique de ZFN (Zinc Finger Nuclease) il est possible d'éteindre le gène de HLA ou de TCR. De plus, il est possible d'insérer la séquence codante pour le CAR dans un endroit précis du gène du LT (dans la région du TCR, de CD52 par exemple). D'après <https://www.sangamo.com/>.**

## Conclusion

Ce travail de thèse représente la première preuve de concept du développement des CART-cells anti-IL-1RAP avec un CAR de troisième génération, sécurisé par un système suicide iCasp9/AP1903 efficace. Sur ces CART-cells, nous avons validé leur capacité à proliférer, à sécréter des cytokines inflammatoires et à induire une cytotoxicité spécifique des cellules tumorales *in-vitro* contre des lignées et des cellules primaires de patient atteint de LMC et *in-vivo* dans un modèle murin de xénogreffe (**Figure 55**).

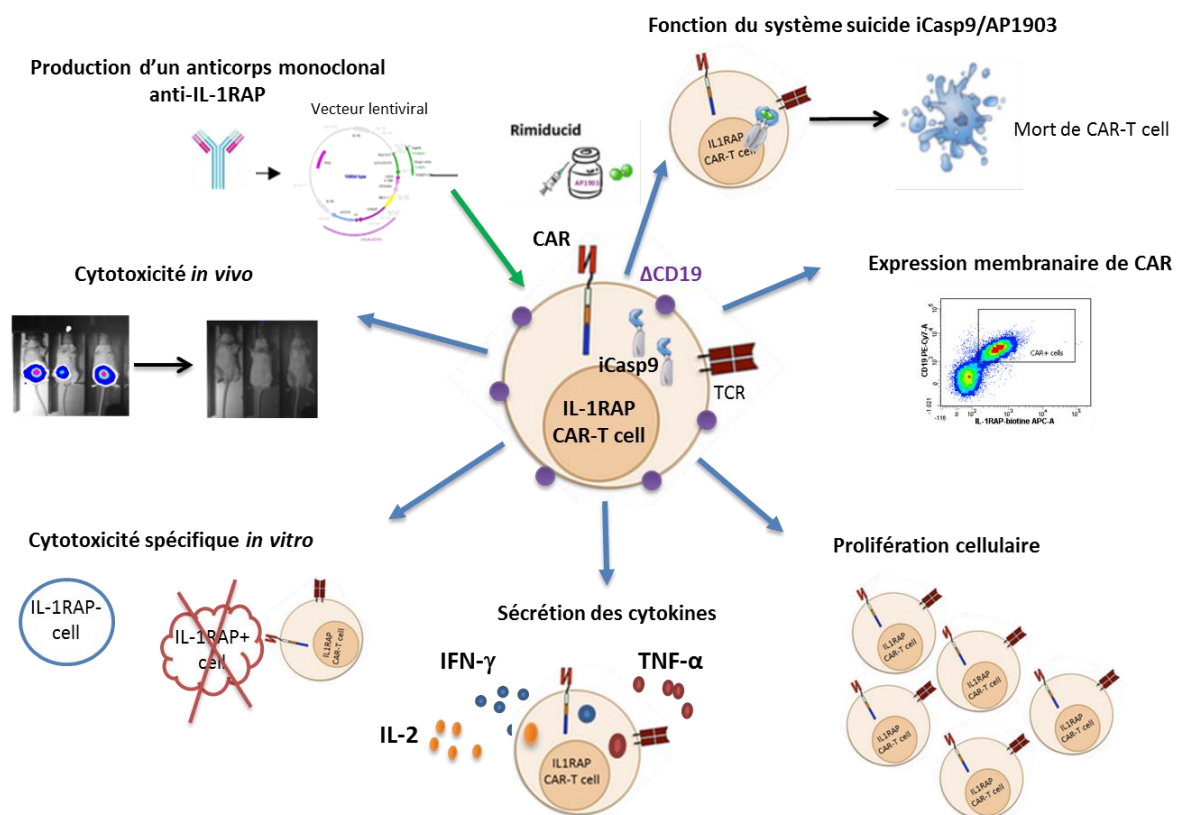


Figure 56 : Schéma récapitulatif des principaux résultats.

## Références bibliographiques

Ågerstam, H., Hansen, N., von Palffy, S., Sandén, C., Reckzeh, K., Karlsson, C., Lilljebjörn, H., Landberg, N., Askmyr, M., Högborg, C., et al. (2016). IL1RAP antibodies block IL-1-induced expansion of candidate CML stem cells and mediate cell killing in xenograft models. *Blood* *128*, 2683–2693.

Ahmed, N., Brawley, V.S., Hegde, M., Robertson, C., Ghazi, A., Gerken, C., Liu, E., Dakhova, O., Ashoori, A., Corder, A., et al. (2015). Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (HER2) -Specific Chimeric Antigen Receptor-Modified T Cells for the Immunotherapy of HER2-Positive Sarcoma. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* *33*, 1688–1696.

Ali, S.A., Shi, V., Maric, I., Wang, M., Stroncek, D.F., Rose, J.J., Brudno, J.N., Stetler-Stevenson, M., Feldman, S.A., Hansen, B.G., et al. (2016). T cells expressing an anti-B-cell maturation antigen chimeric antigen receptor cause remissions of multiple myeloma. *Blood* *128*, 1688–1700.

Askmyr, M., Ågerstam, H., Hansen, N., Gordon, S., Arvanitakis, A., Rissler, M., Juliusson, G., Richter, J., Järås, M., and Fioretos, T. (2013). Selective killing of candidate AML stem cells by antibody targeting of IL1RAP. *Blood* *121*, 3709–3713.

Assouline, S., and Lipton, J.H. (2011). Monitoring response and resistance to treatment in chronic myeloid leukemia. *Curr. Oncol. Tor. Ont* *18*, e71-83.

Baccarani, M., Deininger, M.W., Rosti, G., Hochhaus, A., Soverini, S., Apperley, J.F., Cervantes, F., Clark, R.E., Cortes, J.E., Guilhot, F., et al. (2013a). European LeukemiaNet recommendations for the management of chronic myeloid leukemia: 2013. *Blood* *122*, 872.

Baccarani, M., Deininger, M.W., Rosti, G., Hochhaus, A., Soverini, S., Apperley, J.F., Cervantes, F., Clark, R.E., Cortes, J.E., Guilhot, F., et al. (2013b). European LeukemiaNet recommendations for the management of chronic myeloid leukemia: 2013. *Blood* *122*, 872–884.

Baccarani, M., Castagnetti, F., Gugliotta, G., and Rosti, G. (2015). A review of the European LeukemiaNet recommendations for the management of CML. *Ann. Hematol.* *94 Suppl 2*, S141-147.

Bartley, P.A., Ross, D.M., Latham, S., Martin-Harris, M.H., Budgen, B., Wilczek, V., Branford, S., Hughes, T.P., and Morley, A.A. (2010). Sensitive detection and quantification of minimal residual disease in chronic myeloid leukaemia using nested quantitative PCR for BCR-ABL DNA. *Int. J. Lab. Hematol.* *32*, e222-228.

Bhoj, V.G., Arhontoulis, D., Wertheim, G., Capobianchi, J., Callahan, C.A., Ellebrecht, C.T., Obstfeld, A.E., Lacey, S.F., Melenhorst, J.J., Nazimuddin, F., et al. (2016). Persistence of long-lived plasma cells and humoral immunity in individuals responding to CD19-directed CAR T-cell therapy. *Blood* *128*, 360–370.

biolabs Fundamental Technologies for Antibody Production- Phage Display | Creative Biolabs Blog.

Bocchia, M., Gentili, S., Abruzzese, E., Fanelli, A., Iuliano, F., Tabilio, A., Amabile, M., Forconi, F., Gozzetti, A., Raspadori, D., et al. (2005). Effect of a p210 multi-peptide vaccine associated with imatinib or interferon in patients with chronic myeloid leukaemia and persistent residual disease: a multicentre observational trial. *Lancet Lond. Engl.* *365*, 657–662.

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

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. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* 15, 1248–1252.

Breccia, M., and Alimena, G. (2014). Discontinuation of tyrosine kinase inhibitors and new approaches to target leukemic stem cells: treatment-free remission as a new goal in chronic myeloid leukemia. *Cancer Lett.* 347, 22–28.

Brocker, T., and Karjalainen, K. (1995). Signals through T cell receptor-zeta chain alone are insufficient to prime resting T lymphocytes. *J. Exp. Med.* 181, 1653–1659.

Brown, C.E., Badie, B., Barish, M.E., Weng, L., Ostberg, J.R., Chang, W.-C., Naranjo, A., Starr, R., Wagner, J., Wright, C., et al. (2015). Bioactivity and Safety of IL13R $\alpha$ 2-Redirected Chimeric Antigen Receptor CD8+ T Cells in Patients with Recurrent Glioblastoma. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 21, 4062–4072.

Brudno, J.N., and Kochenderfer, J.N. (2016). Toxicities of chimeric antigen receptor T cells: recognition and management. *Blood* 127, 3321–3330.

Brudno, J.N., Somerville, R.P.T., Shi, V., Rose, J.J., Halverson, D.C., Fowler, D.H., Gea-Banacloche, J.C., Pavletic, S.Z., Hickstein, D.D., Lu, T.L., et al. (2016). Allogeneic T Cells That Express an Anti-CD19 Chimeric Antigen Receptor Induce Remissions of B-Cell Malignancies That Progress After Allogeneic Hematopoietic Stem-Cell Transplantation Without Causing Graft-Versus-Host Disease. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 34, 1112–1121.

Brümmendorf, T.H., Holyoake, T.L., Rufer, N., Barnett, M.J., Schulzer, M., Eaves, C.J., Eaves, A.C., and Lansdorp, P.M. (2000). Prognostic implications of differences in telomere length between normal and malignant cells from patients with chronic myeloid leukemia measured by flow cytometry. *Blood* 95, 1883–1890.

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. *Br. Med. J.* 1, 779–786.

Campoli, M., Chang, C.-C., and Ferrone, S. (2002). HLA class I antigen loss, tumor immune escape and immune selection. *Vaccine* 20 Suppl 4, A40-45.

Caruso, H.G., Hurton, L.V., Najjar, A., Rushworth, D., Ang, S., Olivares, S., Mi, T., Switzer, K., Singh, H., Huls, H., et al. (2015). Tuning Sensitivity of CAR to EGFR Density Limits Recognition of Normal Tissue While Maintaining Potent Antitumor Activity. *Cancer Res.* 75, 3505–3518.

Chackerian, A.A., Oldham, E.R., Murphy, E.E., Schmitz, J., Pflanz, S., and Kastelein, R.A. (2007). IL-1 receptor accessory protein and ST2 comprise the IL-33 receptor complex. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 179, 2551–2555.

Chandran, S.S., Somerville, R.P.T., Yang, J.C., Sherry, R.M., Klebanoff, C.A., Goff, S.L., Wunderlich, J.R., Danforth, D.N., Zlott, D., Paria, B.C., et al. (2017). Treatment of metastatic uveal melanoma with adoptive transfer of tumour-infiltrating lymphocytes: a single-centre, two-stage, single-arm, phase 2 study. *Lancet Oncol.* *18*, 792–802.

Chen, C.I.-U., Koschmieder, S., Kerstiens, L., Schemionek, M., Altvater, B., Pscherer, S., Gerss, J., Maecker, H.T., Berdel, W.E., Juergens, H., et al. (2012). NK cells are dysfunctional in human chronic myelogenous leukemia before and on imatinib treatment and in BCR-ABL-positive mice. *Leukemia* *26*, 465–474.

Chen, X., Zaro, J., and Shen, W.-C. (2013). Fusion Protein Linkers: Property, Design and Functionality. *Adv. Drug Deliv. Rev.* *65*, 1357–1369.

Chen, Y., Hu, Y., Zhang, H., Peng, C., and Li, S. (2009). Loss of the Alox5 gene impairs leukemia stem cells and prevents chronic myeloid leukemia. *Nat. Genet.* *41*, 783–792.

Chen, Y., Peng, C., Li, D., and Li, S. (2010). Molecular and cellular bases of chronic myeloid leukemia. *Protein Cell* *1*, 124–132.

Chmielewski, M., Hombach, A.A., and Abken, H. (2011). CD28 cosignalling does not affect the activation threshold in a chimeric antigen receptor-redirectioned T-cell attack. *Gene Ther.* *18*, 62–72.

Chomel, J.-C., and Turhan, A.G. (2011). Chronic myeloid leukemia stem cells in the era of targeted therapies: resistance, persistence and long-term dormancy. *Oncotarget* *2*, 713–727.

Chomel, J.-C., Bonnet, M.-L., Sorel, N., Bertrand, A., Meunier, M.-C., Fichelson, S., Melkus, M., Bennaceur-Griscelli, A., Guilhot, F., and Turhan, A.G. (2011). Leukemic stem cell persistence in chronic myeloid leukemia patients with sustained undetectable molecular residual disease. *Blood* *118*, 3657–3660.

Christiansson, L., Söderlund, S., Svensson, E., Mustjoki, S., Bengtsson, M., Simonsson, B., Olsson-Strömberg, U., and Loskog, A.S.I. (2013). Increased level of myeloid-derived suppressor cells, programmed death receptor ligand 1/programmed death receptor 1, and soluble CD25 in Sokal high risk chronic myeloid leukemia. *PLoS One* *8*, e55818.

Coley, W.B. (1891). II. Contribution to the Knowledge of Sarcoma. *Ann. Surg.* *14*, 199–220.

Coley, W.B. (1891). The treatment of malignant tumors by repeated inoculations of erysipelas. With a report of ten original cases. 1893. *Clin. Orthop.* 3–11.

Collins, R.H., Shpilberg, O., Drobyski, W.R., Porter, D.L., Giral, S., Champlin, R., Goodman, S.A., Wolff, S.N., Hu, W., Verfaillie, C., et al. (1997). Donor leukocyte infusions in 140 patients with relapsed malignancy after allogeneic bone marrow transplantation. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* *15*, 433–444.

Cortes, J.E., Kim, D.-W., Kantarjian, H.M., Brümmendorf, T.H., Dyagil, I., Griskevicius, L., Malhotra, H., Powell, C., Gogat, K., Countouriotis, A.M., et al. (2012). Bosutinib versus imatinib in newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia: results from the BELA trial. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* *30*, 3486–3492.

Cummins, K.D., and Gill, S. (2017). Anti-CD123 chimeric antigen receptor T-cells (CART): an evolving treatment strategy for hematological malignancies, and a potential ace-in-the-hole against antigen-negative relapse. *Leuk. Lymphoma* 1–15.

Dai, Z., and Pendergast, A.M. (1995). Abi-2, a novel SH3-containing protein interacts with the c-Abl tyrosine kinase and modulates c-Abl transforming activity. *Genes Dev.* 9, 2569–2582.

Dai, Z., Quackenbush, R.C., Courtney, K.D., Grove, M., Cortez, D., Reuther, G.W., and Pendergast, A.M. (1998). Oncogenic Abl and Src tyrosine kinases elicit the ubiquitin-dependent degradation of target proteins through a Ras-independent pathway. *Genes Dev.* 12, 1415–1424.

Davila, M.L., and Sadelain, M. (2016). Biology and clinical application of CAR T cells for B cell malignancies. *Int. J. Hematol.* 104, 6–17.

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. (2014a). Efficacy and toxicity management of 19-28z CAR T cell therapy in B cell acute lymphoblastic leukemia. *Sci. Transl. Med.* 6, 224ra25.

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. (2014b). Efficacy and toxicity management of 19-28z CAR T cell therapy in B cell acute lymphoblastic leukemia. *Sci. Transl. Med.* 6, 224ra25.

Demicheli, R., Abbattista, A., Miceli, R., Valagussa, P., and Bonadonna, G. (1996). Time distribution of the recurrence risk for breast cancer patients undergoing mastectomy: further support about the concept of tumor dormancy. *Breast Cancer Res. Treat.* 41, 177–185.

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. (2011a). Inducible apoptosis as a safety switch for adoptive cell therapy. *N. Engl. J. Med.* 365, 1673–1683.

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. (2011b). Inducible apoptosis as a safety switch for adoptive cell therapy. *N. Engl. J. Med.* 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. *Nat. Med.* 8, 793–800.

Druker, B.J., Tamura, S., Buchdunger, E., Ohno, S., Segal, G.M., Fanning, S., Zimmermann, J., and Lydon, N.B. (1996). Effects of a selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase on the growth of Bcr-Abl positive cells. *Nat. Med.* 2, 561–566.

Drummond, M.W., Hoare, S.F., Monaghan, A., Graham, S.M., Alcorn, M.J., Keith, W.N., and Holyoake, T.L. (2005). Dysregulated expression of the major telomerase components in leukaemic stem cells. *Leukemia* 19, 381–389.

Dupont, D. Numéro 125 - Avril 2017.

Dupret, B., and Angrand, P.-O. (2014). [Targeted genome modifications using TALEN]. *Med. Sci. MS* 30, 186–193.

Elgert, K.D., Alleva, D.G., and Mullins, D.W. (1998). Tumor-induced immune dysfunction: the macrophage connection. *J. Leukoc. Biol.* 64, 275–290.

Ernst, T., Hoffmann, J., Erben, P., Hanfstein, B., Leitner, A., Hehlmann, R., Hochhaus, A., and Müller, M.C. (2008a). ABL single nucleotide polymorphisms may masquerade as BCR-ABL mutations

associated with resistance to tyrosine kinase inhibitors in patients with chronic myeloid leukemia. *Haematologica* 93, 1389–1393.

Ernst, T., Hoffmann, J., Erben, P., Hanfstein, B., Leitner, A., Hehlmann, R., Hochhaus, A., and Müller, M.C. (2008b). ABL single nucleotide polymorphisms may masquerade as BCR-ABL mutations associated with resistance to tyrosine kinase inhibitors in patients with chronic myeloid leukemia. *Haematologica* 93, 1389–1393.

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. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90, 720–724.

Eyquem, J., Mansilla-Soto, J., Giavridis, T., van der Stegen, S.J.C., Hamieh, M., Cunanan, K.M., Odak, A., Gönen, M., and Sadelain, M. (2017). Targeting a CAR to the TRAC locus with CRISPR/Cas9 enhances tumour rejection. *Nature* 543, 113–117.

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. *Sci. Transl. Med.* 5, 215ra172.

Feng, K., Guo, Y., Dai, H., Wang, Y., Li, X., Jia, H., and Han, W. (2016). Chimeric antigen receptor-modified T cells for the immunotherapy of patients with EGFR-expressing advanced relapsed/refractory non-small cell lung cancer. *Sci. China Life Sci.* 59, 468–479.

Finney, H.M., Akbar, A.N., and Lawson, A.D.G. (2004). Activation of resting human primary T cells with chimeric receptors: costimulation from CD28, inducible costimulator, CD134, and CD137 in series with signals from the TCR zeta chain. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 172, 104–113.

Florian, S., Sonneck, K., Hauswirth, A.W., Krauth, M.-T., Scherthaner, G.-H., Sperr, W.R., and Valent, P. (2006). Detection of molecular targets on the surface of CD34+/CD38– stem cells in various myeloid malignancies. *Leuk. Lymphoma* 47, 207–222.

Gacerez, A.T., Arellano, B., and Sentman, C.L. (2016). How Chimeric Antigen Receptor Design Affects Adoptive T Cell Therapy. *J. Cell. Physiol.* 231, 2590–2598.

Gallucci, S., Lolkema, M., and Matzinger, P. (1999). Natural adjuvants: endogenous activators of dendritic cells. *Nat. Med.* 5, 1249–1255.

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. *Nat. Med.* 17, 1290–1297.

Geay, J.-F., Buet, D., Zhang, Y., Foudi, A., Jarrier, P., Berthebaud, M., Turhan, A.G., Vainchenker, W., and Louache, F. (2005). p210BCR-ABL inhibits SDF-1 chemotactic response via alteration of CXCR4 signaling and down-regulation of CXCR4 expression. *Cancer Res.* 65, 2676–2683.

Gerber, J.M., Qin, L., Kowalski, J., Smith, B.D., Griffin, C.A., Vala, M.S., Collector, M.I., Perkins, B., Zahurak, M., Matsui, W., et al. (2011). Characterization of chronic myeloid leukemia stem cells. *Am. J. Hematol.* 86, 31–37.

- Girardi, M., Oppenheim, D.E., Steele, C.R., Lewis, J.M., Glusac, E., Filler, R., Hobby, P., Sutton, B., Tigelaar, R.E., and Hayday, A.C. (2001). Regulation of cutaneous malignancy by gammadelta T cells. *Science* 294, 605–609.
- Goldman, J.M. (2010). Chronic myeloid leukemia: a historical perspective. *Semin. Hematol.* 47, 302–311.
- Goldman, J.M., and Melo, J.V. (2003). Chronic myeloid leukemia--advances in biology and new approaches to treatment. *N. Engl. J. Med.* 349, 1451–1464.
- Goldman, J.M., Apperley, J.F., Jones, L., Marcus, R., Goolden, A.W., Batchelor, R., Hale, G., Waldmann, H., Reid, C.D., and Hows, J. (1986). Bone marrow transplantation for patients with chronic myeloid leukemia. *N. Engl. J. Med.* 314, 202–207.
- Gonon-Demoulian, R., Goldman, J.M., and Nicolini, F.E. (2014). [History of chronic myeloid leukemia: a paradigm in the treatment of cancer]. *Bull. Cancer (Paris)* 101, 56–67.
- Gorre, M.E., Mohammed, M., Ellwood, K., Hsu, N., Paquette, R., Rao, P.N., and Sawyers, C.L. (2001). Clinical resistance to STI-571 cancer therapy caused by BCR-ABL gene mutation or amplification. *Science* 293, 876–880.
- Gotoh, A., Miyazawa, K., Ohyashiki, K., Tauchi, T., Boswell, H.S., Broxmeyer, H.E., and Toyama, K. (1995). Tyrosine phosphorylation and activation of focal adhesion kinase (p125FAK) by BCR-ABL oncoprotein. *Exp. Hematol.* 23, 1153–1159.
- Goverdhan, S., Puntel, M., Xiong, W., Zirger, J.M., Barcia, C., Curtin, J.F., Soffer, E.B., Mondkar, S., King, G.D., Hu, J., et al. (2005). Regulatable gene expression systems for gene therapy applications: progress and future challenges. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* 12, 189–211.
- Grada, Z., Hegde, M., Byrd, T., Shaffer, D.R., Ghazi, A., Brawley, V.S., Corder, A., Schönfeld, K., Koch, J., Dotti, G., et al. (2013). TanCAR: A Novel Bispecific Chimeric Antigen Receptor for Cancer Immunotherapy. *Mol. Ther. Nucleic Acids* 2, e105.
- Graham, S.M., Jørgensen, H.G., Allan, E., Pearson, C., Alcorn, M.J., Richmond, L., and Holyoake, T.L. (2002). Primitive, quiescent, Philadelphia-positive stem cells from patients with chronic myeloid leukemia are insensitive to STI571 in vitro. *Blood* 99, 319–325.
- Gratwohl, A., and Heim, D. (2009). Current role of stem cell transplantation in chronic myeloid leukaemia. *Best Pract. Res. Clin. Haematol.* 22, 431–443.
- Greider, C.W., and Blackburn, E.H. (1985). Identification of a specific telomere terminal transferase activity in Tetrahymena extracts. *Cell* 43, 405–413.
- Groh, V., Wu, J., Yee, C., and Spies, T. (2002). Tumour-derived soluble MIC ligands impair expression of NKG2D and T-cell activation. *Nature* 419, 734–738.
- Gross, G., Waks, T., and Eshhar, Z. (1989). Expression of immunoglobulin-T-cell receptor chimeric molecules as functional receptors with antibody-type specificity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 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. (2013a). Chimeric antigen receptor-modified T cells for acute lymphoid leukemia. *N. Engl. J. Med.* 368, 1509–1518.



- 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. (2013b). Chimeric antigen receptor-modified T cells for acute lymphoid leukemia. *N. Engl. J. Med.* *368*, 1509–1518.
- Hamad, A., Sahli, Z., El Sabban, M., Mouteirik, M., and Nasr, R. (2013). Emerging therapeutic strategies for targeting chronic myeloid leukemia stem cells. *Stem Cells Int.* *2013*, 724360.
- Hanahan, D., and Folkman, J. (1996). Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* *86*, 353–364.
- Hao, Q.L., Thiemann, F.T., Petersen, D., Smogorzewska, E.M., and Crooks, G.M. (1996). Extended long-term culture reveals a highly quiescent and primitive human hematopoietic progenitor population. *Blood* *88*, 3306–3313.
- Hartmann, J., Schüßler-Lenz, M., Bondanza, A., and Buchholz, C.J. (2017). Clinical development of CAR T cells-challenges and opportunities in translating innovative treatment concepts. *EMBO Mol. Med.* *9*, 1183–1197.
- Haynes, N.M., Trapani, J.A., Teng, M.W.L., Jackson, J.T., Cerruti, L., Jane, S.M., Kershaw, M.H., Smyth, M.J., and Darcy, P.K. (2002). Single-chain antigen recognition receptors that costimulate potent rejection of established experimental tumors. *Blood* *100*, 3155–3163.
- Heinzer, H., Huland, E., and Huland, H. (2002). [Regional immunotherapy of metastatic renal cell carcinoma]. *Urol. Ausg A* *41*, 239–248.
- Herrmann, H., Sadovnik, I., Cerny-Reiterer, S., Rüllicke, T., Stefanzi, G., Willmann, M., Hoermann, G., Bilban, M., Blatt, K., Herndlhofer, S., et al. (2014). Dipeptidylpeptidase IV (CD26) defines leukemic stem cells (LSC) in chronic myeloid leukemia. *Blood* *123*, 3951–3962.
- Hörtl, L., Zelle-Rieser, C., Gander, H., Papesh, C., Ramoner, R., Bartsch, G., Rogatsch, H., Barsoum, A.L., Coggin, J.H., and Thurnher, M. (2002). Immunotherapy of metastatic renal cell carcinoma with tumor lysate-pulsed autologous dendritic cells. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *8*, 3369–3376.
- Hombach, A., Heuser, C., Gerken, M., Fischer, B., Lewalter, K., Diehl, V., Pohl, C., and Abken, H. (2000). T cell activation by recombinant FcepsilonRI gamma-chain immune receptors: an extracellular spacer domain impairs antigen-dependent T cell activation but not antigen recognition. *Gene Ther.* *7*, 1067–1075.
- Hombach, A.A., Heiders, J., Foppe, M., Chmielewski, M., and Abken, H. (2012a). OX40 costimulation by a chimeric antigen receptor abrogates CD28 and IL-2 induced IL-10 secretion by redirected CD4(+) T cells. *Oncoimmunology* *1*, 458–466.
- Hombach, A.A., Heiders, J., Foppe, M., Chmielewski, M., and Abken, H. (2012b). OX40 costimulation by a chimeric antigen receptor abrogates CD28 and IL-2 induced IL-10 secretion by redirected CD4(+) T cells. *Oncoimmunology* *1*, 458–466.
- Järås, M., Johnels, P., Hansen, N., Agerstam, H., Tsapogas, P., Rissler, M., Lassen, C., Olofsson, T., Bjerrum, O.W., Richter, J., et al. (2010). Isolation and killing of candidate chronic myeloid leukemia stem cells by antibody targeting of IL-1 receptor accessory protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *107*, 16280–16285.

- Ju, Z., and Sun, W. (2017). Drug delivery vectors based on filamentous bacteriophages and phage-mimetic nanoparticles. *Drug Deliv.* 24, 1898–1908.
- Kalaitidou, M., Kueberuwa, G., Schütt, A., and Gilham, D.E. (2015). CAR T-cell therapy: toxicity and the relevance of preclinical models. *Immunotherapy* 7, 487–497.
- Kantarjian, H., O'Brien, S., Jabbour, E., Garcia-Manero, G., Quintas-Cardama, A., Shan, J., Rios, M.B., Ravandi, F., Faderl, S., Kadia, T., et al. (2012). Improved survival in chronic myeloid leukemia since the introduction of imatinib therapy: a single-institution historical experience. *Blood* 119, 1981–1987.
- Kantarjian, H.M., Cortes, J.E., Kim, D.-W., Khoury, H.J., Brümmendorf, T.H., Porkka, K., Martinelli, G., Durrant, S., Leip, E., Kelly, V., et al. (2014). Bosutinib safety and management of toxicity in leukemia patients with resistance or intolerance to imatinib and other tyrosine kinase inhibitors. *Blood* 123, 1309.
- Katz, S.C., Burga, R.A., McCormack, E., Wang, L.J., Mooring, W., Point, G.R., Khare, P.D., Thorn, M., Ma, Q., Stainken, B.F., et al. (2015). Phase I Hepatic Immunotherapy for Metastases Study of Intra-Arterial Chimeric Antigen Receptor-Modified T-cell Therapy for CEA+ Liver Metastases. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 21, 3149–3159.
- Keramatinia, A., Ahadi, A., Akbari, M.E., Mohseny, M., Jarahi, A.M., Mehrvar, N., Mansouri, N., Tabatabaei, S.A.M., and Movafagh, A. (2017). Genomic Profiling of Chronic Myelogenous Leukemia: Basic and Clinical Approach. *J. Cancer Prev.* 22, 74–81.
- Kerkelä, R., Grazette, L., Yacobi, R., Iliescu, C., Patten, R., Beahm, C., Walters, B., Shevtsov, S., Pesant, S., Clubb, F.J., et al. (2006). Cardiotoxicity of the cancer therapeutic agent imatinib mesylate. *Nat. Med.* 12, 908–916.
- Kim, H., Rafiuddin-Shah, M., Tu, H.-C., Jeffers, J.R., Zambetti, G.P., Hsieh, J.J.-D., and Cheng, E.H.-Y. (2006). Hierarchical regulation of mitochondrion-dependent apoptosis by BCL-2 subfamilies. *Nat. Cell Biol.* 8, 1348–1358.
- Kim, J.H., Chu, S.C., Gramlich, J.L., Pride, Y.B., Babendreier, E., Chauhan, D., Salgia, R., Podar, K., Griffin, J.D., and Sattler, M. (2005). Activation of the PI3K/mTOR pathway by BCR-ABL contributes to increased production of reactive oxygen species. *Blood* 105, 1717–1723.
- 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. *Nat. Biotechnol.* 31, 71–75.
- Kochenderfer, J.N., Wilson, W.H., Janik, J.E., Dudley, M.E., Stetler-Stevenson, M., Feldman, S.A., Maric, I., Raffeld, M., Nathan, D.-A.N., Lanier, B.J., et al. (2010). Eradication of B-lineage cells and regression of lymphoma in a patient treated with autologous T cells genetically engineered to recognize CD19. *Blood* 116, 4099–4102.
- Kolb, H.J., Mittermüller, J., Clemm, C., Holler, E., Ledderose, G., Brehm, G., Heim, M., and Wilmanns, W. (1990). Donor leukocyte transfusions for treatment of recurrent chronic myelogenous leukemia in marrow transplant patients. *Blood* 76, 2462–2465.
- Koneru, M., O'Cearbhaill, R., Pendharkar, S., Spriggs, D.R., and Brentjens, R.J. (2015). 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. *J. Transl. Med.* 13, 102.

Koren-Michowitz, M., Buzaglo, Z., Ribakovsky, E., Schwarz, M., Pessach, I., Shimoni, A., Beider, K., Amariglio, N., le Coutre, P., and Nagler, A. (2014). OCT1 genetic variants are associated with long term outcomes in imatinib treated chronic myeloid leukemia patients. *Eur. J. Haematol.* *92*, 283–288.

Krause, D.S., Fackler, M.J., Civin, C.I., and May, W.S. (1996). CD34: structure, biology, and clinical utility [see comments]. *Blood* *87*, 1–13.

Kroemer, M., Turco, C., Galaine, J., Deschamps, M., Limat, S., and Borg, C. (2015). Nouvelles approches d'immunothérapie en onco-hématologie. *Transfus. Clin. Biol.* *22*, 132–140.

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 Lond. Engl.* *385*, 517–528.

Levescot, A., Flamant, S., Basbous, S., Jacomet, F., Féraud, O., Anne Bourgeois, E., Bonnet, M.-L., Giraud, C., Roy, L., Barra, A., et al. (2014). BCR-ABL-induced deregulation of the IL-33/ST2 pathway in CD34+ progenitors from chronic myeloid leukemia patients. *Cancer Res.* *74*, 2669–2676.

Lipowska-Bhalla, G., Gilham, D.E., Hawkins, R.E., and Rothwell, D.G. (2012). Targeted immunotherapy of cancer with CAR T cells: achievements and challenges. *Cancer Immunol. Immunother. CII* *61*, 953–962.

Liu, X., Jiang, S., Fang, C., Yang, S., Olalere, D., Pequignot, E.C., Cogdill, A.P., Li, N., Ramones, M., Granda, B., et al. (2015a). Affinity-Tuned ErbB2 or EGFR Chimeric Antigen Receptor T Cells Exhibit an Increased Therapeutic Index against Tumors in Mice. *Cancer Res.* *75*, 3596–3607.

Liu, X., Jiang, S., Fang, C., Yang, S., Olalere, D., Pequignot, E.C., Cogdill, A.P., Li, N., Ramones, M., Granda, B., et al. (2015b). Affinity-Tuned ErbB2 or EGFR Chimeric Antigen Receptor T Cells Exhibit an Increased Therapeutic Index against Tumors in Mice. *Cancer Res.* *75*, 3596–3607.

Long, A.H., Haso, W.M., Shern, J.F., Wanhainen, K.M., Murgai, M., Ingaramo, M., Smith, J.P., Walker, A.J., Kohler, M.E., Venkateshwara, V.R., et al. (2015). 4-1BB costimulation ameliorates T cell exhaustion induced by tonic signaling of chimeric antigen receptors. *Nat. Med.* *21*, 581–590.

Louis, C.U., Savoldo, B., Dotti, G., Pule, M., Yvon, E., Myers, G.D., Rossig, C., Russell, H.V., Diouf, O., Liu, E., et al. (2011). Antitumor activity and long-term fate of chimeric antigen receptor-positive T cells in patients with neuroblastoma. *Blood* *118*, 6050–6056.

Ma, J.S.Y., Kim, J.Y., Kazane, S.A., Choi, S.-H., Yun, H.Y., Kim, M.S., Rodgers, D.T., Pugh, H.M., Singer, O., Sun, S.B., et al. (2016). Versatile strategy for controlling the specificity and activity of engineered T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *113*, E450-458.

Mahon, F.-X., Réa, D., Guilhot, J., Guilhot, F., Huguet, F., Nicolini, F., Legros, L., Charbonnier, A., Guerci, A., Varet, B., et al. (2010a). Discontinuation of imatinib in patients with chronic myeloid leukaemia who have maintained complete molecular remission for at least 2 years: the prospective, multicentre Stop Imatinib (STIM) trial. *Lancet Oncol.* *11*, 1029–1035.

Mahon, F.-X., Réa, D., Guilhot, J., Guilhot, F., Huguet, F., Nicolini, F., Legros, L., Charbonnier, A., Guerci, A., Varet, B., et al. (2010b). Discontinuation of imatinib in patients with chronic myeloid leukaemia who have maintained complete molecular remission for at least 2 years: the prospective, multicentre Stop Imatinib (STIM) trial. *Lancet Oncol.* *11*, 1029–1035.

- 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. *N. Engl. J. Med.* *371*, 1507–1517.
- Melo, J.V. (1996). The molecular biology of chronic myeloid leukaemia. *Leukemia* *10*, 751–756.
- Michaud, N., Al-Akoum, M., and Akoum, A. (2014). Blood soluble interleukin 1 receptor accessory protein levels are consistently low throughout the menstrual cycle of women with endometriosis. *Reprod. Biol. Endocrinol. RBE* *12*, 51.
- Mock, U., Nickolay, L., Philip, B., Cheung, G.W.-K., Zhan, H., Johnston, I.C.D., Kaiser, A.D., Peggs, K., Pule, M., Thrasher, A.J., et al. (2016). Automated manufacturing of chimeric antigen receptor T cells for adoptive immunotherapy using CliniMACS prodigy. *Cytotherapy* *18*, 1002–1011.
- Müller, M.C., Cortes, J.E., Kim, D.-W., Druker, B.J., Erben, P., Pasquini, R., Branford, S., Hughes, T.P., Radich, J.P., Ploughman, L., et al. (2009). Dasatinib treatment of chronic-phase chronic myeloid leukemia: analysis of responses according to preexisting BCR-ABL mutations. *Blood* *114*, 4944–4953.
- Naldini, L., Blömer, U., Gallay, P., Ory, D., Mulligan, R., Gage, F.H., Verma, I.M., and Trono, D. (1996). In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science* *272*, 263–267.
- Newick, K., O'Brien, S., Moon, E., and Albelda, S.M. (2017). CAR T Cell Therapy for Solid Tumors. *Annu. Rev. Med.* *68*, 139–152.
- Nievergall, E., Ramshaw, H.S., Yong, A.S.M., Biondo, M., Busfield, S.J., Vairo, G., Lopez, A.F., Hughes, T.P., White, D.L., and Hiwase, D.K. (2014). Monoclonal antibody targeting of IL-3 receptor  $\alpha$  with CSL362 effectively depletes CML progenitor and stem cells. *Blood* *123*, 1218–1228.
- Nowell, P.C., and Hungerford, D.A. (1960). Chromosome studies on normal and leukemic human leukocytes. *J. Natl. Cancer Inst.* *25*, 85–109.
- O'Brien, S.G., Guilhot, F., Larson, R.A., Gathmann, I., Baccarani, M., Cervantes, F., Cornelissen, J.J., Fischer, T., Hochhaus, A., Hughes, T., et al. (2003). Imatinib compared with interferon and low-dose cytarabine for newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia. *N. Engl. J. Med.* *348*, 994–1004.
- O'Hare, T., Zabriskie, M.S., Eiring, A.M., and Deininger, M.W. (2012). Pushing the limits of targeted therapy in chronic myeloid leukaemia. *Nat. Rev. Cancer* *12*, 513–526.
- Ow, Y.-L.P., Green, D.R., Hao, Z., and Mak, T.W. (2008). Cytochrome c: functions beyond respiration. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *9*, 532–542.
- Pagès, G., Lenormand, P., L'Allemain, G., Chambard, J.C., Meloche, S., and Pouyssegur, J. (1993). Mitogen-activated protein kinases p42mapk and p44mapk are required for fibroblast proliferation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *90*, 8319–8323.
- Pawelec, G. (2017). Immune correlates of clinical outcome in melanoma. *Immunology*.
- 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 Res.* *75*, 3853–3864.

Pulè, M.A., Straathof, K.C., Dotti, G., Heslop, H.E., Rooney, C.M., and Brenner, M.K. (2005). A chimeric T cell antigen receptor that augments cytokine release and supports clonal expansion of primary human T cells. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* 12, 933–941.

Qasim, W., Zhan, H., Samarasinghe, S., Adams, S., Amrolia, P., Stafford, S., Butler, K., Rivat, C., Wright, G., Somana, K., et al. (2017). Molecular remission of infant B-ALL after infusion of universal TALEN gene-edited CAR T cells. *Sci. Transl. Med.* 9.

Radich, J.P. (2007). The Biology of CML blast crisis. *Hematol. Am. Soc. Hematol. Educ. Program* 384–391.

Raitano, A.B., Halpern, J.R., Hambuch, T.M., and Sawyers, C.L. (1995). The Bcr-Abl leukemia oncogene activates Jun kinase and requires Jun for transformation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92, 11746–11750.

Ramos, C.A., Savoldo, B., Torrano, V., Ballard, B., Zhang, H., Dakhova, O., Liu, E., Carrum, G., Kamble, R.T., Gee, A.P., et al. (2016). Clinical responses with T lymphocytes targeting malignancy-associated κ light chains. *J. Clin. Invest.* 126, 2588–2596.

Reddy, E.P., and Aggarwal, A.K. (2012). The ins and outs of bcr-abl inhibition. *Genes Cancer* 3, 447–454.

Reuther, J.Y., Reuther, G.W., Cortez, D., Pendergast, A.M., and Baldwin, A.S. (1998). A requirement for NF-κappaB activation in Bcr-Abl-mediated transformation. *Genes Dev.* 12, 968–981.

Riddell, S.R., Elliott, M., Lewinsohn, D.A., Gilbert, M.J., Wilson, L., Manley, S.A., Lupton, S.D., Overell, R.W., Reynolds, T.C., Corey, L., et al. (1996). T-cell mediated rejection of gene-modified HIV-specific cytotoxic T lymphocytes in HIV-infected patients. *Nat. Med.* 2, 216–223.

Rodgers, D.T., Mazagova, M., Hampton, E.N., Cao, Y., Ramadoss, N.S., Hardy, I.R., Schulman, A., Du, J., Wang, F., Singer, O., et al. (2016). Switch-mediated activation and retargeting of CAR-T cells for B-cell malignancies. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 113, E459-468.

Rohrbacher, M., and Hasford, J. (2009). Epidemiology of chronic myeloid leukaemia (CML). *Best Pract. Res. Clin. Haematol.* 22, 295–302.

Romeo, C., Amiot, M., and Seed, B. (1992). Sequence requirements for induction of cytolysis by the T cell antigen/Fc receptor zeta chain. *Cell* 68, 889–897.

Ross, D.M., Branford, S., Seymour, J.F., Schwarzer, A.P., Arthur, C., Yeung, D.T., Dang, P., Goyne, J.M., Slader, C., Filshie, R.J., et al. (2013a). Safety and efficacy of imatinib cessation for CML patients with stable undetectable minimal residual disease: results from the TWISTER study. *Blood* 122, 515–522.

Ross, D.M., Branford, S., Seymour, J.F., Schwarzer, A.P., Arthur, C., Yeung, D.T., Dang, P., Goyne, J.M., Slader, C., Filshie, R.J., et al. (2013b). Safety and efficacy of imatinib cessation for CML patients with stable undetectable minimal residual disease: results from the TWISTER study. *Blood* 122, 515–522.

Rossignol, A., Levescot, A., Jacomet, F., Robin, A., Basbous, S., Giraud, C., Roy, L., Guilhot, F., Turhan, A.G., Barra, A., et al. (2012). Evidence for BCR-ABL-dependent dysfunctions of iNKT cells from chronic myeloid leukemia patients. *Eur. J. Immunol.* 42, 1870–1875.

- Rousselot, P., Huguët, F., Rea, D., Legros, L., Cayuela, J.M., Maarek, O., Blanchet, O., Marit, G., Gluckman, E., Reiffers, J., et al. (2007). Imatinib mesylate discontinuation in patients with chronic myelogenous leukemia in complete molecular remission for more than 2 years. *Blood* *109*, 58–60.
- Rowley, J.D. (1973). Letter: A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. *Nature* *243*, 290–293.
- Roy, I. (2001). Ethical considerations in the use of lentiviral vectors for genetic transfer. *Somat. Cell Mol. Genet.* *26*, 175–191.
- Sadelain, M. (2015). CAR therapy: the CD19 paradigm. *J. Clin. Invest.* *125*, 3392–3400.
- Sadelain, M., Papapetrou, E.P., and Bushman, F.D. (2011). Safe harbours for the integration of new DNA in the human genome. *Nat. Rev. Cancer* *12*, 51–58.
- Saglio, G., Kim, D.-W., Issaragrisil, S., le Coutre, P., Etienne, G., Lobo, C., Pasquini, R., Clark, R.E., Hochhaus, A., Hughes, T.P., et al. (2010). Nilotinib versus imatinib for newly diagnosed chronic myeloid leukemia. *N. Engl. J. Med.* *362*, 2251–2259.
- 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.
- Sell, S. (2017). Cancer immunotherapy: Breakthrough or “deja vu, all over again”? *Tumour Biol. J. Int. Soc. Oncodevelopmental Biol. Med.* *39*, 1010428317707764.
- Sha, H.-H., Wang, D.-D., Yan, D.-L., Hu, Y., Yang, S.-J., Liu, S.-W., and Feng, J.-F. (2017). Chimaeric antigen receptor T-cell therapy for tumour immunotherapy. *Biosci. Rep.* *37*.
- Sharma, P., and Kranz, D.M. (2016). Recent advances in T-cell engineering for use in immunotherapy. *F1000Research* *5*, 2344.
- Sharpe, A.H., and Freeman, G.J. (2002). The B7-CD28 superfamily. *Nat. Rev. Immunol.* *2*, 116–126.
- Silver, R.T., Woolf, S.H., Hehlmann, R., Appelbaum, F.R., Anderson, J., Bennett, C., Goldman, J.M., Guilhot, F., Kantarjian, H.M., Lichtin, A.E., et al. (1999). An evidence-based analysis of the effect of busulfan, hydroxyurea, interferon, and allogeneic bone marrow transplantation in treating the chronic phase of chronic myeloid leukemia: developed for the American Society of Hematology. *Blood* *94*, 1517–1536.
- Smith, D.E., Hanna, R., Della Friend, null, Moore, H., Chen, H., Farese, A.M., MacVittie, T.J., Virca, G.D., and Sims, J.E. (2003). The soluble form of IL-1 receptor accessory protein enhances the ability of soluble type II IL-1 receptor to inhibit IL-1 action. *Immunity* *18*, 87–96.
- Smyth, M.J., Godfrey, D.I., and Trapani, J.A. (2001). A fresh look at tumor immunosurveillance and immunotherapy. *Nat. Immunol.* *2*, 293–299.
- Sommermeier, D., Hill, T., Shamah, S.M., Salter, A.I., Chen, Y., Mohler, K.M., and Riddell, S.R. (2017). Fully human CD19-specific chimeric antigen receptors for T-cell therapy. *Leukemia* *31*, 2191–2199.
- Sorel, N., Cayssials, É., Brizard, F., and Chomel, J.-C. (2017). Treatment and molecular monitoring update in chronic myeloid leukemia management. *Ann. Biol. Clin. (Paris)* *75*, 129–145.

- Soverini, S., De Benedittis, C., Machova Polakova, K., Brouckova, A., Horner, D., Iacono, M., Castagnetti, F., Gugliotta, G., Palandri, F., Papayannidis, C., et al. (2013). Unraveling the complexity of tyrosine kinase inhibitor-resistant populations by ultra-deep sequencing of the BCR-ABL kinase domain. *Blood* *122*, 1634–1648.
- Srivastava, S., and Riddell, S.R. (2015). Engineering CAR-T cells: Design concepts. *Trends Immunol.* *36*, 494–502.
- Steelman, L.S., Pohnert, S.C., Shelton, J.G., Franklin, R.A., Bertrand, F.E., and McCubrey, J.A. (2004). JAK/STAT, Raf/MEK/ERK, PI3K/Akt and BCR-ABL in cell cycle progression and leukemogenesis. *Leukemia* *18*, 189–218.
- van der Stegen, S.J.C., Hamieh, M., and Sadelain, M. (2015). The pharmacology of second-generation chimeric antigen receptors. *Nat. Rev. Drug Discov.* *14*, 499–509.
- Straathof, K.C., Pulè, 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.
- Strome, S.E., Sausville, E.A., and Mann, D. (2007). A mechanistic perspective of monoclonal antibodies in cancer therapy beyond target-related effects. *The Oncologist* *12*, 1084–1095.
- Sun, N., Liang, J., Abil, Z., and Zhao, H. (2012). Optimized TAL effector nucleases (TALENs) for use in treatment of sickle cell disease. *Mol. Biosyst.* *8*, 1255–1263.
- Talpaz, M., McCredie, K.B., Mavligit, G.M., and Gutterman, J.U. (1983). Leukocyte interferon-induced myeloid cyto-reduction in chronic myelogenous leukemia. *Blood* *62*, 689–692.
- Terabe, M., and Berzofsky, J.A. (2004). Immunoregulatory T cells in tumor immunity. *Curr. Opin. Immunol.* *16*, 157–162.
- Terabe, M., Matsui, S., Noben-Trauth, N., Chen, H., Watson, C., Donaldson, D.D., Carbone, D.P., Paul, W.E., and Berzofsky, J.A. (2000). NKT cell-mediated repression of tumor immunosurveillance by IL-13 and the IL-4R-STAT6 pathway. *Nat. Immunol.* *1*, 515–520.
- Turtle, C.J., Hanafi, L.-A., Berger, C., Hudecek, M., Pender, B., Robinson, E., Hawkins, R., Chaney, C., Cherian, S., Chen, X., et al. (2016). Immunotherapy of non-Hodgkin's lymphoma with a defined ratio of CD8+ and CD4+ CD19-specific chimeric antigen receptor-modified T cells. *Sci. Transl. Med.* *8*, 355ra116.
- Vinay, D.S., and Kwon, B.S. (2012). Immunotherapy of cancer with 4-1BB. *Mol. Cancer Ther.* *11*, 1062–1070.
- Walz, C., Ahmed, W., Lazarides, K., Betancur, M., Patel, N., Hennighausen, L., Zaleskas, V.M., and Van Etten, R.A. (2012). Essential role for Stat5a/b in myeloproliferative neoplasms induced by BCR-ABL1 and JAK2(V617F) in mice. *Blood* *119*, 3550–3560.
- Wang, J., Jensen, M., Lin, Y., Sui, X., Chen, E., Lindgren, C.G., Till, B., Raubitschek, A., Forman, S.J., Qian, X., et al. (2007). Optimizing adoptive polyclonal T cell immunotherapy of lymphomas, using a chimeric T cell receptor possessing CD28 and CD137 costimulatory domains. *Hum. Gene Ther.* *18*, 712–725.

- Wang, X., Zeng, J., Shi, M., Zhao, S., Bai, W., Cao, W., Tu, Z., Huang, Z., and Feng, W. (2011). Targeted blockage of signal transducer and activator of transcription 5 signaling pathway with decoy oligodeoxynucleotides suppresses leukemic K562 cell growth. *DNA Cell Biol.* *30*, 71–78.
- Wang, Z., Guo, Y., and Han, W. (2017a). Current status and perspectives of chimeric antigen receptor modified T cells for cancer treatment. *Protein Cell* *8*, 896–925.
- Wang, Z., Guo, Y., and Han, W. (2017b). Current status and perspectives of chimeric antigen receptor modified T cells for cancer treatment. *Protein Cell* *8*, 896–925.
- Wild, J.M., and Krützfeldt, N.O.E. (2010). Neocortical-like organization of avian auditory “cortex”. Commentary on Wang Y, Brzozowska-Prechtl A, Karten HJ (2010): Laminar and columnar auditory cortex in avian brain. *Proc Natl Acad Sci USA* *107*:12676-12681. *Brain. Behav. Evol.* *76*, 89–92.
- Wilkie, S., van Schalkwyk, M.C.I., Hobbs, S., Davies, D.M., van der Stegen, S.J.C., Pereira, A.C.P., Burbridge, S.E., Box, C., Eccles, S.A., and Maher, J. (2012). Dual targeting of ErbB2 and MUC1 in breast cancer using chimeric antigen receptors engineered to provide complementary signaling. *J. Clin. Immunol.* *32*, 1059–1070.
- Willimsky, G., and Blankenstein, T. (2005). Sporadic immunogenic tumours avoid destruction by inducing T-cell tolerance. *Nature* *437*, 141–146.
- Wolchok, J.D., Kluger, H., Callahan, M.K., Postow, M.A., Rizvi, N.A., Lesokhin, A.M., Segal, N.H., Ariyan, C.E., Gordon, R.-A., Reed, K., et al. (2013). Nivolumab plus ipilimumab in advanced melanoma. *N. Engl. J. Med.* *369*, 122–133.
- Wu, M.-R., Zhang, T., Alcon, A., and Sentman, C.L. (2015). DNAM-1-based chimeric antigen receptors enhance T cell effector function and exhibit in vivo efficacy against melanoma. *Cancer Immunol. Immunother.* *CII* *64*, 409–418.
- Yoshimoto, T., Mizoguchi, I., Katagiri, S., Tauchi, T., Furusawa, J.-I., Chiba, Y., Mizuguchi, J., Ohyashiki, J.H., and Ohyashiki, K. (2014). Immunosurveillance markers may predict patients who can discontinue imatinib therapy without relapse. *Oncoimmunology* *3*, e28861.
- You, F., Jiang, L., Zhang, B., Lu, Q., Zhou, Q., Liao, X., Wu, H., Du, K., Zhu, Y., Meng, H., et al. (2016). Phase 1 clinical trial demonstrated that MUC1 positive metastatic seminal vesicle cancer can be effectively eradicated by modified Anti-MUC1 chimeric antigen receptor transduced T cells. *Sci. China Life Sci.* *59*, 386–397.
- Zhang, T., Barber, A., and Sentman, C.L. (2006). Generation of antitumor responses by genetic modification of primary human T cells with a chimeric NKG2D receptor. *Cancer Res.* *66*, 5927–5933.
- 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.



**Annexe**  
**Brevet déposé INPI**

# CASALONGA & ASSOCIÉS

CONSEILS EN PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE  
PATENT & TRADEMARK ATTORNEYS  
8 avenue Percier  
75008 PARIS  
Tél. : 33 (0)1 45 61 94 64  
Fax : 33 (0)1 45 63 94 21  
e-mail : paris@casalonga.com

ETABLISSEMENT FRANÇAIS DU  
SANG  
20 Avenue du Stade de France  
93218 LA PLAINE SAINT DENIS  
CEDEX  
FRANCE

Par Email

**Attn : Madame Kenza BELHAJ**

N/Réf. : B17-4492EP LM/VHA

Paris, le 30 novembre 2017

**EUROPE- Dépôt d'une demande de brevet  
Correspondant à "CAR-T CELLS AND THEIR USE"  
Au nom de ETABLISSEMENT FRANÇAIS DU SANG/INSTITUT NATIONAL DE LA  
SANTÉ ET DE LA RECHERCHE MÉDICALE/CENTRE HOSPITALIER  
UNIVERSITAIRE DE BESANCON/UNIVERSITÉ DE FRANCHE COMTE**

Madame,

Nous avons le plaisir de vous informer qu'une demande de brevet européen a été déposée le **23 novembre 2017** sous le numéro **17306630.9**.

Nous avons différé le paiement de la taxe d'examen qui sera à régler dans un délai de 6 mois à compter de la publication du Rapport de Recherche. Nous ne manquerons pas de vous rappeler cette échéance en temps utile.

Vous trouverez ci-joint copie des documents tels que déposés, ainsi que notre note de débit relative à ce dépôt.

Veuillez agréer, Madame, l'expression de nos sentiments les meilleurs.

Gérald BOUSMANN  
Associé

PARIS - MUNICH - ALICANTE - GRENOBLE - TOULOUSE

WWW.CASALONGA.COM

Liste des associés et collaborateurs sur le site - List of partners and associates on website  
Casalonga & associés - Société par actions simplifiée au capital de 1 172 340 Euros. - RCS : Paris B 502 803 455 - 69102