



**HAL**  
open science

# Identification des acteurs moléculaires impliqués dans la réponse du greffon contre la leucémie (GVL) dans un modèle pré-clinique de Leucémie Aiguë Myéloïde

Chaïma Benaksas

## ► To cite this version:

Chaïma Benaksas. Identification des acteurs moléculaires impliqués dans la réponse du greffon contre la leucémie (GVL) dans un modèle pré-clinique de Leucémie Aiguë Myéloïde. Médecine humaine et pathologie. Université Paris Cité, 2023. Français. NNT : 2023UNIP5033 . tel-04849844

**HAL Id: tel-04849844**

**<https://theses.hal.science/tel-04849844v1>**

Submitted on 19 Dec 2024

**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.

# Université Paris Cité

Ecole doctorale 561 - Hématologie, Oncogénèse et Biothérapies  
Laboratoire "Génomés, biologie cellulaire et thérapeutique" (UMR-S 944)

*Équipe "Mécanismes moléculaires du développement des  
Leucémies Aiguës Myéloïdes"*

## **Identification des acteurs moléculaires impliqués dans la réponse du greffon contre la leucémie (GVL) dans un modèle pré-clinique de Leucémie Aiguë Myéloïde**

Par Chaïma BENAÏSAS

Thèse de doctorat d'Oncogénèse

Dirigée par le Dr Alexandre PUISSANT

Présentée et soutenue publiquement le 4 mai 2023

Devant un jury composé de :

Alexandre PUISSANT, DR, Université Paris Cité, Directeur de Thèse

Marie-Thérèse RUBIO, PU-PH, Université de Lorraine, Rapportrice

Dominique BAUDRY-BLUTEAU, MCF-HDR, EPHE, Rapportrice

Camille LOBRY, DR, Université Paris Cité, Examineur

**Titre :**

Identification des acteurs moléculaires impliqués dans la réponse du greffon contre la leucémie (GVL) dans un modèle préclinique de Leucémie Aigüe Myéloïde.

**Résumé :**

Les Leucémies Aiguës Myéloïdes (LAM) représentent un groupe hétérogène de maladies qui affectent les cellules de la lignée myéloïde. Détournés des voies de maturation, ces blastes s'accumulent dans la moelle osseuse et interfèrent avec l'hématopoïèse normale. On observe alors une diminution de la production de cellules myéloïdes différenciées. L'incidence des LAM augmente fortement avec l'âge, et il y a une grande disparité en termes de réponse thérapeutique et de taux de guérison. Bien que le traitement chimiothérapeutique conduise à une rémission complète des patients, la majorité d'entre eux va progresser vers une LAM récidivante, réfractaire à toute nouvelle tentative chimiothérapeutique : le taux de survie globale des patients ne dépasse alors pas 35%. La prise en charge des LAMs est donc un réel défi de santé publique.

En plus des approches chimiothérapeutiques, la greffe allogénique de moelle osseuse est un traitement curatif majeur pour certains patients. Cette greffe, provenant d'un donneur compatible, permet d'induire une réponse dit « du greffon contre la leucémie » (Graft Versus Leukemia, GVL) : les cellules immunitaires du donneur vont reconnaître et tenter d'éliminer les cellules leucémiques résiduelles du patient. Cet effet repose sur l'action des lymphocytes T du donneur dirigés spécifiquement contre des antigènes mineurs d'histocompatibilité. Cependant, la greffe de moelle osseuse ne permet pas toujours de guérir un patient atteint de leucémie, et les mécanismes mis en jeu dans la réponse GVL sont peu caractérisés. Ainsi, une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires sous-tendant la réponse GVL permettra d'identifier de nouvelles cibles immuno-modulatrices pertinentes dans le traitement des LAM.

Notre étude a ainsi pour but d'identifier et caractériser les acteurs fonctionnels de la réponse anti-leucémique GVL dans un modèle murin leucémique.

Nous avons tout d'abord mis au point un modèle murin de GVL dans les LAMs par injection de blastes leucémiques, suivie d'une injection de lymphocytes T CD8+ MataHari reconnaissant spécifiquement un antigène mineur d'histocompatibilité (miHA) des blastes. Les souris ayant reçu cette double transplantation de blastes et de cellules MataHari survivent significativement plus longtemps que nos souris contrôles sans lymphocytes MataHari: nous avons ainsi validé la présence d'une réponse GVL dans notre modèle préclinique de LAM.

De plus, une approche de séquençage ARN a permis d'identifier que les blastes résistants aux lymphocytes MataHari sur-exprimaient des gènes impliqués dans le métabolisme de l'hème et plus généralement dans la voie érythrocytaire. L'expression augmentée de ces gènes pourrait donc potentiellement conférer un avantage sélectif aux blastes, leur permettant de résister à l'action des lymphocytes MataHari. Au contraire, les voies de signalisation liées à la réponse immunitaire sont moins exprimées chez les blastes résistants, pouvant indiquer qu'ils utilisent un moyen détourné de résister aux lymphocytes par une expression augmentée de la voie érythrocytaire.

La découverte de nouveaux acteurs fonctionnels de la réponse GVL pourrait ainsi permettre de l'optimiser et de développer des approches immuno-modulatrices innovantes pour le traitement des patients atteints de LAM.

**Mots clés :**

GVL, Réaction du greffon contre la leucémie, Leucémie Aigüe Myéloïde, Lymphocytes T, Allogreffe de cellules hématopoïétiques, Analyses fonctionnelles, Modèles murins.

**Title :**

Identification of the molecular actors of the Graft versus Leukemia (GVL) response in a preclinical model of Acute Myeloid Leukemia

**Abstract :**

Acute Myeloid Leukemia (AML) is a heterogeneous group of hematologic malignancies that affect myeloid cells. Diverted from their maturation pathways, these blasts accumulate in the bone marrow and interfere with normal hematopoiesis. As a result, there is a decrease in the production of differentiated myeloid cells. The incidence of AML increases with age, and there is a wide disparity in terms of therapeutic response and recovery rate in patients. Although chemotherapy treatment leads to complete remission in most patients, the majority of them will relapse, with the leukemia being refractory to any further chemotherapeutic attempt: the overall survival rate of patients does not exceed 35%. The management of AML is therefore a real public health challenge.

In addition to chemotherapeutic approaches, allogeneic bone marrow transplantation is a major curative treatment for eligible patients. This transplant, from a compatible donor, induces a "Graft Versus Leukemia" (GVL) response: the donor's immune cells will recognize and attempt to eliminate the patient's residual leukemic cells. This effect relies on the action of donor T cells specifically directed against minor histocompatibility antigens of the tumor. However, bone marrow transplantation does not always cure a patient with leukemia, and the mechanisms involved in the GVL response are poorly characterized. Thus, a better understanding of the molecular mechanisms underlying the GVL response will allow the identification of novel immunomodulatory targets for the treatment of AML.

Therefore, this project aims at identifying and characterizing the functional actors of the anti-leukemic GVL response in a preclinical AML mouse model.

We first developed a GVL mouse model in AML by injection of leukemic blasts, followed by injection of MataHari CD8+ T cells recognizing a specific minor histocompatibility antigen (miHA) from the blasts. Mice that received this double transplantation of blasts and MataHari cells survived significantly longer than our control mice without MataHari lymphocytes: we thus validated the presence of a GVL response in our preclinical AML model.

Moreover, an RNA sequencing approach allowed us to identify that MataHari lymphocyte-resistant blasts over-expressed genes involved in heme metabolism and more generally in the erythroid lineage-related pathways. The increased expression of these genes could therefore potentially confer a selective advantage to blasts, allowing them to resist the action of MataHari lymphocytes. On the contrary, signaling pathways related to the immune response are less expressed in resistant blasts, which may indicate that they use other means to resist lymphocytes through an increased expression of the erythroid pathway.

The discovery of new functional actors of the GVL response could thus allow to optimize it and to develop innovative immunomodulatory approaches for the treatment of AML patients.

**Keywords :**

GVL, Graft versus Leukemia response, Acute Myeloid Leukemia, T lymphocytes, Allogeneic bone marrow transplantation, Functional analyses, Murine models.

---

# Remerciements

---

A mon Directeur de thèse, le Docteur Alexandre Puissant, pour m'avoir accueillie dans ton équipe et formée aux pratiques du laboratoire depuis le Master 2. Je souhaite te remercier pour ton encadrement, pour toutes nos discussions scientifiques ainsi que pour m'avoir fait confiance et permis de travailler sur de nombreuses collaborations.

A la Professeure Marie-Thérèse Rubio, ainsi qu'aux Docteur.e.s Dominique Baudry-Bluteau, Camille Lobry et Alexandre Puissant pour avoir accepté d'évaluer ce travail et participer à mon jury de thèse.

Aux membres de mon Comité de suivi de thèse, les Docteur.e.s David Michonneau, Dominique Baudry-Bluteau, Camille Lobry et Mehdi Khaled pour vos échanges et conseils.

Au Professeur Raphaël Itzykson et au Docteur Matthieu Duchmann, pour tous vos conseils et vos suggestions.

A Mathilde Rieux-Laucat et Nicolas Ayas, qui durant vos stages avec moi avez été d'une aide incroyable. Vos questions et suggestions ont mené à de grandes réflexions sur le projet et m'ont beaucoup apporté. Votre bonne humeur et motivation m'ont permis de passer de très bons moments avec vous et me laissent d'excellents souvenirs. Au plaisir de collaborer à nouveau à l'avenir.

A Emmanuelle Latour et Paul-Arthur Meslin pour la mise en place des analyses bio-informatiques, pour avoir été à l'écoute et avoir accepté d'échanger avec moi à de si nombreuses reprises.

A toutes les personnes de l'équipe Puissant et au delà qui ont activement participé à ce projet: Paolo Ayaka, Giuseppe Di Feo, Nina Fenouille, Gaël Fortin, Duong Ho Nhat, Frank Ling, Kim Pacchiardi, Justine Pasanisi, Bryann Pardieu, Gaetano Sodaro, Camille Vaganay.

A mon amie Khansa Saadallah, pour ta bonne humeur, tes blagues et ton soutien durant les moments difficiles de cette thèse.

A mes parents Ouahiba et Kamel, à mon frère Icham et au reste de ma famille, qui m'ont toujours soutenue durant les 4 années passées dans ce laboratoire. Merci pour vos encouragements, ils ont été très importants pour moi.

A Jugurtha, mon mari, pour avoir toujours été à l'écoute de mes joies et de mes épreuves durant cette thèse. Merci pour ta présence sans faille, pour avoir fêté avec moi les réussites et pour m'avoir inspirée à surmonter les obstacles.



Au bout de la patience, il y a le ciel.

Proverbe wolof (Sénégal)

---

# Sommaire

---

<b>Sommaire</b>	<b>9</b>
<b>Table des figures</b>	<b>11</b>
<b>Liste des principales abréviations</b>	<b>12</b>
<b>Introduction</b>	<b>14</b>
Chapitre 1 : De l'hématopoïèse aux Leucémies Aiguës Myéloïdes	14
I. Généralités sur l'hématopoïèse	14
II. Généralités sur les leucémies	16
III. Les Leucémies Aiguës Myéloïdes	16
1. Généralités	16
2. Epidémiologie	17
3. Classification et pronostic	17
a. Généralités	17
b. Réarrangements MLL	20
4. Diagnostic et signes cliniques	21
5. Traitements	22
a. Induction de la rémission	23
b. Consolidation par chimiothérapie	25
c. Thérapies ciblées	26
d. Risques de rechute et greffe allogénique de moelle osseuse	28
Chapitre 2: Réponse immunitaire	31
I. Généralités sur la réponse immunitaire	31
1. Immunité innée	31
2. Immunité adaptative	33
a. Médiation humorale	34
b. Médiation cellulaire	35
II. Complexe Majeur d'Histocompatibilité	36
1. HLA de classe I	37
2. HLA de classe II	38
3. HLA de classe III	38
4. Présentation d'antigènes HLA-indépendante	38
III. Lymphocytes T CD4, T CD8 et Natural Killers	39
1. Lymphocytes T CD4+ et CD8+	39
a. Origine	39
b. Education	40
c. Récepteurs et co-récepteurs	41
2. Lymphocytes Natural Killers	48
a. Origine	48
b. Éducation, reconnaissance du pathogène et action	49

Chapitre 3: Greffe allogénique et réponse immunitaire anti-tumorale	55
I. Greffe allogénique de moelle osseuse	55
1. Historique et indications	55
2. Paramètres de la greffe allogénique de moelle osseuse	57
a. Validation de l'indication et choix du donneur	58
b. Recueil du greffon	59
c. Conditionnement du patient	61
3. Reconstitution hématologique et immunologique	61
4. Réactions allogéniques post-greffe	63
a. GVHD	63
b. GVL	64
II. Immuno-surveillance et immuno-édition tumorale	66
1. Immuno-surveillance et détection	66
a. Perspectives historiques	66
b. Les acteurs de l'immuno-détection	67
c. Les fonctions effectrices principales de l'immuno-surveillance	68
d. Distinction des cellules transformées vs progéniteurs sains	69
2. Immuno-édition tumorale et échappement	70
a. Immuno-sélection	70
b. Immuno-subversion	72
III. Immunothérapies anti-tumorales et optimisation de la réponse GVL	74
1. Identification de cibles thérapeutiques	74
2. DLI: Donor Lymphocytes Infusion	77
3. Cellules CAR-T	78
4. Cellules NK	81
5. Anticorps recrutant des lymphocytes	82
6. Immunisation spécifique de la leucémie	84
7. Inhibiteurs de points de contrôle immunitaires	85
<b>Objectifs</b>	<b>88</b>
<b>Résultats</b>	<b>90</b>
<b>Discussion</b>	<b>112</b>
Modèles d'étude de la réponse GVL	112
Caractérisation de la fenêtre thérapeutique pour un effet GVL optimal	113
Rôle de la voie érythrocytaire dans la résistance à la GVL	115
Rôle de l'IFN $\gamma$ dans la résistance à la GVL	117
<b>Articles publiés durant la thèse en co-auteur</b>	<b>119</b>
<b>Bibliographie</b>	<b>127</b>

---

## Table des figures

---

Figure 1 : L'hématopoïèse normale et leucémique	15
Figure 2 : La classification WHO (World Health Organization) des leucémies aiguës et néoplasies myéloïdes	18
Figure 3: Le profil de risque déterminé par les anomalies cytogénétiques et moléculaires	19
Figure 4: La prise en charge classique des patients atteints de leucémies aiguës myéloïdes	23
Figure 5: Les différences principales entre lymphocytes B et T	35
Figure 6: La réponse immunitaire innée et adaptative	36
Figure 7: La présentation d'antigènes	39
Figure 8: Le développement et l'éducation des lymphocytes T	41
Figure 9: Le rôle des molécules de co-stimulation dans l'activation des lymphocytes T	43
Figure 10 : La structure du TCR	44
Figure 11 : Les récepteurs CD4 et CD8	47
Figure 12: Le rôle des récepteurs KIR dans la calibration de la réponse NK	49
Figure 13: L'équilibre entre signaux activateurs et inhibiteurs dans la calibration de la réponse des précurseurs NK	50
Figure 14 : Les modèles d'éducation des cellules NK	51
Figure 15: Les mécanismes d'activation des cellules NK face à leurs cibles	53
Figure 16: La répartition des indications d'allogreffe de CH en France en 2021	56
Figure 17 : Schématisation de la procédure de greffe allogénique de moelle osseuse	57
Figure 18: L'évolution du nombre d'allogreffes de CH par type de donneur en France en 2021.	59
Figure 19 : L'activité d'allogreffe de CH par type de donneur et d'origine du greffon en 2021 et son évolution depuis 2009 en France.	60
Figure 20: Le contenu en cellules immunitaires de greffons provenant de moelle osseuse, sang mobilisé ou sang de cordon.	62
Figure 21: Les récepteurs chimériques d'antigènes (CAR)	79

---

## Liste des principales abréviations

---

<b>AZA:</b>	Azacytidine
<b>CLP:</b>	Common Lymphoid Progenitors
<b>CMH:</b>	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
<b>CPA:</b>	Cellule Présentatrice d'Antigènes
<b>CH:</b>	Cellules Hématopoïétiques
<b>CSH:</b>	Cellules Souches Hématopoïétiques
<b>cTEC:</b>	cortical Thymic Epithelial Cell
<b>DAMP:</b>	Damage Associated Molecular Pattern
<b>DC:</b>	Dendritic cell
<b>DNMT3A:</b>	DNA Methyltransferase 3 Alpha
<b>DOT1L:</b>	DOT1 Like Histone Lysine Methyltransferase
<b>FLT3:</b>	Fms Like Tyrosine kinase 3
<b>GM-CSF:</b>	Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor
<b>GMP:</b>	Granulo-Monocyte Progenitors
<b>GVHD:</b>	Graft versus host disease
<b>GVL:</b>	Graft versus Leukemia
<b>HLA:</b>	Human Leukocyte Antigen
<b>HOXA9:</b>	Homeobox A9
<b>Ig:</b>	Immunoglobulin
<b>LAM:</b>	Leucémies Aiguës Myéloïdes

<b>LB:</b>	Lymphocyte B
<b>LIC:</b>	Leukemia Initiating Cell
<b>LT:</b>	Lymphocyte T
<b>MEP:</b>	Megakaryocytes-Erythroid Progenitors
<b>MH:</b>	MataHari
<b>MLL-AF9:</b>	Mixed Lineage Leukemia - ALL1-Fused Gene From Chromosome 9
<b>MPP:</b>	Multi-Potent Progenitor
<b>mTEC:</b>	medullary-Thymic Endothelial Cell
<b>OT-I:</b>	Ovalbumin-specific TCR
<b>PAMP:</b>	Pathogen Associated Molecular Pattern
<b>PRR:</b>	Pathogen Recognition Receptor
<b>RAG-1/2:</b>	Recombination Associated Gene 1/2
<b>RC:</b>	Rémission complète
<b>RNAseq:</b>	RNA sequencing
<b>shRNA:</b>	Short Hairpin RiboNucleic Acid
<b>TCR:</b>	T-Cell Receptor

---

# Introduction

---

## Chapitre 1 : De l'hématopoïèse aux Leucémies Aiguës Myéloïdes

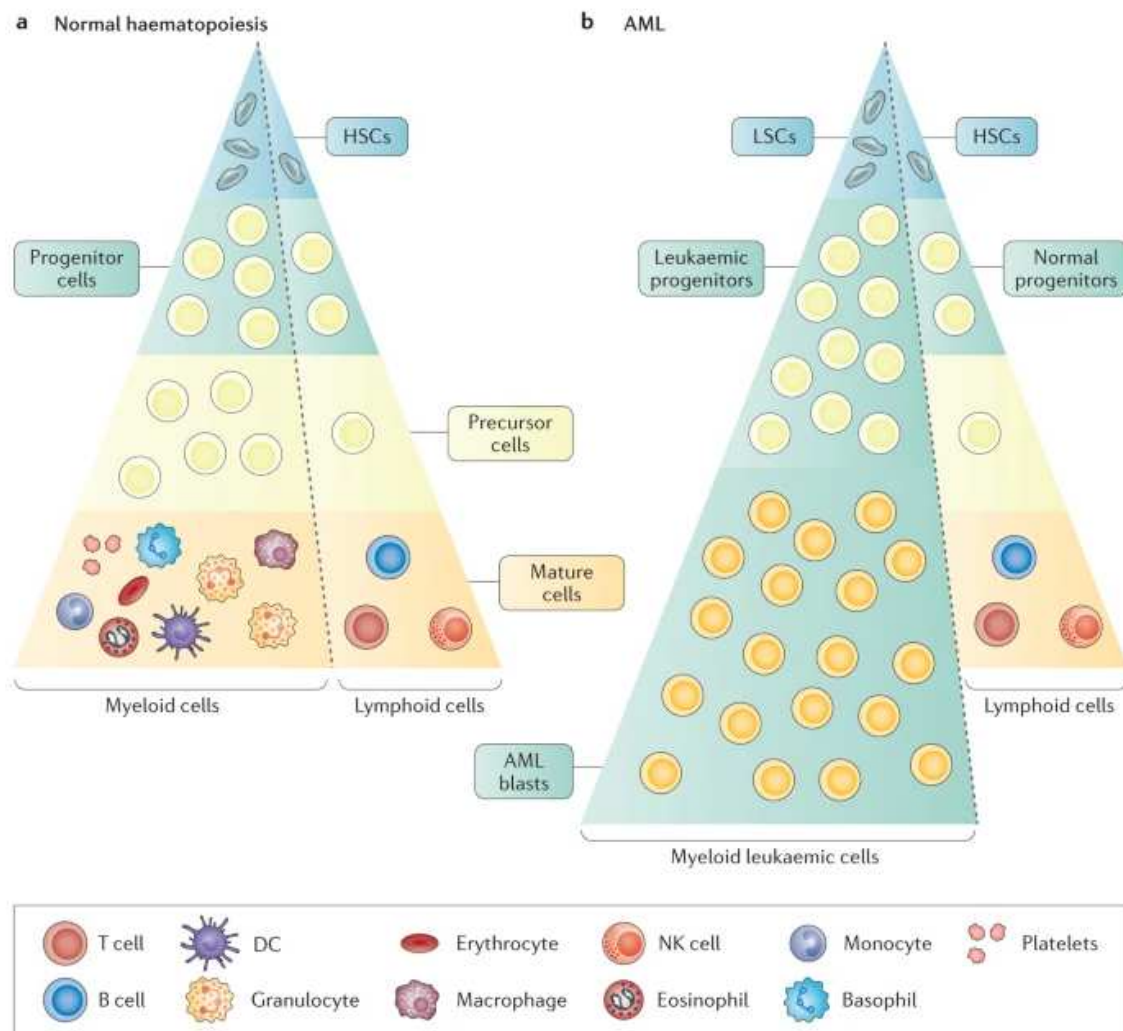
### I. Généralités sur l'hématopoïèse

L'hématopoïèse est le processus par lequel toutes les cellules sanguines sont produites. Au sommet de la hiérarchie se trouvent généralement les cellules souches hématopoïétiques, capables de s'auto-renouveler en gardant toutes leurs propriétés, mais aussi de se différencier pour donner naissance à des progéniteurs multipotents de deux types différents: myéloïdes ou lymphoïdes. Ces derniers permettront d'obtenir des lymphocytes (T, B ou Natural Killer), alors que les progéniteurs myéloïdes pourront se différencier en monocytes, plaquettes, granulocytes et érythrocytes. Les cellules myéloïdes représentent la très grande majorité des cellules sanguines (**Figure 1a**).

Ces cellules sont produites en continu. Chacun des types cellulaires produit a une fonction précise, avec par exemple les plaquettes qui sont impliquées dans la coagulation. Ces fonctions dépendent en très grande partie de combinaisons de marqueurs présents à la surface des cellules et qui leur permettent d'interagir avec leur environnement. La reconnaissance de chaque type cellulaire peut ainsi se faire grâce à une combinaison de marqueurs qui lui est propre. Des anticorps monoclonaux couplés à des fluorochromes et ciblant ces marqueurs de surface permettent de visualiser ces cellules en cytométrie en flux, afin de faciliter leur étude.

Bien que la hiérarchie des cellules hématopoïétiques soit encore souvent décrite comme pyramidale, ce modèle est désormais débattu au profit d'une organisation plus fluide sous forme d'un continuum. Il a ainsi été montré que les cellules souches hématopoïétiques n'étaient pas toutes identiques, et que certaines pouvaient directement se différencier en cellules matures tout en conservant leur propriété pluripotente jusqu'à un moment avancé de leur différenciation. Toutes les techniques

de traçage de lignage en cellule unique, entre autres grâce aux marqueurs de surface, ont été primordiales pour mettre à jour ce nouveau paradigme.



**Figure 1 : L'hématopoïèse normale et leucémique**

(A) Lors de l'hématopoïèse normale, des cellules souches hématopoïétiques (CSH, HSC), peuvent maintenir leurs capacités souches tout en donnant naissance à des cellules progénitrices qui se différencient en cellules lymphoïdes ou myéloïdes. Cette hiérarchie linéaire est cependant remise en question, puisque différentes études suggèrent une organisation fluide. (B) Dans le cas des leucémies aiguës myéloïdes (LAM, AML), des cellules souches leucémiques (LIC, leukemia initiating cells) sont à la tête de la hiérarchie. Tout comme les CSH, elles peuvent se différencier en progéniteurs, qui aboutissent ici à une différenciation en blastes leucémiques. Dans les LAM, l'hématopoïèse normale est perturbée et la majeure partie des cellules hématopoïétiques présentes chez le patient sont alors des blastes leucémiques. (A. Khwaja et al., 2016 (1))



## II. Généralités sur les leucémies

Au cours de la vie des cellules hématopoïétiques, des variations ou mutations peuvent apparaître au niveau du génome, conférant aux cellules désormais transformées un avantage sélectif. Ces mutations peuvent apparaître à tous les niveaux de la différenciation voire même se cumuler au cours du temps. Les cellules transformées peuvent ainsi acquérir un avantage prolifératif et/ou un blocage de leur capacité à se différencier afin d'envahir la moelle osseuse du patient, et s'infiltrer via son sang vers des organes périphériques (**Figure 1b**). Ce phénomène empêche la production de cellules sanguines spécialisées, ce qui est extrêmement délétère pour le patient et conduit à des symptômes tels qu'une anémie sévère et des essoufflements par manque de globules rouges, des saignements excessifs par manque de plaquettes ou encore une augmentation des risques d'infection par manque de cellules immunitaires différenciées.

Chaque année, environ 9000 nouveaux cas de leucémies sont diagnostiqués en France et ce nombre est en augmentation constante. Différents types de leucémies existent en fonction du lignage hématopoïétique affecté. Une dérégulation des fonctions du lignage lymphoïde donnera naissance à une Leucémie Lymphoïde et une prolifération aberrante des progéniteurs lymphocytaires, alors qu'une dérégulation du compartiment myéloïde aboutira à une Leucémie Myéloïde. De plus, le taux de prolifération des cellules leucémiques, appelées blastes, ainsi que la rapidité d'apparition des symptômes chez le patient nous renseignent sur le caractère chronique ou aiguë de la maladie. Dans cette étude, nous allons nous concentrer sur le cas des Leucémies Aiguës Myéloïdes.

## III. Les Leucémies Aiguës Myéloïdes

### 1. Généralités

Les Leucémies Aiguës Myéloïdes (LAM) sont un néoplasme de la lignée myéloïde. Ces hémopathies malignes, dont l'évolution peut être très rapide, proviennent de cellules progénitrices myéloïdes bloquées dans leur différenciation et ayant acquis des mutations leur conférant une prolifération clonale incontrôlée. Ce phénomène

empêche ainsi la production de cellules myéloïdes spécialisées, puisque les clones blastiques envahissent toute la moelle osseuse puis le sang du patient, ainsi que d'autres tissus éventuellement comme la rate. Les blastes leucémiques ont une hiérarchisation parallèle à celle des cellules hématopoïétiques, schématisée par des cellules souches leucémiques à l'apex, pouvant s'auto-renouveler ou se différencier en progéniteurs leucémiques. Ces cellules sont capables de générer le corps de la leucémie, les blastes, qui sont les cellules les plus nombreuses de la maladie. Les progéniteurs leucémiques peuvent être bloqués à différents stades de différenciation myéloïdes, du stades de progéniteur myéloïde multipotent (MPP), au stade de progéniteur granulo-monocytaire (GMP), ou érythro-mégacaryocytaire (MEP).

## 2. Epidémiologie

Les LAM sont le sous-type de leucémie le plus commun chez l'adulte, avec une proportion d'environ 80% des leucémies et un âge moyen au diagnostic de 68 ans (2). Ces leucémies peuvent toutefois survenir chez l'enfant, avec un taux de survie extrêmement faible. Tout âge confondu, les LAM présentent une médiane de survie parmi les plus faibles avec seulement 24% de survie à 5 ans, bien après les leucémies myéloïdes chroniques ou le cancer du sein, par exemple (3). Le taux d'incidence est plus élevé chez les hommes que chez les femmes, et depuis 1990 on note une augmentation constante d'1.2% par an.

## 3. Classification et pronostic

### a. Généralités

Historiquement, la WHO (World Health Organization) est l'entité principale déterminant la classification des LAM. Différentes éditions ont été publiées à ce jour, incluant à chaque fois les dernières connaissances apportées par la recherche. Les 1ère et 2ème éditions ont été principalement basées sur la morphologie des cellules leucémiques et leur immunophénotypage. La 3ème édition a proposé une classification différente, incluant pour la première fois le type d'anomalies génétiques dans l'analyse. Aujourd'hui, la version révisée de la 4ème édition publiée en 2017 tient lieu de classification principale. Grâce aux dernières avancées en génomique et en particulier au séquençage en cellule unique, cette nouvelle classification définit 6 catégories: 1)

LAM avec anomalies génétiques récurrentes, 2) LAM avec modifications de type myélodysplasique, 3) néoplasies myéloïdes liées à un traitement, 4) LAM sans autres caractéristiques, 5) sarcomes myéloïdes, et 6) les proliférations de cellules myéloïdes liées au syndrome de Down (Trisomie 21, (4)) (Figure 2).

<b>WHO classification of AML and related neoplasms</b>
(1) Acute myeloid leukemia (AML) and related neoplasms
AML with recurrent genetic abnormalities
AML with t(8;21)(q22q22.1); <i>RUNX1-RUNX1T1</i>
AML with inv(16)(p13.1q22) or t(16;16)(p13.1;q22); <i>CBFB-MYH11</i>
APL with <i>PML-RARA</i>
AML with t(9;11)(p21.3;q23.3); <i>KMT2A-MLLT3</i>
AML with t(6;9)(p23;q34.1); <i>DEK-NUP214</i>
AML with inv(3)(q21.3q26.2) or t(3;3)(q21.3;q26.2); <i>GATA2, MECOM</i>
AML (megakaryoblastic) with t(1;22)(p13.3;q13.1); <i>RBM15-MKL1</i>
Provisional entity: AML with <i>BCR-ABL1</i>
AML with mutated <i>NPM1</i>
AML with biallelic mutation of <i>CEBPA</i>
Provisional entity: AML with mutated <i>RUNX1</i>
(2) AML with myelodysplasia-related changes
(3) Therapy-related myeloid neoplasms
(4) AML, not otherwise specified (NOS)
AML with minimal differentiation
AML without maturation
AML with maturation
Acute myelomonocytic leukemia
Acute monoblastic and monocytic leukemia
Pure erythroid leukemia
Acute megakaryoblastic leukemia
Acute basophilic leukemia
Acute panmyelosis with myelofibrosis
(5) Myeloid sarcoma
(6) Myeloid proliferations associated with Down syndrome
Transient abnormal myelopoiesis (TAM) associated with Down syndrome
Myeloid leukemia associated with Down syndrome

**Figure 2 : La classification WHO (World Health Organization) des leucémies aiguës et néoplasies myéloïdes**

(Adapté de Hwang SM., 2020,(4), (1))

En clinique, une autre classification très utilisée permet de classer les LAM en 3 groupes de risque pronostique: favorable, intermédiaire ou défavorable. Cette classification se fait en fonction des mutations et associations de mutations que le patient présente. Ainsi, une étude centrale a montré que chez les patients de moins de

55 ans, la survie à 5 ans était estimée à 55%. Cependant, en classant les patients selon les groupes de risque favorable, intermédiaire ou défavorable ces valeurs passent respectivement à 64%, 41%, et 11% (5). Cette classification permet donc de prédire la survie et la réponse aux traitements chimiothérapeutiques standards des patients atteints de LAM, et ainsi d'adapter au mieux leur prise en charge. (Figure 3)

<b>Favorable</b>	t(8;21)(q22;q22); RUNX1-RUNX1T1;
	inv(16)(p13.1q22) or t(16;16)(p13.1;q22); CBFβ-MYH11
	Mutated NPM1 without FLT3-ITD
	Biallelic mutated CEBPA
<b>Intermediate</b>	Mutated NPM1 with FLT3-ITD
	Wild-type NPM1 with FLT3-ITD
	t(9;11)(p21.3;q23.3)MLL3-KMT2A
	Cytogenetic abnormalities not classified as favorable or adverse
<b>Adverse</b>	t(6;9)(p23.3;q34.1)/DEK::NUP214
	t(v;11q23.3)/KMT2A-rearranged
	t(9;22)(q34.1;q11.2)/BCR::ABL1
	t(8;16)(p11.2;p13.3)/KAT6A::CREBBP
	inv(3)(q21.3q26.2) or t(3;3)(q21.3;q26.2)/ GATA2, MECOM(EVI1)
	t(3q26.2;v)/MECOM(EVI1)-rearranged
	-5 or del(5q); -7; -17/abn(17p)
	Complex karyotype, monosomal karyotype
	Mutated ASXL1, BCOR, EZH2, RUNX1, SF3B1, SRSF2, STAG2, U2AF1, and/or ZRSR2
	Mutated TP53a

**Figure 3: Le profil de risque déterminé par les anomalies cytogénétiques et moléculaires**

Les leucémies aiguës et néoplasies myéloïdes sont classées en trois catégories de risque en fonction de facteurs cytogénétiques et moléculaires: favorable, intermédiaire, ou défavorable (adverse). (Adapté de A. Pelcovits et al., 2020, (6))

## b. Réarrangements *MLL*

Parmi les mutations à facteur de risque défavorable, un sous-type se distingue: les translocations impliquant le gène *KMT2A*, autrement appelé *MLL* (Mixed-Lineage Leukemia). Ce gène code pour l'histone méthyltransférase *KMT2A* (Histone-lysine N-methyltransferase 2A) impliquée dans le maintien épigénétique de la mémoire transcriptionnelle. Les translocations impliquant ce gène entraînent l'expression de marqueurs myéloïdes et lymphoïdes, et peuvent résulter en une LAM ou LAL respectivement. Les translocations impliquant le gène *MLL* représentent environ 10% des LAM tous âges confondus (7). Il a été montré que *MLL* est impliqué dans la différenciation des cellules hématopoïétiques, et que les translocations aberrantes qui le touchent induisent la fusion en phase du N-terminal de *MLL* avec différents partenaires. Cette translocation induit alors le recrutement d'autres facteurs qui permettent une transformation vers une leucémie très agressive. Plus de 80 partenaires de fusion différents ont été identifiés, avec les fusions principales qui peuvent être classées en deux catégories. La première catégorie comprend les translocations liant *MLL* à des protéines nucléaires capables de former des grands complexes régulant la transcription, alors que la seconde catégorie est composée de protéines cytoplasmiques qui facilitent l'homodimérisation des protéines *MLL* tronquées. Les protéines nucléaires représentent la majeure partie des fusions *MLL*, avec des protéines telles que AF9, AF10, ELL ou encore ENL qui représentent respectivement 29%, 15%, 11% et 4% des translocations *MLL*. Ces protéines peuvent former des complexes participant au recrutement d'autres protéines telles que la méthyltransférase DOT1L (complexe DOT1L composé de DOT1L, AF9, AF10, AF17 et ENL), capable de méthyler l'histone H3K79 au niveau des gènes cibles des translocations *MLL*(8-10). Cette hyperméthylation induit une activation transcriptionnelle aberrante de gènes tels qu'*HOXA9*. La surexpression de protéines telles qu'*HOXA9* (Homeobox protein 9) confère aux cellules un taux de prolifération plus élevé ainsi qu'un plus faible taux de différenciation, des éléments favorables au développement d'une LAM.

Le premier modèle murin de LAM portant une mutation de *MLL* est le modèle *MLL-AF9*, où le gène *AF9* (ALL1-Fused Gene From Chromosome 9 Protein) est transloqué au locus *MLL* par recombinaison homologue. Les souris portant la

translocation MLL-AF9, autrement connue sous le nom t(9;11)(p22;q23), sont obtenues après transduction rétrovirale de cellules GMP, et injection à des souris receveuses syngéniques. Elles développent alors une leucémie aiguë myéloïde très agressive et remarquablement similaire à celle des patients portant la même mutation (11), avec un taux de survie extrêmement faible d'environ 14 jours après injection des blastes.

#### 4. Diagnostic et signes cliniques

Les LAM peuvent être diagnostiquées par prise de sang suivie d'un hémogramme, examen permettant l'évaluation de la numération de la formule sanguine. En effet, on évalue de manière précise la quantité ainsi que la qualité des différents types cellulaires sanguins. Cet examen permet donc de mettre en évidence une proportion anormale d'un type cellulaire, comme un excès de cellules indifférenciées ou une baisse drastique de la quantité de globules rouges dans le cas des LAMs. Ainsi, environ 18% des patients atteints de LAM présentent un excès de globules blancs appelé hyperleucocytose, détectable lors d'un hémogramme.

Si une anomalie est détectée et qu'une leucémie est suspectée, l'hémogramme peut être complété par une analyse de la moelle osseuse: un myélogramme. Cette analyse complémentaire permet d'avoir des informations plus précises en mesurant directement dans la moelle osseuse l'étendue de l'envahissement par les blastes (charge blastique) ainsi que la diminution des lignées hématopoïétiques normales, et d'observer la morphologie des cellules afin de poser un diagnostic fiable sur le type exact de leucémie.

Les signes cliniques observés chez les patients sont étroitement liés à la numération sanguine, et plus précisément au degré de développement de la maladie dans la moelle et le sang. Les symptômes causés par un nombre trop faible de cellules sanguines différenciées (cytopénie) sont:

- **Anémie** (Fatigue intense, froid, maux de tête, vertiges, pâleur, essoufflement) associée à un manque de globules rouges transporteurs d'oxygène.
- **Infections** récurrentes (fièvre) associées à un manque de globules blancs (leucopénie) et en particuliers de neutrophiles (neutropénie).

- Troubles de la **coagulation** (bleus, saignements excessifs du nez, des gencives ou lors de coupures, règles excessivement abondantes) dus à un manque de plaquettes sanguines (thrombocytopénie).

Les symptômes causés par un nombre trop important de blastes leucémiques sont:

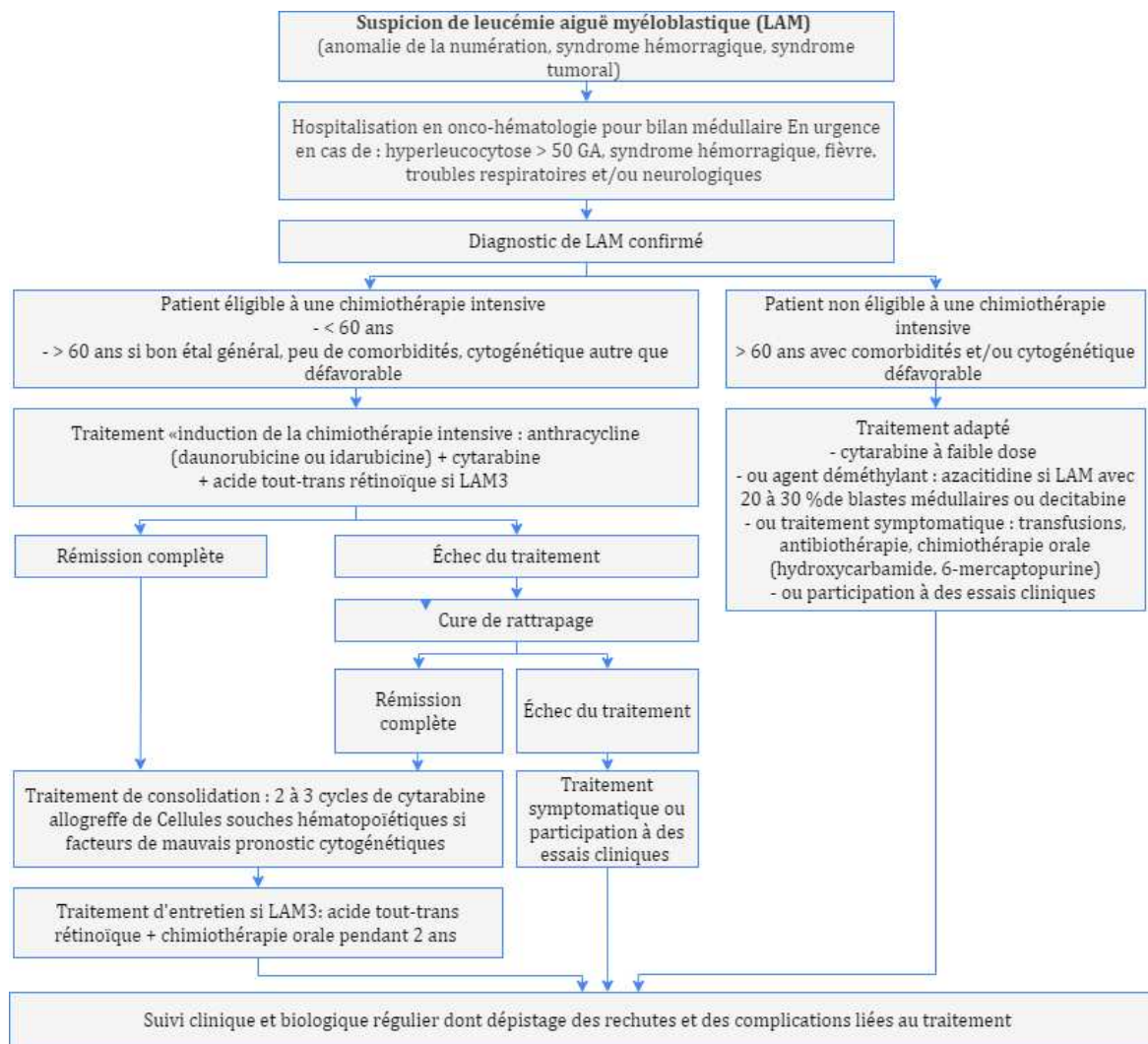
- Douleurs osseuses.
- Hypertrophie des organes hématopoïétiques (splénomégalie, hépatomégalie, adénopathies).
- Lésions cutanées (gingivites, leucémides).
- Troubles neurologiques (méningées, céphalées).

## 5. Traitements

La prise en charge et le traitement des LAM peuvent être relativement variables puisqu'ils dépendent de plusieurs facteurs:

- Age du patient et état de santé général (facteurs de risques)
- Type de LAM (classification et pronostic associé)
- Effets secondaires possibles

Les LAM ayant en général une progression très rapide, les patients sont souvent diagnostiqués alors que le taux de blastes circulants est déjà très élevé : il est alors primordial de réduire cette valeur rapidement par un traitement chimiothérapeutique intensif dit "d'induction". Suite à cette étape, une phase de consolidation vise à éliminer les blastes résiduels ayant résisté à la phase d'induction. Dans certains cas, des thérapies ciblées sont mises en place en supplément de la chimiothérapie en fonction du sous-type de LAM que présente le patient. Enfin, lorsque le patient est en rémission, une greffe allogénique de moelle osseuse peut être envisagée pour les patients éligibles et à haut risque de rechute. (**Figure 4**)



**Figure 4: La prise en charge classique des patients atteints de leucémies aiguës myéloïdes**

La prise en charge des patients atteints de LAM est adaptée en fonction du sous-type de leucémie, des facteurs de risque associés, ainsi que de l'état général du patient. Lorsque le patient est éligible à une chimiothérapie, il reçoit en général un cycle d'induction suivi de cycles de consolidation, ou d'une greffe allogénique de moelle osseuse. Lorsque le patient n'est pas éligible à une chimiothérapie intensive, ou que celle-ci ne réduit pas sa charge blastique, il reçoit alors des thérapies à plus faibles doses, des traitements symptomatiques ou participe à des essais cliniques. Pour tous les patients leucémiques, un suivi régulier est mis en place afin d'évaluer les signes cliniques et biologiques, et dépister les risques de rechute pour les patients en rémission. (Adapté de Vidal, 2022 (12))

### a. Induction de la rémission

Pour la majeure partie des patients atteints de LAM, la première ligne de traitement est une chimiothérapie intensive dite "7+3". Elle a pour objectif d'atteindre une rémission complète (RC) correspondant à moins de 5% de blastes détectés dans la moelle



osseuse. Le patient reçoit ainsi 7 jours de cytarabine (100-200 mg/m<sup>2</sup> IV continue), ainsi qu'une anthracycline comme la daunorubicine durant les 3 premiers jours (60 mg/m<sup>2</sup> IV)(13). La première molécule est un antimétabolite très similaire à la cytosine, qui peut s'intercaler dans l'ADN, interférer avec sa synthèse et ainsi induire la mort cellulaire. Puisque la réplication est absolument nécessaire lors des divisions cellulaires, les cellules qui prolifèrent le plus comme les blastes sont les cellules les plus touchées par la cytarabine. La daunorubicine est un agent intercalant de l'ADN qui inhibe la biosynthèse de macromolécules. Elle interagit avec la Topoisomérase II en empêchant son avancée sur la double hélice d'ADN après avoir séparé les 2 brins : l'ADN reste ouvert, puisque la présence de la Topoisomérase empêche la reformation de la double hélice. La daunorubicine empêche donc la réplication, et induit elle aussi une mort cellulaire impactant plus fortement les cellules qui prolifèrent le plus, telles que les blastes. Ce traitement aboutit à une RC de 80% chez les patients à facteur de risque faible, 50-60% chez ceux à facteur de risque intermédiaire, et seulement 40% dans le cas d'une LAM à facteur de risque élevé.

Ces dernières années, une nouvelle formulation liposomale de la combinaison de cytarabine et daunorubicine est de plus en plus utilisée en clinique et a obtenu l'approbation de la FDA (U.S. Food and Drug Administration) : le CPX-351. Cette encapsulation liposomale est très similaire à la formulation de la membrane cellulaire et permet une meilleure internalisation des molécules chimiothérapeutiques, et donc leur meilleure biodisponibilité. Une étude clinique de Phase III a été menée, comparant l'effet du CPX-351 (100 unités/m<sup>2</sup> correspondant à 100 mg/m<sup>2</sup> de cytarabine and 44 mg/m<sup>2</sup> de daunorubicine administrées en perfusions de 90 minutes aux jours 1, 3, et 5) à la chimiothérapie standard 7+3 chez 309 patients de 60 à 75 ans ayant une leucémie secondaire nouvellement diagnostiquée. Les auteurs montrent ainsi une efficacité significativement plus importante du CPX-351, avec un taux de survie de 9.56 mois contre 5.95 avec une chimiothérapie 7+3 (p=0.003). Le taux de rémission est aussi plus élevé, 47.7% contre 33.3% pour le traitement standard (two-sided p = 0.016)(14). Il est donc envisageable que cette nouvelle formulation remplace dans les prochaines années la chimiothérapie standard, et devienne le traitement le plus utilisé dans les LAM.

Outre la cytarabine et les anthracyclines, d'autres molécules chimiothérapeutiques peuvent être employées durant la phase d'induction. Chez les patients âgés de plus de 65-70ans, des agents hypométhylants, tels que l'azacitidine (AZA) ou la decitabine sont régulièrement utilisés. L'AZA est un analogue de la cytidine régulièrement combiné à un inhibiteur de Bcl-2 (Venetoclax), et la decitabine est son dérivé deoxy (5-aza-2'-deoxycytidine). En dose faible, ces agents inhibent l'action de l'ADN méthyltransférase, causant une hypométhylation de l'ADN. En dose élevée, ces composés sont capables de s'intercaler dans l'ADN (decitabine) et l'ARN (AZA) des cellules qui se divisent fortement. La decitabine induit la formation de liaisons covalentes entre les méthyltransférases et l'ADN, ce qui empêche la synthèse d'ADN et entraîne la mort de la cellule. L'AZA quant à elle, après incorporation dans l'ARN, provoque le désassemblage des polyribosomes et bloque la méthylation : ceci mène à un blocage de la synthèse protéique et à la mort de la cellule. Ces traitements ciblent davantage les cellules à forte prolifération, telles que les blastes.

## b. Consolidation par chimiothérapie

Si le patient reçoit uniquement un traitement d'induction, dans 90% des cas la rémission est suivie d'une rechute dans les semaines ou mois suivants. Ainsi, la phase d'induction est complétée par un traitement dit de consolidation. Il a pour objectif de prolonger au maximum la rémission en éliminant les blastes résiduels qui auraient survécu à la phase d'induction, qui sont en général en très faible nombre donc non détectables dans le sang. Ce traitement consiste en général en une infusion de cytarabine en dose élevée durant 2 à 4 cycles de 5 jours consécutifs, entrecoupés de périodes de pause. La dose est ici plus élevée afin d'avoir l'efficacité la plus optimale possible: elle est d'environ 1 g/m<sup>2</sup>, contre 100-200 mg/m<sup>2</sup> seulement en phase d'induction. Après ces cycles de consolidation à la cytarabine, un certain nombre de patients vont atteindre une RC, possiblement durant plusieurs années. Cependant, la réponse au traitement est très grandement influencée par le type de LAM et les facteurs cytogénétiques et moléculaires spécifiques du patient. Chaque sous-type de LAM étant associé à un risque de rechute, il existe des catégories de patients pour qui le traitement standard par chimiothérapie ne sera pas efficace. Les patients mutés pour le gène NPM1 seul auront tendance à avoir une bonne réponse à la chimiothérapie, alors que les patients au caryotype complexe ou mutés pour TP53 ne seront en

général pas répondeurs. Ainsi, de nouvelles thérapies ont été mises au point et visent précisément les gènes mutés chez le patient en fonction du sous-type de LAM qu'il présente: ce sont les thérapies ciblées.

### c. Thérapies ciblées

L'avancement grandissant des connaissances sur les altérations géniques impliquées dans les différents sous-types de LAM a permis ces dernières années la mise en place de thérapies visant spécifiquement une modification en particulier. Ces thérapies ciblées se basent sur une connaissance accrue des mécanismes mis en jeu, et ont pour objectif d'inhiber le ou les gènes principaux impliqués dans la leucémogénèse de chaque sous-type de LAM. Ces thérapies existent ainsi sous différentes formes (15).

#### **Inhibiteurs de tyrosine kinase**

Chez les patients atteints de LAM, le gène FLT3 (FMS-related tyrosine kinase 3) est muté chez environ 32% des LAM de l'adulte (1). La protéine FLT3 est impliquée dans de nombreuses voies de signalisation, et lorsqu'elle est mutée, elle entraîne une prolifération cellulaire aberrante ainsi qu'une résistance à l'apoptose. Les mutations de ce gène existent principalement sous 2 formes: ITD (Internal Tandem Duplication) ou TKD (mutations ponctuelles du Tyrosine Kinase Domain). En particulier, les mutations FLT3-ITD provoquent une maladie très proliférative avec un taux de rechute élevé et une survie faible. Ces mutations peuvent être retrouvées seules ou en complément d'autres mutations affectant la fonction des gènes NPM1 ou DNMT3A. Ainsi, des traitements ciblés comme la Midostaurine, la Crénolanib ou le Gilteritinib, en combinaison ou non avec une chimiothérapie conventionnelle, inhibent la signalisation via le récepteur FLT3. Ceci entraîne un arrêt du cycle cellulaire et une apoptose des cellules cancéreuses, et empêche le développement de la maladie. Malgré le traitement, le risque de rechute reste très important et les mutations de FLT3 sans co-mutations de NPM1 sont associées à un facteur de risque défavorable.

#### **Inhibiteurs des isocitrate déshydrogénase 1/2**

Les mutations d'IDH1 et IDH2 représentent respectivement 7% et 10% des LAM de l'adulte. Ces protéines font partie du cycle de Krebs et permettent la décarboxylation de l'isocitrate en  $\alpha$ -ketoglutarate ( $\alpha$ -KG). Les mutations sont néomorphiques et

donnent donc une nouvelle fonction à la protéine, qui change alors de substrat et devient capable de produire l'onco-métabolite 2D-hydroxyglutarate (D-2HG). Le D-2HG est un antagoniste de l' $\alpha$ -KG, puisqu'il inhibe les déméthylases dépendantes de l' $\alpha$ -KG(16). Cette accumulation de D-2HG entraîne donc une hyperméthylation de l'ADN, suivie d'un blocage de la différenciation. En clinique, les inhibiteurs Ivosidenib et Enasidenib permettent de traiter les patients mutés pour IDH1 ou IDH2, respectivement. Ces deux traitements sont à ce jour en Phase 3 et 2 d'essais cliniques respectivement, et ne sont utilisés qu'en 2ème ou 3ème ligne de traitement. Ils sont ainsi utilisés en monothérapie pour les patients en rechute ou réfractaires à une chimiothérapie classique, ou en combinaison avec l'AZA chez les patients à risque infectieux majeur ou à risque de neutropénie importante.

### **Inhibiteurs des protéines anti-apoptotiques**

La surexpression de protéines pro-apoptotiques telles que BCL-2, BCL-XL, BCL-W, MCL-1 ou encore BFL-1 est souvent retrouvée dans les LAM. Ce sous-type de LAM est associé à une résistance aux chimiothérapies standard, ce qui a poussé au développement de molécules inhibant spécifiquement cet effet anti-apoptotique. En parallèle, des protéines de la même famille ont une fonction pro-apoptotique connue, grâce à leur domaine dit BH3. Ainsi, un inhibiteur sélectif de BCL-2 et mimétique de BH3 est désormais utilisé chez les patients non éligibles à une chimiothérapie intensive : le Venetoclax (ABT-199). Cette molécule a montré une grande efficacité en clinique et est désormais utilisée en première intention, seule ou en combinaison avec une chimiothérapie telle que l'AZA.

### **Anticorps monoclonaux**

Les anticorps monoclonaux, ciblant un antigène unique, connaissent depuis quelques années une utilisation croissante dans le traitement des LAM. Ils ciblent un antigène très exprimé à la surface des blastes, et peuvent être associés à une chimiothérapie. Ainsi, le Gemtuzumab ozogamicin (GO, Mylotarg) correspond à un anticorps anti-CD33, permettant de guider la molécule chimiothérapeutique spécifiquement vers les blastes exprimant le CD33 afin de rendre le traitement plus efficace. L'anticorps se fixe aux molécules CD33, exprimées dans environ 90% des cas de LAM, puis la chimiothérapie est internalisée et entraîne des cassures double brin et la mort de la cellule(17).

A l'heure actuelle, ces traitements ont une efficacité modérée mais restent une option thérapeutique pour les patients ne répondant pas à une chimiothérapie intensive standard. Le principal désavantage de ces thérapies est le manque de molécules ciblables exprimées uniquement par les blastes et absentes sur les cellules saines. En effet, CD33 est très exprimé à la surface des blastes mais est aussi exprimé par certaines cellules hématopoïétiques saines telles que les GMP. Le traitement élimine aussi ces cellules saines, bien qu'elles soient moins touchées que les blastes car elles sont moins prolifératives.

#### d. Risques de rechute et greffe allogénique de moelle osseuse

Durant la dernière décennie, les connaissances sur les LAM ont évolué et un certain nombre de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles ont émergé. Cependant, pour la majeure partie des patients le taux de survie reste encore très largement insatisfaisant et le taux de mortalité bien trop élevé.

Afin de réduire le risque de rechute, certains patients éligibles reçoivent une greffe allogénique de moelle osseuse durant la phase de rémission. De la moelle osseuse est alors prélevée d'un donneur sain au système immunitaire compatible, puis est transfusée au patient leucémique (détails dans le Chapitre 3). Le patient reçoit au préalable un traitement de conditionnement qui le prépare à recevoir la transfusion et limite au minimum le risque de rejet de greffe. Celui-ci consiste en l'administration d'agents cytotoxiques et d'immunosuppresseurs, en combinaison ou non avec une radiothérapie. Le conditionnement peut être de 2 types:

- Myéloablatif: Il a pour objectif d'éliminer totalement la moelle du patient, dont les blastes résiduels, afin de laisser de la place aux cellules du donneur sain. Il consiste en la combinaison de cyclophosphamide et busulfan, ou cyclophosphamide et ICT (Irradiation corporelle totale). Ce conditionnement entraîne une aplasie médullaire dite thérapeutique, c'est-à-dire une insuffisance médullaire suite à la destruction du tissu hématopoïétique par des médicaments(18).

- Non myéloablatif ou d'intensité réduite: Il est d'une intensité plus modérée, il permet une suppression partielle de la moelle du patient sans pour autant trop l'affaiblir. Il est en général préconisé pour les patients de plus de 55 ans ou les patients plus jeunes mais ayant des comorbidité affaiblissant leur organisme. Ce conditionnement consiste en des doses réduites de chimiothérapie (busulfan, fludarabine), de sérum anti-lymphocytaire (permettant d'éliminer les lymphocytes du patient et de réduire sa probabilité de rejeter la greffe) ou en une ICT associée ou non à la fludarabine(18).

A la suite de la greffe, le patient reçoit un traitement immunosuppresseur afin d'éviter que les cellules du greffon n'attaquent les cellules saines du patient, appelé effet du greffon contre l'hôte (GVHD, *graft versus host disease*). Le traitement standard est une combinaison de ciclosporine (IV continue de 3 mg/kg/jour) et méthotrexate (IV de 15 mg/m<sup>2</sup> à J1 puis 10 mg/m<sup>2</sup> à J3, J6 et J11). Le tacrolimus peut être un substitut à la ciclosporine. Le traitement est poursuivi pendant environ 6 mois avec des doses variables en fonction des patients et de leur tolérance, puis arrêté après une réduction progressive des doses si le patient ne montre aucun signe de rejet de greffe. Le taux de survie à 3 ans des patients est d'environ 70% pour les moins de 50-55 ans et est réduit à environ 40% pour les patients plus âgés. Ainsi, la greffe allogénique de moelle osseuse est un réel outil de prévention des risques de rechute, mais son effet n'est pas encore à son plein potentiel pour le traitement des LAM. Davantage de détails sur les greffes seront donnés dans le Chapitre 3.

## Résumé du Chapitre 1

- ◆ L'Hématopoïèse permet la production de toutes les cellules sanguines spécialisées.
- ◆ Les LAM sont un néoplasme de la lignée myéloïde.
- ◆ Les LAM entraînent un manque de cellules sanguines différenciées (cytopénie).
- ◆ Les patients atteints de LAM sont en général traités par chimiothérapie 7+3, par des thérapies ciblées, ou la combinaison des deux.
- ◆ Pour réduire le risque de rechute, les patients éligibles reçoivent une greffe allogénique de moelle osseuse.

# Chapitre 2: Réponse immunitaire

## I. Généralités sur la réponse immunitaire

La réponse immunitaire est l'ensemble des mécanismes mis en place par l'organisme pour maintenir son intégrité. Elle permet de différencier le soi du non-soi (ou du soi endommagé), et d'éliminer ce dernier puisqu'il présente un risque pour l'organisme. Il y a donc une reconnaissance du danger, une traduction de ce signal de danger via différents relais, une mise en place d'une réponse adaptée et contrôlée sans trop endommager les tissus sains, et enfin une possible mémoire de ce danger permettant une meilleure réponse en cas de seconde agression du même type. Ces signaux de danger peuvent être présents à différents niveaux de l'organisme, tels que sur la peau, dans le sang ou dans le cytoplasme des cellules par exemple. Ainsi, chez l'Homme on peut distinguer deux types de réponses immunitaires complémentaires: l'immunité innée et l'immunité adaptative.

### 1. Immunité innée

L'immunité innée est la première ligne de défense de l'organisme. Cette réponse est très rapide, entre 1h et 12h en moyenne, et est similaire quel que soit le pathogène qu'elle détecte. Elle est donc stéréotypée, non spécifique et peu discriminante, puisqu'elle utilise des effecteurs déjà existants. Elle reste cependant très efficace pour empêcher l'infection par des pathogènes extérieurs.

Les acteurs de cette réponse peuvent former une barrière physique (peau), chimique (sécrétions au pH acide telles que le mucus, larmes, sucs gastriques, salive), ou cellulaire. Les barrières physico-chimiques empêchent l'entrée d'un grand nombre de pathogènes. Cependant, en interne, des cellules ou des protéines particulières permettent de combattre le pathogène une fois entré dans l'organisme. Cette barrière cellulaire comprend 2 groupes:

- des cellules phagocytaires, telles que les macrophages, neutrophiles ou cellules dendritiques entre autres, qui vont internaliser le pathogène et le dégrader, et



qui permettent d'activer d'autres cellules de l'immunité par leurs signaux activateurs et chimiotactiques.

- des cellules cytotoxiques, telles que les Natural Killer (NK), lymphocytes T Natural Killer (NKT), les lymphocytes T  $\gamma\delta$  ou encore les cellules MAIT (Mucosal-Associated Invariant T-cells). Ces cellules libèrent des molécules solubles telles que le Granzyme B et les perforines, qui vont créer des pores dans la cellule infectée, activer la voie des caspases et induire la mort de la cellule infectée.

En plus de la barrière cellulaire, le complément est un système inné de surveillance immunitaire de l'organisme. Il est composé de plusieurs dizaines de protéines plasmatiques ou de surface, impliquées dans la lutte contre les pathogènes. Le système du complément est régulé de manière très fine puisqu'un défaut peut entraîner un syndrome hémolytique, une susceptibilité aux infections bactériennes ou une maladie chronique inflammatoire telle que le Lupus érythémateux disséminé. Ces protéines ont toutes une action qui converge vers l'activation de l'enzyme C3 convertase, qui va cliver la protéine C3 en formant les sous-parties nommée C3a et C3b, ainsi que d'une C5 convertase, qui va cliver la molécule C5 en C5a et C5b. Celles-ci vont ainsi permettre de:

- recouvrir le pathogène de signaux indiquant aux cellules phagocytaires de les phagocyter: c'est l'opsonisation. (C3b)
- induire une inflammation, et ainsi un recrutement de plasma riche en lymphocytes B ou cellules phagocytaires sur la zone de l'inflammation. (C3a et C5a)
- lyser directement certains pathogènes grâce au MAC (membrane attack complex, liaison de C5b à C6, C7, C8 et C9).

L'activation de la réponse immunitaire innée se fait par la reconnaissance de signaux de danger (19). Ces signaux peuvent correspondre à des "motifs moléculaires associés à des pathogènes" (PAMP, Pathogen-Associated Molecular Patterns), présents chez le pathogène mais absents chez l'hôte tels que des protéines de l'enveloppe virale ou des lipoprotéines à la surface des bactéries. Dans le cas où le signal de danger est donné par une cellule endommagée, des "motifs moléculaires associés à un dommage

cellulaire" (DAMP, Damage-Associated Molecular Patterns) sont relargués par la cellule hôte à la suite d'un stress ou dommage. Dans le cas des cellules cancéreuses, les DAMPs sont essentiels et permettent soit l'activation de la caspase 3 puis l'apoptose de la cellule cancéreuse, soit l'activation de la Beclin 1 et son autophagie. Ces PAMPs et DAMPs sont reconnus par des Récepteurs de reconnaissance aux pathogènes (PRR, Pathogen Recognition Receptors) à la surface des cellules de l'immunité innée mais aussi des cellules épithéliales. Ces récepteurs font le lien entre l'immunité innée et adaptative puisque les PRR, tels que les alarmines, permettent une sécrétion de cytokines pro-inflammatoires, une activation de l'inflammasome, et un recrutement de lymphocytes T CD8+ entre autres.

L'inflammasome est une plateforme de recrutement d'immuno-protéines permettant l'élimination des pathogènes. Elle permet l'activation de l'autophagie bactérienne et la production d'IL1 $\beta$  et IL18 qui induisent la mort cellulaire inflammatoire (pyroptose). Elle permet aussi l'induction de la voie de signalisation NF $\kappa$ B/MAPK qui active des molécules de co-stimulation ainsi que la production de cytokines pro-inflammatoires (IFN, Interférons), de peptides anti-microbiens et de chimiokines. Ces dernières sont essentielles puisqu'elles sont impliquées dans la guérison des blessures, l'angiogenèse, la diapédèse et le recrutement de cellules à l'interface entre immunité innée et adaptative telles que les lymphocytes T résidents NK, NKT, MAIT et  $\gamma\delta$ .

La réponse immunitaire innée est donc une combinaison d'effecteurs solubles et cellulaires qui offrent une première ligne de défense à l'organisme contre des pathogènes externes mais aussi suite à des dommages internes. Elle a une action très rapide mais non-spécifique, et nécessite dans certains cas l'activation d'une réponse immunitaire adaptative plus spécialisée pour éliminer la menace.

## 2. Immunité adaptative

L'immunité adaptative est la seconde ligne de défense de l'organisme. Lorsque la réponse innée à court terme n'est plus suffisante et que les signaux de danger sont toujours détectés, l'organisme développe une réponse spécifique au pathogène en question, à médiation cellulaire ou humorale, ainsi qu'une mémoire immunitaire. Elle correspond à un ensemble de cellules spécialisées reconnaissant et mémorisant le

non-soi afin d'apporter une réponse ciblée et plus efficace lors d'une seconde rencontre potentielle avec le pathogène.

### a. Médiation humorale

L'immunité à médiation humorale repose sur l'action des lymphocytes B (LB). Ces cellules, une fois différenciées en plasmocytes, sont spécialisées dans la production d'immunoglobulines (Ig), ou anticorps. Ces derniers sont des récepteurs membranaires capables de détecter et fixer des antigènes sous leur forme native. Après une phase d'activation, ces LB connaissent une expansion clonale puis une différenciation en plasmocytes permettant d'obtenir un très grand nombre de cellules capables de sécréter d'importantes quantités d'anticorps. Ces cellules représentent environ 12% de la population de lymphocytes, et se trouvent dans les ganglions lymphatiques. En fonction des signaux émis par les lymphocytes T helpers, les LB vont soit se différencier en plasmocytes, soit se différencier en lymphocytes B mémoire. Les plasmocytes sécréteurs d'anticorps vont permettre de créer un complexe immun: les anticorps produits, capables de se fixer aux antigènes spécifiques qui ont induit leur production, vont créer un complexe anticorps/antigène qui sera reconnu et phagocyté pour permettre l'élimination du pathogène. Les lymphocytes B mémoire, quant à eux, permettent de mémoriser les caractéristiques du pathogène qui a induit leur production, afin de déclencher une réponse de durée et intensité plus importantes en cas de second contact avec le même pathogène. Cette mémoire immunitaire est essentielle, et est permise par la durée de vie des lymphocytes mémoire qui est beaucoup plus longue que celle des plasmocytes. Les principales caractéristiques des lymphocytes B ainsi que leurs différences avec les LT sont regroupées dans la **Figure 5**.

	T cells	B cells
<b>Origine</b>	Moelle osseuse (et organes lymphoïdes secondaires)	Moelle osseuse
<b>Différenciation</b>	Thymus (et organes lymphoïdes primaires)	Moelle osseuse (et organes lymphoïdes primaires)
<b>Localisation</b>	Principalement dans les tissus lymphatique	Tissus lymphatique
<b>Proportion des lymphocytes circulants</b>	70-80%	20-30%
<b>Rôle</b>	Immunité à médiation cellulaire via TCR	Immunité à médiation humorale via BCR
<b>Mode d'action</b>	Interaction directe avec antigène ou avec CPA présentant un peptide antigénique	Interaction indirecte permettant la production d'anticorps par plasmocytes

**Figure 5: Les différences principales entre lymphocytes B et T**

(Adapté de "B and T Lymphocytes Related to the Adaptive Immune Response", APHE, Pharmacy180 (20))

## b. Médiation cellulaire

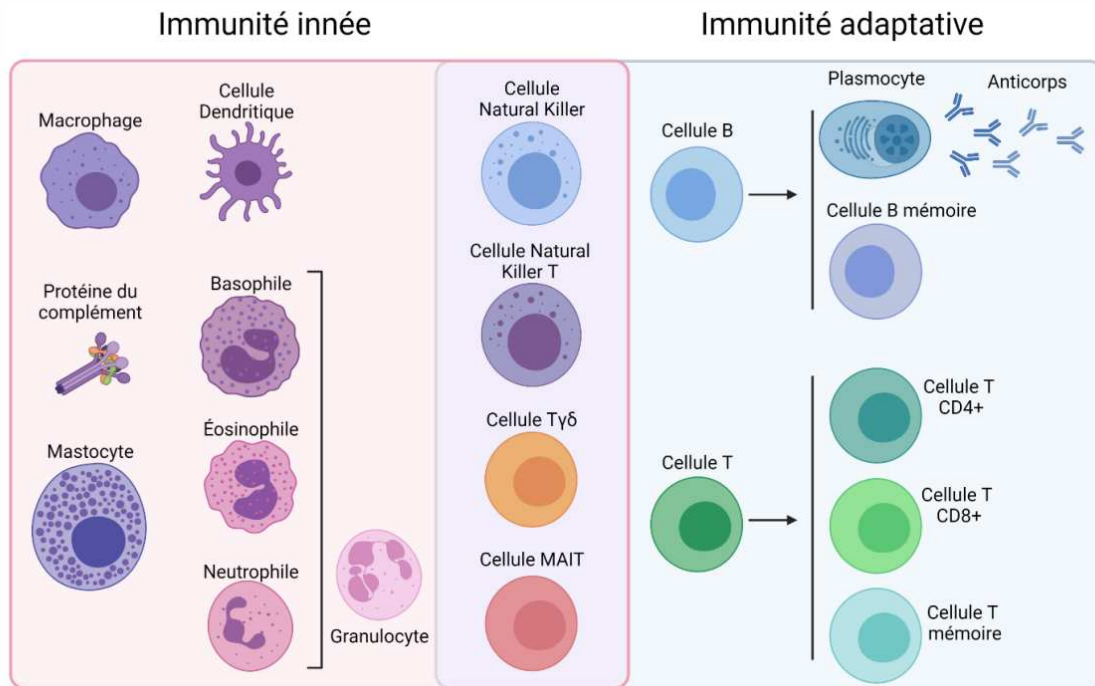
L'immunité à médiation cellulaire est basée sur l'action des lymphocytes T CD4+ ou CD8+. Ces cellules expriment à leur surface des récepteurs de cellules T (TCR, T-cell Receptor) spécifiques d'un unique antigène.

Les lymphocytes T CD4+ conventionnels possèdent des chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  au niveau de leurs TCR. Ils sont aussi nommés T helper, ou Th, puisqu'ils aident les autres cellules immunitaires à effectuer leur rôle. En produisant des cytokines, ils vont permettre l'activation des cellules T cytotoxiques NK et CD8+, ainsi que la différenciation des LB en plasmocytes sécrétant des Ig. De plus, les LT helpers permettent de faciliter la commutation de classe des LB, c'est-à-dire le réarrangement de leur récepteur de cellules B (BCR, B-cell receptor) afin de reconnaître des pathogènes extrêmement variés.

La population de LT CD8+ permet quant à elle d'éliminer les dangers intracellulaires, tels que les cellules infectées par des pathogènes ou trop endommagées. Cette action cytotoxique est induite par le contact avec un complexe peptide/cellule présentatrice

d'antigène (CPA), qui permet la production de granzyme B et perforine par les LT. Le granzyme forme alors un pore dans la membrane de la cellule à éliminer, par lequel la perforine peut entrer, activer la voie des caspases, et induire une mort cellulaire programmée ou apoptose.

La réponse immunitaire est donc composée d'une multitude d'acteurs interconnectés mais ayant chacun une fonction précise (**Figure 6**).



**Figure 6: La réponse immunitaire innée et adaptative**

*L'immunité innée comprend des cellules dont l'action est mise en place dans les premières minutes ou heures après la perception d'un danger. Elle met en jeu des cellules phagocytaires telles que les macrophages, ou des cellules sécrétrices telles que les granulocytes. Au contraire, l'immunité adaptative est enclenchée après plusieurs jours et met en jeu des cellules sécrétrices (lymphocytes B, plasmocytes), cytotoxiques (lymphocytes T NK ou CD8+), helper (lymphocytes T CD4+), ou mémoires (lymphocytes T ou B mémoire). Enfin, il existe une dernière catégorie de cellules immunitaires à l'interface entre l'immunité innée et adaptative, telles que les cellules MAIT, Tyδ, NK et NKT. Ces cellules ont une activité cytotoxique et sont capables d'agir très rapidement, mais aussi plus tard en accompagnement de la réponse adaptative. (Dubreuil L., 2021(21))*

## II. Complexe Majeur d'Histocompatibilité

Le CMH, ou Complexe Majeur d'Histocompatibilité, fut découvert en 1958 par Jean Dausset. Un patient, à la suite de plusieurs transfusions sanguines successives, a développé une réaction d'agglutination dans son sérum. Jean Dausset découvre alors

qu'il existe différents types de globules blancs (leucocytes), et fait la première description des anticorps de surface de ces cellules qui permettent de différencier le soi du non-soi. Chez l'Homme, le CMH est décrit comme un ensemble d'antigènes HLA (Human Leucocyte Antigens) qui se séparent en deux groupes principaux: HLA de classe I et HLA de classe II (22).

## 1. HLA de classe I

Les molécules HLA de classe I classiques sont de 3 types: HLA-A, -B et -C. Il existe aussi des molécules HLA non-classiques appelées HLA-E, -F et -G. Enfin, les molécules dites "HLA-apparentées" sont MICA et MICB. Ces molécules sont chacune codées par un gène différent, et correspondent à des hétérodimères formé d'une partie transmembranaire polymorphique (chaîne lourde ou chaîne  $\alpha$ ) qui détermine le type de molécule HLA I, et d'une partie non-polymorphique appelée  $\beta$ 2-microglobulin ( $\beta$ 2m) (**Figure 6**). Les chaînes  $\alpha$  sont codées par le chromosome 6, alors que les chaînes  $\beta$  sont codées par le chromosome 15. Grâce à sa forme en double hélice, la chaîne  $\alpha$  permet de former une zone de fixation pour des peptides antigéniques : ce complexe stabilisé sera ainsi en mesure d'être reconnu par les TCR. La chaîne  $\alpha$  seule ou le peptide seul ne sont pas détectables par les TCR, il est donc primordial que ces deux éléments forment un complexe pour être reconnus: c'est la restriction du CMH(22).

Ce complexe est exprimé à la surface de toutes les cellules nucléées, et permet principalement de cibler les cellules infectées par des pathogènes : toutes les cellules potentiellement infectées expriment donc le CMH de classe I, et peuvent ainsi présenter des peptides antigéniques. La restriction du CMH empêche une réaction contre les peptides circulants, et permet une concentration de la réaction sur les peptides exprimés à la surface des cellules infectées, et donc leur reconnaissance et leur élimination rapide. Les antigènes HLA de classe I permettent de cibler spécifiquement les cellules infectées par des agents pathogènes.

Le CMH de classe I est reconnu par les lymphocytes T CD8+, ayant une fonction cytotoxique. Toutes les cellules nucléées pouvant être présentatrices d'antigène par le CMH I, les cellules infectées peuvent en théorie toutes présenter des peptides antigéniques de leurs pathogènes et ainsi activer une réponse immunitaire.

## 2. HLA de classe II

Les molécules HLA de classe II classiques sont elles aussi classées en 3 principaux groupes: DP, DQ et DR. Il existe aussi des molécules HLA de classe II non-classiques, nommées HLA-DO et -DM. Ces molécules sont composées d'une chaîne  $\alpha$  et d'une chaîne  $\beta$ , chacune possédant une région transmembranaire et un domaine de liaison peptidique, et codées par le locus CMH sur le chromosome 6 (**Figure 7**).

Ce complexe permet une reconnaissance des cellules exogènes potentiellement pathogènes, il est donc en général présent à la surface de cellules présentatrices d'antigène. On retrouve ainsi des molécules HLA de classe II sur les macrophages, cellules dendritiques, ou encore sur les lymphocytes B activés. Les cellules stimulées par ce complexe sont en général des lymphocytes T-helper, qui expriment à leur surface des molécules CD4.

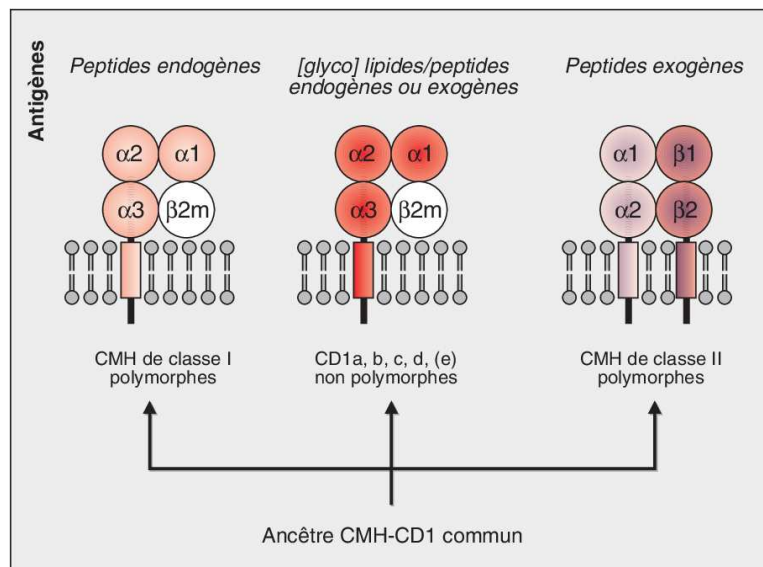
## 3. HLA de classe III

Les molécules HLA de classe III sont codées par des gènes situés entre les régions HLA I et HLA II. Elles correspondent à des molécules de l'inflammation essentielles à la réponse immunitaires telles que le TNF (Tumor-Necrosis Factor) ou encore les molécules du complément C2, C4 et le facteur B.

## 4. Présentation d'antigènes HLA-indépendante

Contrairement aux molécules HLA conventionnelles qui ne reconnaissent que des antigènes peptidiques, il existe une autre famille de molécules capables de présenter des antigènes (glyco)lipidiques: les molécules CD1, classées en 3 groupes(23). Les molécules CD1a, b et c sont exprimées à la surface des cellules dendritiques et peuvent ainsi activer une réponse des lymphocytes T CD8. Le CD1d quant à lui permet une activation des lymphocytes iNKT (innate Natural Killer T-cell) et la production d'une grande quantité de molécules immunorégulatrices. Le dernier groupe, comprenant les molécules CD1e, est très peu caractérisé. Ces molécules sont structurellement très proches du CMH de classe I puisqu'elles possèdent une structure hétérodimérique associant une chaîne alpha transmembranaire et une chaîne  $\beta$ 2-microglobulin ( $\beta$ 2m) (**Figure 7**). Elles permettent de présenter à la fois des antigènes du soi mais aussi des

antigènes exogènes, en particulier microbiens, puisqu'ils expriment des antigènes lipidiques tels que les glycosphingolipides (24).



**Figure 7: La présentation d'antigènes**

La présentation d'antigènes peut se faire de trois manières. Le CMH-I (HLA-I) est composé d'une chaîne alpha à trois sous-unités et d'une sous-unité unique bêta dimérisées, reconnaissant des peptides endogènes. Le CMH-II (HLA-II) a une structure proche, présentant cependant une chaîne alpha et une chaîne bêta dimérisées composées chacune de deux sous-unités. Enfin, les molécules CD1 ont une structure similaire au CMH I et permettent une reconnaissance de (glyco)lipides/peptides endogènes ou exogènes, le plus souvent d'origine microbienne. (D. Jullien et al., 1999 (23))

### III. Lymphocytes T CD4, T CD8 et Natural Killers

#### 1. Lymphocytes T CD4+ et CD8+

##### a. Origine

Les cellules T immatures, ou thymocytes, ont pour origine des cellules progénitrices lymphoïdes communes dites CLP (Common Lymphoid Progenitors) provenant de la moelle osseuse. Les CLP qui expriment à leur surface le marqueur PSGL1 (platelet (P)-selected glycoprotein ligand 1) seront capables d'interagir avec la P-sélectine présente à la surface des cellules endothéliales thymiques, permettant ainsi leur entrée dans le thymus (25). De plus, des signaux chimiques tels que la production des



chimiokines CCR7 et CCR9 sont essentiels pour l'attraction des progéniteurs lymphoïdes vers le thymus (21).

Le thymus fait partie, avec la moelle osseuse, des organes lymphoïdes primaires. Il se situe dans la partie supérieure du thorax et permet le développement et la maturation des lymphocytes T. Il est divisé en plusieurs lobules séparés par des cloisons: les septums. Chaque lobule possède une partie périphérique appelée cortex, ainsi qu'une partie centrale appelée médulla. Cette organisation spatiale est essentielle à la maturation des lymphocytes T puisque les lymphocytes immatures se situent dans le cortex, puis ils se déplacent en direction de la médulla au cours de leur maturation.

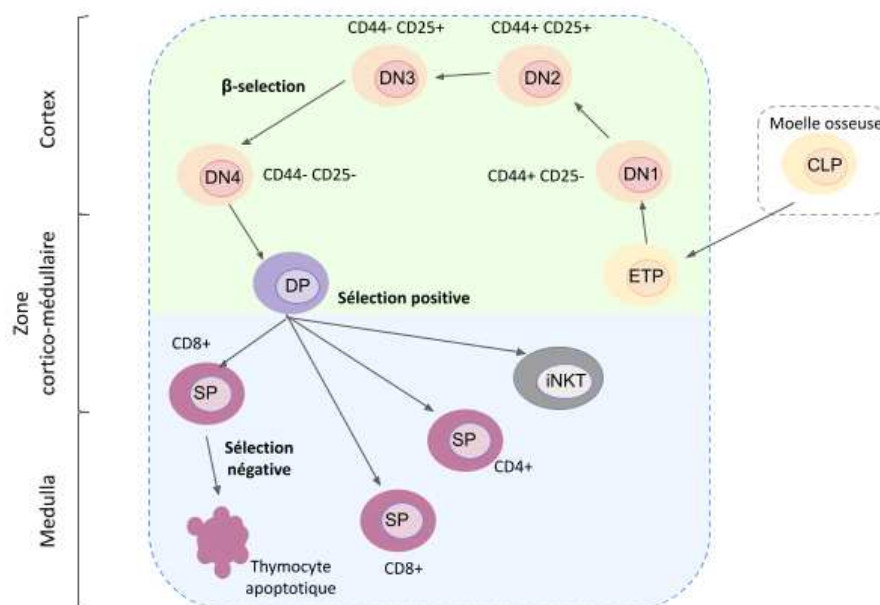
A leur entrée dans le thymus, ces cellules sont dites "double-négatives" puisqu'elles ne possèdent aucun récepteur CD4 ou CD8. A leur surface, les récepteurs de cellules T (TCR) ainsi que le co-récepteur CD3 ne sont eux aussi pas exprimés: ces thymocytes sont donc CD4<sup>-</sup> CD8<sup>-</sup> CD3<sup>-</sup> TCR<sup>-</sup>. En continuant leur maturation et leur avancée vers la région centrale du thymus, ces cellules vont acquérir les marqueurs CD4 et CD8 et deviendront alors double-positives (CD4<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> CD3<sup>+</sup> TCR<sup>+</sup>). A la suite de différentes étapes de sélection, ces thymocytes deviendront simple positifs et exprimeront à leur surface le CD4 ou le CD8, accompagné du CD3 et d'un TCR.

## b. Education

Le trajet des thymocytes débute à la surface du thymus, avec l'entrée de CLP dans le thymus. Un signal provenant des cTEC (cortical thymic epithelial cell) permet l'expression d'IL-7 et du ligand de la voie notch DDL4, transformant les CLP en précurseurs thymiques précoces, ou ETP (early thymic precursor). Ces cellules migrent le long de la région corticale en gagnant l'expression des marqueurs d'activation lymphocytaires CD25 (Double négatives 1, DN1) puis CD44 (DN2). Elles perdent ensuite l'expression du CD44 et deviennent DN3. S'en suit alors la sélection-β, correspondant à la progression des DN3 au stade suivant seulement si elles sont capables d'exprimer à leur surface une chaîne β de TCR avec un réarrangement en phase du locus TRB associé, ainsi qu'une pré-chaîne α (réarrangement du locus TRA)(26,27). Si ces pré-chaînes α et β sont capables de se lier ensemble pour former un pré-TCR, la cellule devient alors DN4 puis double positive (DP). Les cellules DP CD4<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> vont proliférer dans la zone cortico-médullaire du thymus et devenir le

type cellulaire le plus abondant dans cet organe. C'est aussi durant cette phase que le co-récepteur CD3 commence à être exprimé à la surface des thymocytes (**Figure 8**).

Ces cellules DP reçoivent ensuite un signal des cellules épithéliales thymiques de la medulla (mTEC), qui leur présentent des peptides du soi afin d'éliminer tous les lymphocytes auto-réactifs par apoptose: c'est la sélection négative. Les cellules qui passent ce test avec succès sont donc des lymphocytes CD4+, CD8+ et CD4+ régulateurs (Treg) naïfs, exportées vers la circulation sanguine ainsi que les organes lymphoïdes périphériques afin d'accomplir leurs fonctions.



**Figure 8: Le développement et l'éducation des lymphocytes T**

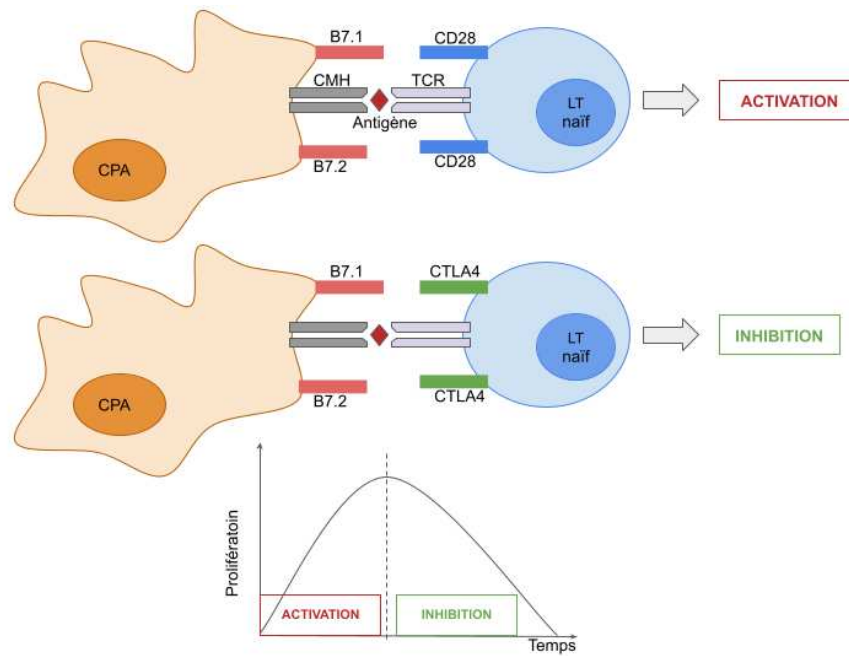
Les lymphocytes T sont dérivés de cellules progénitrices lymphoïdes de la moelle osseuse (CLP) qui se différencient en ETP (early thymic precursor). Dans le thymus, les ETP deviennent des DN1 CD44+ CD25- qui acquièrent l'expression du CD25 et deviennent DN2. Ces cellules perdent ensuite le CD44 et deviennent des DN3 qui vont subir une sélection beta au niveau de leur pré-TCR. Les cellules qui passent ce test seront des DN4 qui pourront se différencier en thymocyte double positif DP, qui iront vers une voie simple positive CD4+ ou SP CD8+ naïves. Les thymocytes CD8+ se soumettent ensuite à une sélection négative afin d'éliminer les cellules auto-réactives. En parallèle, les DP peuvent aussi aboutir à des cellules natural killer T immatures (iNKT). Vert: présence de cTEC. Bleu: présence de mTEC. (Inspiré de P. Thapa et al., 2019 (28))

### c. Récepteurs et co-récepteurs

#### Reconnaissance et prolifération

Les lymphocytes T naïfs, une fois sortis du thymus, sont en général en circulation à travers les ganglions, les vaisseaux lymphatiques afférents et la circulation sanguine. Ce phénomène augmente drastiquement les chances de rencontre entre les lymphocytes et des CPA qui auraient lié un peptide antigénique. Lorsqu'un lymphocyte T naïf rencontre une CPA au CMH correspondant, le dialogue entre ces cellules a lieu en deux étapes:

- Signal 1 : Grâce à son TCR, le LT est capable de **reconnaître** le complexe CMH-peptide antigénique. Les deux cellules se contactent donc au niveau de leurs récepteurs, avec le peptide comme point de contact. Cependant ce signal seul n'est pas suffisant pour activer les LT, et une cellule ayant seulement reçu le signal 1 sera anergique.
- Signal 2 : Un signal de co-stimulation est nécessaire suite à la phase de reconnaissance. Il met en jeu une interaction entre les molécules CD28 à la surface des LT et les molécules B7 à la surface des CPA. Seules les CPA expriment à leur surface le complexe CMH-peptide antigénique et les molécules B7, permettant une activation complète des LT. Si les molécules B7 se lient au CD28 à la surface des LT, ceux-ci sont activés. Ces LT activés arrêtent ainsi leur migration, prolifèrent et se différencient en cellules effectrices spécifiques du pathogène. Cependant, une liaison aux molécules de co-inhibition telles que CTLA4 (Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4 protein) entraîne l'inhibition de l'activité des LT (**Figure 9**).



**Figure 9: Le rôle des molécules de co-stimulation dans l'activation des lymphocytes T**

Les signaux de co-stimulation sont essentiels à l'activation des LT. Les cellules présentatrices d'antigène (CPA) expriment à leur surface des récepteurs B7 capables de reconnaître des récepteurs activateurs CD28 ou inhibiteurs CTLA4 à la surface des LT. Les LT naïfs peuvent donc être activés par le contact B7/CD28, puis ces LT activés sont inhibés lorsque leur réponse n'est plus nécessaire par l'interaction du CTLA4 qui a une affinité beaucoup plus grande pour le B7 que le CD28. (Inspiré de B. Weill (29))

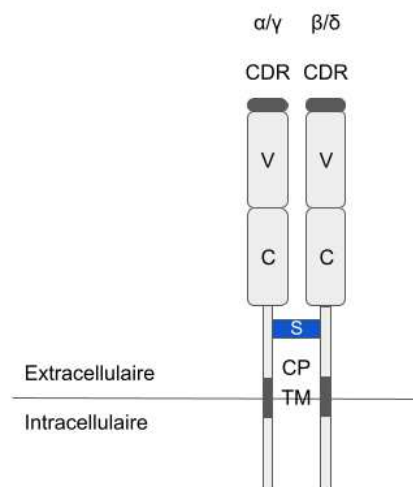
## TCR

Les récepteurs de cellules T, ou TCR (T-cell receptors), permettent de reconnaître des peptides antigéniques afin d'activer une réponse immunitaire spécifique au pathogène. Ils existent principalement sous deux formes en fonction du type de chaînes qu'ils possèdent:

- Les TCR les plus courants possèdent une chaîne  $\alpha$  et une chaîne  $\beta$  codées par les gènes TRA et TRB: ils représentent 95% des TCR existants. Ils sont en général associés à l'expression des gènes CD4 ou CD8, ainsi que du CD3 formant ainsi des cellules dites simples positives CD4+ ou CD8+.
- D'autres types de TCR existent, tels que les TCR exprimant une chaîne  $\gamma$  et une chaîne  $\delta$  (environ 5% des TCR existants) codées par les gènes TRG et TRD. Les cellules exprimant ces chaînes sont en général associées au CD3 mais pas aux

CD4 et CD8. Ces cellules font à la fois partie de l'immunité innée et de l'immunité adaptative puisqu'elles sont capables de reconnaître des antigènes présentés par le CMH de classe I, mais aussi par les molécules CD1 indépendamment du CMH.

Quel que soit le type de TCR, ce sont des hétérodimères exprimés à la surface des lymphocytes T et extrêmement polymorphes. Ils possèdent une région transmembranaire permettant un ancrage à la membrane et une interaction avec le CD3, puis une large région extracellulaire composée entre autres d'un domaine constant et d'un domaine variable (**Figure 10**). Le domaine constant est identique entre tous les TCR du même type ( $\alpha/\beta$  ou  $\gamma/\delta$ ), et permet un appariement entre les deux chaînes de l'hétérodimère. La région variable quant à elle est à la base de la réaction immunitaire adaptative, puisqu'elle permet une reconnaissance du complexe CMH-antigène ou CD1-antigène. A son extrémité se trouve une région CDR (complementarity-determining region) hypervariable qui permet de reconnaître une très grande diversité d'épitopes antigéniques. Toute la spécificité de la réponse immunitaire T est ainsi basée sur cette région CDR, qui connaît un mécanisme appelé la "recombinaison V(D)J".



**Figure 10 : La structure du TCR**

Le TCR inclut un domaine transmembranaire (TM) interagissant avec le CD3, un domaine CP (connecting peptide) interagissant avec le CD3 et le CD8, ainsi qu'un pont disulfure (S) permettant la dimérisation du récepteur. Dans la partie la plus externe, une région constante (C) est succédée par une région variable (V) permettant l'interaction avec l'antigène. A l'extrémité se trouve le

*domaine CDR (complementarity-determining region) qui connaît une hypermutation et est à l'origine de la diversité des TCR. (Inspiré de A. Kent et al., 2021 (30))*

La recombinaison V(D)J est le mécanisme par lequel des régions distinctes du génomes codant respectivement des séquences V (variable), D (diversité) ou J (jonction), sont assemblées pour créer une séquence unique. Ceci a lieu précocément dans le développement des LT, alors qu'ils sont encore dans le thymus. Des séquences D et J sont ainsi liées, puis une séquence V est ajoutée en amont. De part et d'autre de chaque séquence V, D ou J, des séquences RSS (recombination signal sequence) permettent la fixation des gènes RAG1 et RAG2 (recombination activating gene). Ceux-ci clivent l'ADN au niveau des sites RSS, constitués de motifs heptamères ou nonamères séparés de 12 ou 23 nucléotides. Ces deux enzymes sont essentielles à la recombinaison V(D)J, puisque la délétion d'une seule d'entre elles est suffisante pour abolir la recombinaison. A la diversité combinatoire des différentes séquences V, D et J s'ajoute une diversité jonctionnelle, due aux mécanismes de réparation de l'ADN qui peuvent ajouter ou supprimer quelques nucléotides entre chaque séquence lors de l'assemblage. De ce fait, une très grande diversité est créée par plusieurs mécanismes successifs, produisant des lymphocytes T capables de reconnaître virtuellement une infinité de motifs antigéniques.

#### **CD4**

Le récepteur CD4 est exprimé à la surface de certains lymphocytes, et permet une reconnaissance du CMH de classe II à la surface des CPA professionnelles (macrophages, cellules dendritiques et lymphocytes B). Les lymphocytes T exprimant le CD4 sont dits "auxiliaires" ou Th (helper). Leur rôle principal est la production de cytokines essentielles à la réponse immunitaire.

Ainsi, les LT Th1 expriment principalement de l'IFN $\gamma$ , du TNF $\alpha$  et de l'IL-2, des cytokines qui permettent entre autres d'activer certaines cellules phagocytaires et d'enclencher une réponse adaptative. En particulier, l'IL-2 produite par les LTh est essentielle aux LT CD8+, puisqu'ils ont une prolifération et différenciation induite par cette cytokine. Les LT CD8+ naïfs ont une très faible affinité pour l'IL-2, cependant lors de leur activation, le récepteur à l'IL-2 connaît un réarrangement qui augmente drastiquement son affinité pour la cytokine: les LT CD8+ prolifèrent. Les Th2 quant à eux synthétisent les interleukines IL-4, IL-5, IL-10, IL-13 et IL-25, améliorant la

prolifération et différenciation des LB et polynucléaires éosinophiles. Les Th9 sécrètent de l'IL-4 et du TGF $\beta$  et sont anti-inflammatoires, alors que les lymphocytes Th17 ont un rôle pro-inflammatoire par le recrutement de polynucléaires neutrophiles suite à la sécrétion d'IL-17, IL-21 et IL-22. Enfin, les Th22 expriment le TNF $\alpha$  et l'IL-6.

Outre ces LT CD4+ classiques, il existe deux autres types de LT exprimant le récepteur CD4: les LT Thf (helper folliculaires) et les iTreg (induced T regulatory cells). Les Thf expriment l'IL-6 et l'IL-21, et les iTreg quant à elles expriment le TGF $\beta$  et l'IL2, elles sont immunosuppressives et permettent d'éviter une réaction trop longue qui pourrait être délétère à l'organisme.

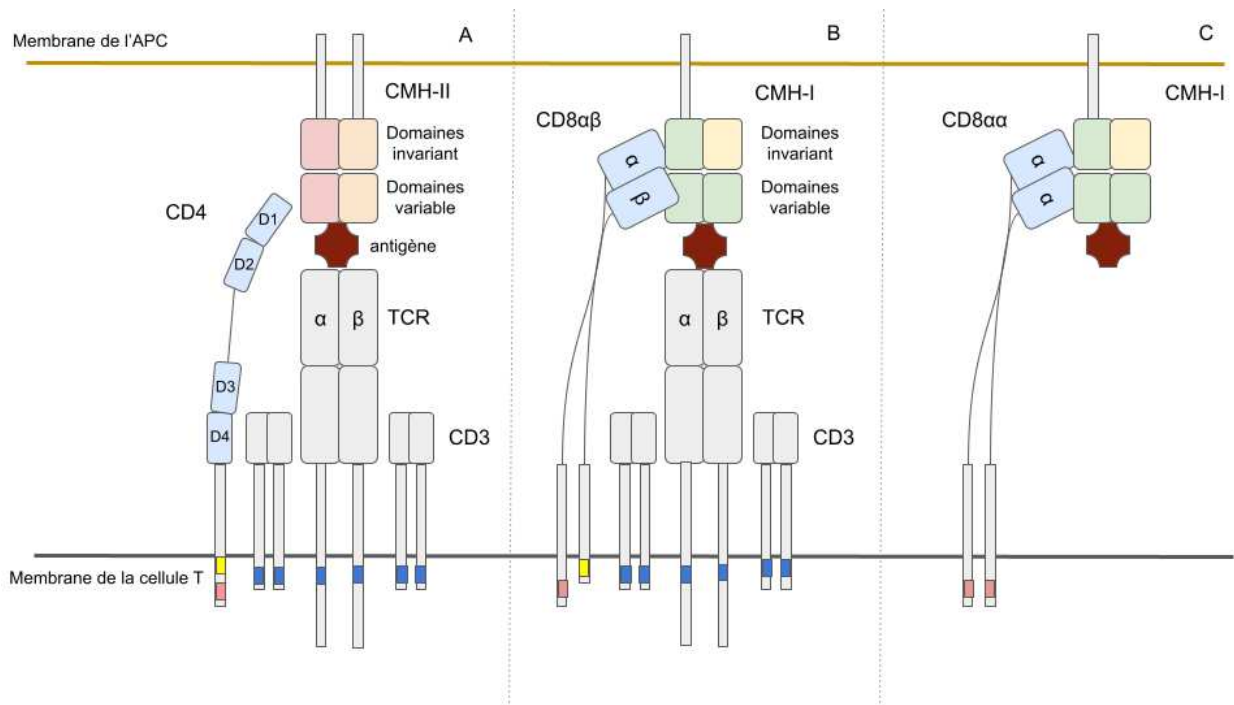
## CD8

Le récepteur CD8 est exprimé à la surface des cellules T cytotoxiques, et permet une reconnaissance des pathogènes présentés par le CMH-I. C'est un hétérodimère composé d'une chaîne  $\alpha$  et d'une chaîne  $\beta$ , ayant une affinité particulière pour la région variable du CMH-I. En s'y fixant, une cascade de signalisation mène au recrutement de ZAP-70 vers le CD3, proche du TCR, ce qui amplifie l'activation des lymphocytes: la chaîne  $\alpha$  permet ainsi une amplification de la signalisation des LT. La chaîne  $\beta$  du CD8 quant-à-elle peut être palmitoylée, ce qui induit le recrutement du complexe TCR-CD8-CD3 vers un radeau lipidique (31). Ces radeaux correspondent à des régions de la membrane plasmiques très riches en sphingolipides et cholestérol, et sont des microdomaines privilégiés pour l'activation des voies de signalisation des cellules T.

De plus, une autre sous-population de LT CD8+ existe mais reste assez peu caractérisée: les CD8 mémoire. Ces cellules sont reconnues chez l'Homme grâce à l'expression du marqueur phénotypique CD45RO, contrairement aux LT CD8+ cytotoxiques qui expriment le CD45RA. L'étude de ces cellules reste cependant très compliquée par le manque de bon modèle d'étude. En effet, pour étudier les spécificités des LT CD8+ mémoires il serait préférable de les comparer à des lymphocytes T CD8+ naïfs reconnaissant le même épitope. Dû à la très faible proportion de cellules naïves, les modèles murins transgéniques exprimant un unique TCR monoclonal ont été préférés pour l'étude (32). Ces souris, une fois immunisées, produisent un plus grand nombre de cytokines pro-inflammatoires très rapidement en

cas de nouveau contact avec l'antigène (33). Ces modèles au TCR unique sont cependant biaisés puisqu'ils sont moins représentatifs de la réalité chez l'Homme. En effet, ils ne permettent pas de représenter la très grande hétérogénéité de phénotypes et de fonctions des cellules T CD8+ mémoire, et commencent désormais à être remplacés par des modèles murins non consanguins (outbred ou "dirty") pour mieux comprendre les mécanismes mis en jeu dans les cellules T CD8+ mémoire (34).

Les structures des récepteurs CD4 et CD8 sont présentées dans la **Figure 11**.



**Figure 11 : Les récepteurs CD4 et CD8**

(A) Le CD4 est composé d'une chaîne unique. Son domaine intracellulaire comporte des séquences de palmitoylation (jaune) et de fixation de kinases telles que le Lck (rose) permettant de phosphoryler les séquences ITAM (bleu, immunoreceptor tyrosine-based activation motifs). Le domaine intracellulaire comporte 4 sous unités "Immunoglobulin-like", dont la partie la plus externe permet la fixation au domaine invariant du CMH-II. Le domaine variable du CMH-II quant à lui se fixe du TCR, qui possède tout comme le CD3 des domaines ITAM permettant une transduction de signal. (B, C) Le CD8 existe sous deux formes, avec l'hétérodimère CD8αβ exprimant une chaîne alpha et une chaîne bêta (B) et un homodimère CD8 αα exprimant deux chaînes alpha uniquement et dont le rôle reste très peu connu (C). En intracellulaire, la sous unité alpha permet une liaison aux kinases Lck, alors que la chaîne bêta permet une palmitoylation. (Inspiré de D. Glatzová et al., 2019 (35))



## 2. Lymphocytes Natural Killers

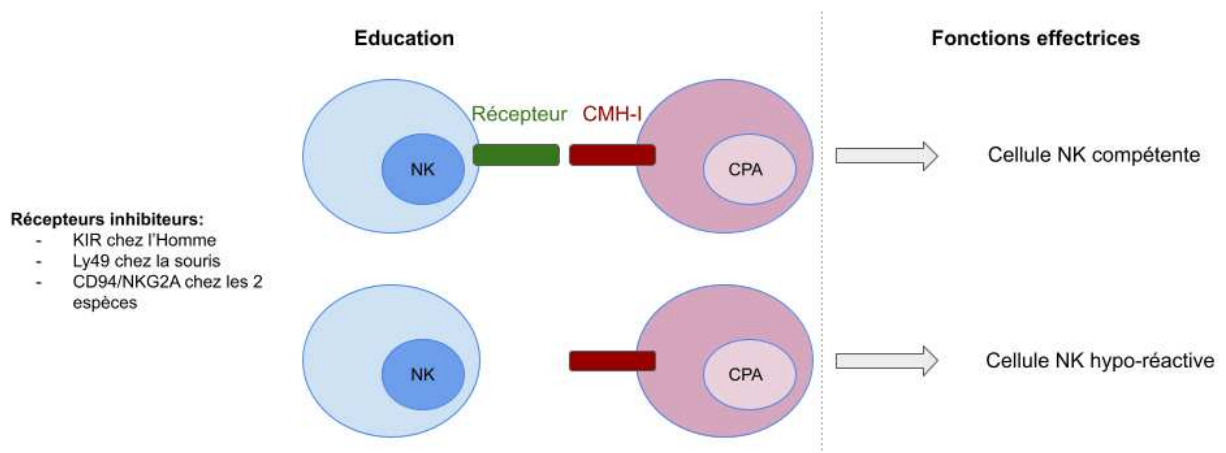
L'existence des cellules NK a été mise en évidence au milieu des années 1970 par deux chercheurs indépendamment: Kiessling et Herberman (36,37). Ces chercheurs ont pu montrer que les NK étaient capables de tuer naturellement et sans nécessité de présentation préalable des cellules cancéreuses: ces cellules ont ainsi été nommées Natural Killers.

### a. Origine

Les cellules NK représentent entre 5 et 20% des lymphocytes circulant chez l'Homme (32). Tout comme les LT, les cellules NK ont pour origine principale des CLP de la moelle osseuse. Cependant, il a récemment été montré que certaines populations de NK avaient pour origine des organes lymphoïdes secondaires ou encore le foie ou l'utérus (39,40). Les CLP, différenciées à partir de CSH CD34+, se différencient elles-mêmes en cellules précurseur des NK grâce à l'expression des facteurs de transcription TOX, NFL3, ID2 et ETS1. Ces cellules sont caractérisées par l'expression des marqueurs CD34+ CD45RA+ CD94- CD117-. A ce stade les cellules ne présentent pas de CD25 (IL-2RA) ni le CD122 (IL-2RB) et ne répondent donc pas à l'IL-2. Suite à cela, l'expression des facteurs de transcription EOMES et TBET leur permet de devenir des cellules NK. Elles présentent alors les marqueurs CD34+ CD45RA+ CD94- CD117+ ainsi que le CD122+, leur permettant de répondre à l'IL-2 et l'IL-15, essentielles à leur prolifération. L'étape suivante du développement des NK intervient suite à la perte des marqueurs CD45RA et CD34, puis l'acquisition des récepteurs activateurs NKG2D(CD314), NKp46(CD335), NKp30(CD337) et CD161, les transformant en NK immatures (iNK). Les iNK exprimant le CD56bright peuvent ensuite perdre ce marqueur et devenir des NK matures CD56dim qui vont commencer à exprimer les marqueurs inhibiteurs CD94/NKG2A et CD16(FcγRIII) et réduire leur expression des marqueurs CD56, c-Kit(CD117), et CD94/NKG2A. Au fur et à mesure de leur différenciation, les cellules NK acquièrent une plus grande toxicité mais perdent en capacité de prolifération. La dernière étape de leur différenciation est liée à l'expression des récepteurs KIR (Killer-cell Immunoglobulin-like Receptor), le type de NK le plus cytotoxique mais avec la plus faible capacité de prolifération.

## b. Éducation, reconnaissance du pathogène et action

Au cours de leur développement, les cellules NK immatures connaissent une phase d'éducation permettant une reconnaissance et tolérance du soi. Cette éducation permet aux futures cellules NK matures de n'attaquer que les cellules infectées ou pathogéniques, et d'éviter une auto-immunité. Les molécules du CMH de classe I sont essentielles à ce processus d'éducation, puisqu'elles se lient aux récepteurs inhibiteurs KIR à la surface des lymphocytes NK immatures. Plus le nombre de liaisons CMH I/KIR est important, plus le seuil de réactivité des NK est bas: les NK reconnaissent alors avec précision les cellules cibles. Cependant, en cas d'absence de signal inhibiteur par absence de CMH-I sur les CPA ou absence de récepteur KIR sur les NK immatures, celles-ci deviennent hypo-réactives et ne sont pas en mesure d'effectuer leur fonction cytotoxique (**Figure 12**).

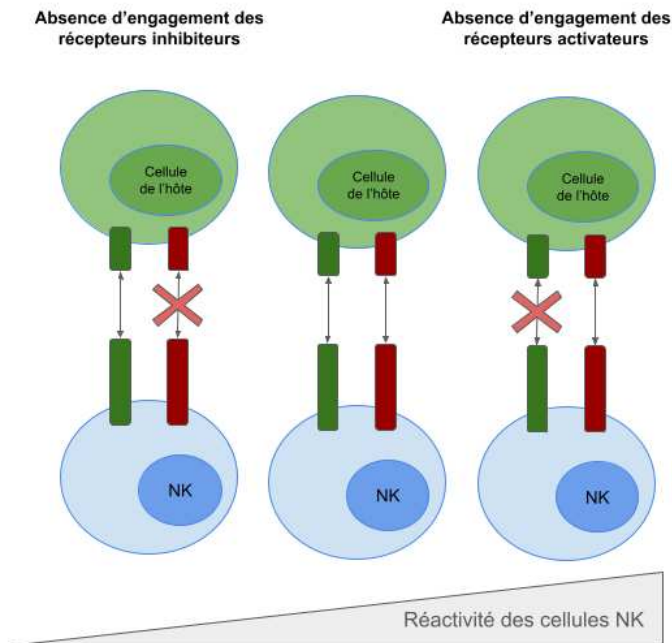


**Figure 12: Le rôle des récepteurs KIR dans la calibration de la réponse NK**

*Le contact entre le récepteur KIR d'une cellule NK immature et le CMH-I d'une CPA permet d'activer leur fonction effectrice: les NK deviennent compétentes. En cas d'absence de ce signal, les NK sont hypo-réactives et incapables d'être cytotoxiques. (Inspiré de E. Narni-Mancinelli et al., 2013 (41))*

En parallèle des signaux inhibiteurs, des signaux activateurs sont aussi nécessaires à l'éducation correcte des NK. En cas d'absence d'engagement des récepteurs activateurs tels que NKp46 ou NKG2D, il a été montré que les cellules NK immatures deviennent hyper-réactives. Il est donc essentiel d'avoir un engagement des récepteurs inhibiteurs

mais aussi des récepteurs activateurs pour l'homéostasie de la réponse NK (**Figure 13**).

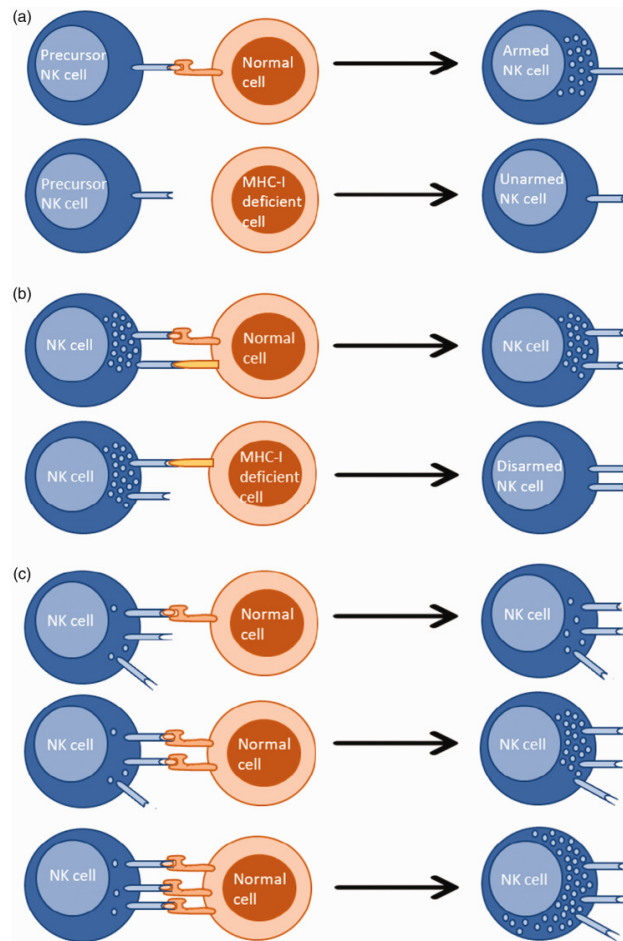


**Figure 13: L'équilibre entre signaux activateurs et inhibiteurs dans la calibration de la réponse des précurseurs NK**

*(Gauche) En cas d'absence d'engagement des récepteurs inhibiteurs (KIR, NKG2A/CD94, en rouge) des cellules NK immatures avec le CMH de l'hôte, la cellule NK est hypo-réactive. (Droite) A l'inverse, en cas d'absence d'engagement des récepteurs activateurs (NKG2D, NKp46, en vert) la cellule NK immature devient hyper-réactive. (Centre) C'est l'engagement des deux récepteurs activateurs et inhibiteurs qui permet une calibration optimale de la réponse des NK. (E. Narni-Mancinelli et al., 2013 (41))*

En résumé, contrairement aux lymphocytes T CD8+, les cellules NK ne reconnaissent donc pas un épitope spécifique à la surface des cellules pathogènes, puisqu'elles ne possèdent pas de TCR. C'est au contraire l'intégration des différents signaux des récepteurs activateurs et inhibiteurs qui est interprété par la cellule NK immatures, et qui déterminera sa capacité à avoir une activité cytotoxique ou une tolérance face à la cellule cible. Un signal inhibiteur leur permet d'être armées, et un signal activateur empêche une réactivité excessive et potentiellement dangereuse pour le soi. Ces signaux sont qualitatifs et quantitatifs, puisqu'un engagement de plusieurs récepteurs inhibiteurs lors de l'éducation par exemple permet une plus grande cytotoxicité des

cellules NK matures. La liaison au CMH est elle aussi essentielle, et en parallèle de ces récepteurs principaux, les cellules NK expriment des récepteurs de co-stimulation et de cytokines essentielles à leur fonctionnement. Les mécanismes responsables de la mise en place des récepteurs des cellules NK ne sont cependant que très peu connus. (Figure 14)



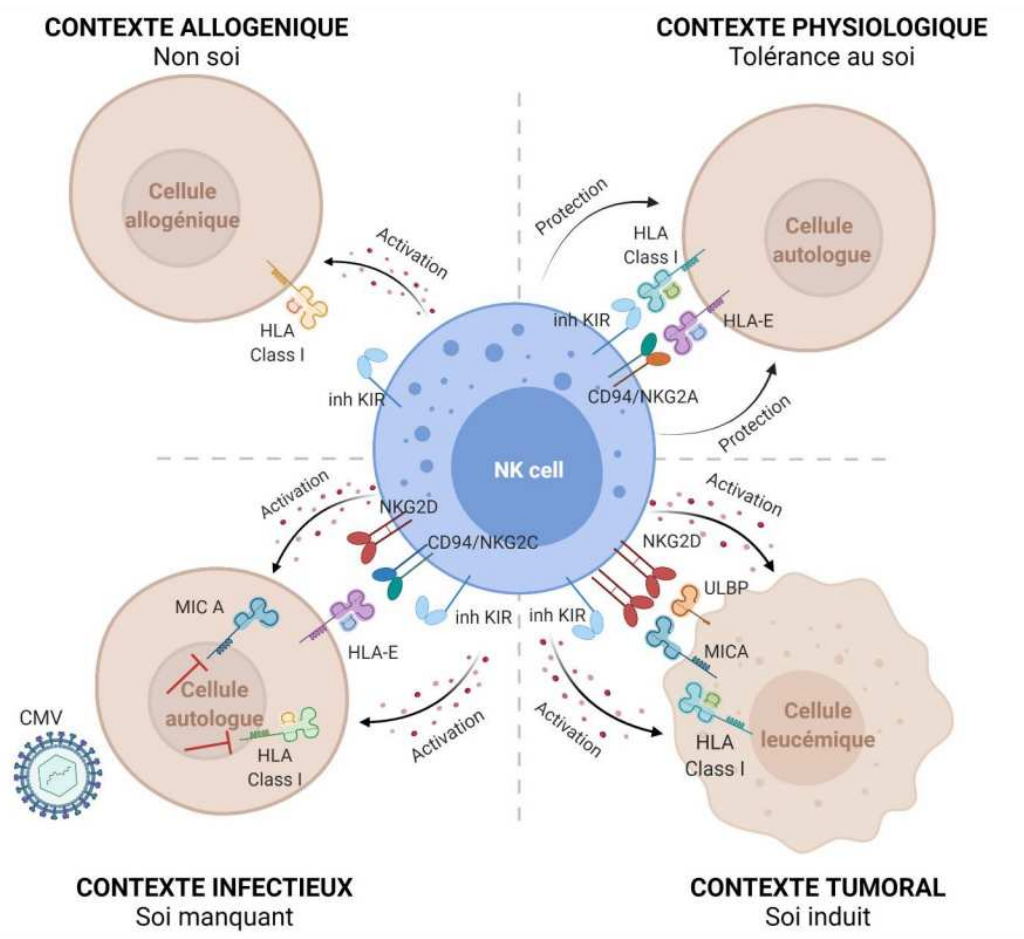
**Figure 14 : Les modèles d'éducation des cellules NK**

(A) Les cellules précurseur NK s'arment après reconnaissance du CMH du soi (Orange). En cas d'absence de ce signal, elles perdent leur potentiel effecteur et sont désarmées. (B) Les cellules matures NK maintiennent leur potentiel effecteur tant qu'elles sont capables de reconnaître le CMH du soi. En cas d'absence de ce signal, les NK matures sont désarmées. (C) Plus les cellules NK interagissent avec un grand nombre de récepteurs inhibiteurs au cours de leur éducation, plus leur fonction effectrice sera efficace. (Perera Molligoda Arachchige AS. et al., 2021 (42))

Suite à leur éducation, les cellules NK sont calibrées et capables de répondre à des signaux de danger. Leur réponse peut alors être de 4 types. (1) Dans un contexte physiologique, une tolérance du soi est mise en place face aux cellules autologues

puisque les récepteurs KIR et NKG2A/CD94 à la surface des cellules NK reconnaissent le CMH du soi. (2) Dans un contexte infectieux, la cellule autologue perd l'expression des molécules HLA de classe I à sa surface: il y a donc un "soi manquant", et les récepteurs inhibiteurs de la cellule NK ne sont pas engagés: elle est activée contre la cellule infectée. (3) Dans un contexte allogénique tel que les greffes, des cellules du non-soi sont présentes dans l'organisme. Les cellules allogéniques expriment un soi différent que les récepteurs inhibiteurs des NK ne sont pas capables de reconnaître. En cas de non-expression du CMH I par les cellules cibles, ou du récepteur KIR correspondant à la surface des cellules NK, celles-ci attaquent la cellule du non-soi. De plus, dans un contexte allogénique, des molécules de stress peuvent être exprimées et permettent d'activer la réponse NK par augmentation de l'expression de récepteurs activateurs. (4) Enfin, dans un contexte tumoral, les molécules HLA de classe I ne sont pas exprimées à la surface des cellules cancéreuses. Cependant, elles peuvent exprimer des molécules telles qu'ULBP (UL16 binding proteins) ou MICA/MICB (MHC class I chain-related proteins A and B) à leur surface, qui sont des ligands de la molécule activatrice NKG2D à la surface des NK. Cette liaison active les cellules NK et leur permet d'éliminer les cellules cancéreuses (**Figure 15**).

Enfin, parmi les récepteurs aux cytokines, le récepteur de l'IL-2 (IL-2R, CD25) est exprimé par les cellules NK lorsqu'elles sont activées. Ce récepteur leur confère alors une plus grande affinité pour l'IL2, une cytokine essentielle à la production de granules riches en Granzyme B et de perforine qui pourront créer un pore dans la membrane des cellules infectées. S'ensuit alors l'activation de la voie des Caspases qui induit une apoptose et lyse de la cellule infectée. Une très grande partie de l'action des cellules NK repose donc sur ce processus.



**Figure 15: Les mécanismes d'activation des cellules NK face à leurs cibles**

*Tolérance du soi: Dans un contexte physiologique, les récepteurs inhibiteurs des NK (KIR, CD94/NKG2A) ont une fonction accrue et inhibent la réponse. Soi manquant: En cas d'absence de reconnaissance du soi par les récepteurs inhibiteurs, les NK sont activés. Soi induit/altéré: En cas de reconnaissances de ligands activateurs du soi induits par le stress (MICA, ULBP), les NK sont activées. Non soi: En cas de reconnaissance d'un CMH du non-soi, tel que pendant une greffe allogénique, les NK sont activées par absence de signaux inhibiteurs. (Dubreuil L., 2021 (21))*

## Résumé du Chapitre 2

- ◆ L'immunité peut être innée ou adaptative, à médiation cellulaire ou humorale.
- ◆ Certains acteurs de l'immunité ont une fonction transversale innée et adaptative.
- ◆ Pour leur activation, les LT ont besoin d'un signal du TCR/CMH ainsi que des co-récepteurs CD3 et CD4/CD8.
- ◆ Les cellules précurseur NK nécessitent un signal activateur et inhibiteur afin de calibrer leur réponse.
- ◆ Dans un contexte tumoral, les cellules cancéreuses peuvent exprimer des protéines de stress capables d'activer la réponse NK et induire leur propre lyse.

# Chapitre 3: Greffe allogénique et réponse immunitaire anti-tumorale

## I. Greffe allogénique de moelle osseuse

La greffe allogénique de moelle osseuse est une opération consistant à transférer à un patient de la moelle osseuse prélevée chez un donneur. Elle est principalement indiquée dans le traitement des hémopathies malignes, telles que les LAM.

### 1. Historique et indications

L'une des premières indications d'un effet d'une greffe de moelle osseuse dans le traitement des leucémies date de 1956. D. W. H. Barnes et al. ont alors irradié une cohorte de souris leucémiques à une dose létale, dans le but d'éliminer toutes les cellules leucémiques, puis ont procédé à une injection de cellules myéloïdes à partir de souris saines de la même lignée (43). Cette greffe, précurseur des greffes allogéniques de moelle osseuses que nous connaissons actuellement, a permis un nouveau tournant dans la manière d'envisager le traitement des leucémies. Les chercheurs de l'étude font alors l'hypothèse qu'il existe deux voies possibles:

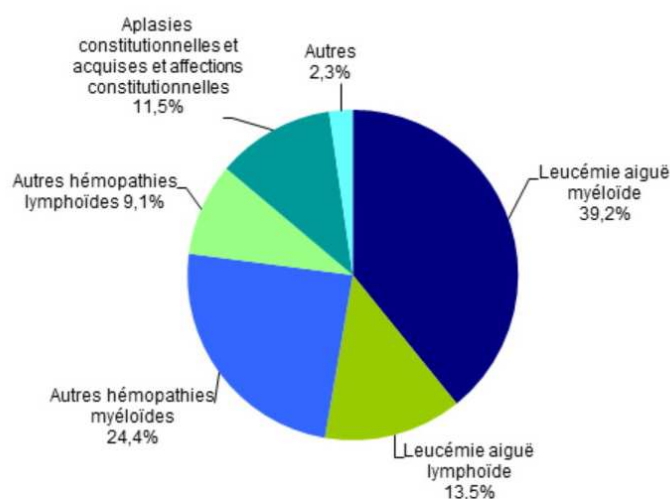
- si la dose de radiations donnée est suffisante pour éliminer toutes les cellules hématopoïétiques alors elle sera sûrement suffisante pour éliminer les cellules cancéreuses, l'animal peut alors être traité par greffe de cellules isologues provenant de souris de la même lignée afin de repeupler la moelle osseuse et produire à nouveau des cellules hématopoïétiques saines.
- si la dose de radiations donnée peut éliminer toutes les cellules hématopoïétiques saines et ainsi tuer l'animal, mais n'est pas suffisante pour éliminer toutes les cellules leucémiques, alors une greffe isologue n'aurait pas d'effet puisque les cellules leucémiques résiduelles recoloniseraient la moelle osseuse avec le temps. Dans ce cas, Barnes et al. font l'hypothèse qu'une greffe allogénique de moelle osseuse provenant d'une autre lignée murine serait capable de reconnaître et éliminer les blastes résiduels chez la souris leucémique, mais aussi de repeupler la moelle osseuse de cellules saines du



donneur. Il existe cependant un risque que la greffe attaque aussi les cellules saines de la souris receveuse, ce qui correspondrait aujourd'hui à un effet du greffon contre l'hôte (GVHD, graft versus host disease).

Ainsi, ils démontrent que 25 souris sur 35 survivent au moins 3 mois après ce type de greffe allogénique, mettant en évidence pour la première fois un effet du greffon contre la leucémie, autrement appelé GVL (graft versus leukemia). La GVHD serait ainsi responsable de la mort des 10 souris restantes, et expliquerait pourquoi les premières greffes faites chez l'Homme à partir de 1957 ont été si peu efficaces. Entre autres, George Mathé et Jean Bernard greffent six physiciens irradiés accidentellement dans un réacteur nucléaire, sauvant ainsi quatre d'entre eux mais perdant les deux autres.

Depuis, il a été démontré que les greffes allogéniques de moelle osseuse représentaient un réel traitement curatif pour la majeure partie des hémopathies malignes, les déficits immunitaires congénitaux ainsi que pour certains types d'anémies (**Figure 16**). Dans le cas des leucémies aiguës myéloïdes, les patients ayant reçu une chimiothérapie et ayant un risque élevé de rechute dû à leurs caractéristiques cytogénétiques peuvent être candidats à une greffe allogénique de moelle osseuse. Cette greffe a ainsi lieu durant la phase de rémission suivant la chimiothérapie, et permet de réduire grandement le risque de rechute.



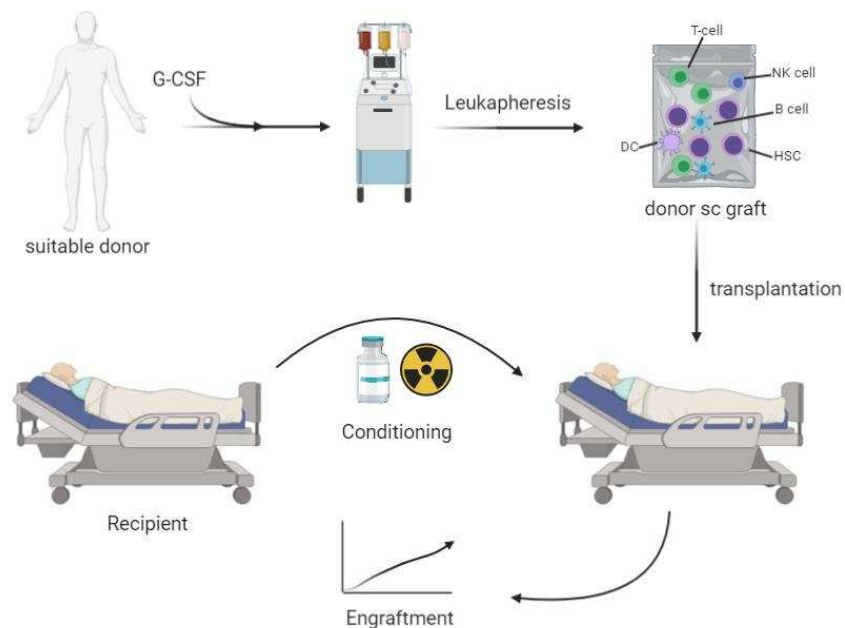
**Figure 16: La répartition des indications d'allogreffe de cellules hématopoïétiques en France en 2021**

Les greffes allogéniques sont principalement effectuées chez des patients atteints d'hémopathies malignes, avec les LAM comme indication principale de greffe. (n=1827 patients, D'après l'Agence de Biomédecine - Base ProMISe - extraction du 7 juin 2022 (44))

L'objectif principal est ainsi de prélever sur le patient lui-même (autogreffe) ou sur un donneur sain (allogreffe) au système immunitaire compatible avec le patient de la moelle osseuse. Nous ne détaillerons ici que les allogreffes. Le prélèvement est greffé au patient leucémique, et permet une reconstitution totale hématopoïétiques et immunitaire par remplacement médullaire, ainsi qu'une reconnaissance et élimination des cellules cancéreuses résiduelles du patient. Ce phénomène est appelé effet du greffon contre la leucémie (graft versus leukaemia, GVL), et est très efficace pour réduire le risque de rechute.

## 2. Paramètres de la greffe allogénique de moelle osseuse

La mise en place d'un effet GVL efficace nécessite la prise en compte d'un grand nombre de paramètres: validation de l'indication, choix du donneur, recueil du greffon et conditionnement (**Figure 17**).



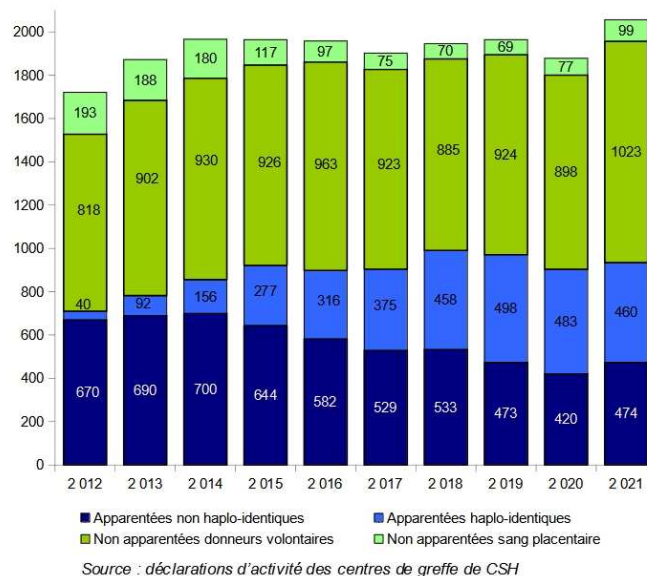
### **Figure 17 : Schématisation de la procédure de greffe allogénique de moelle osseuse**

*Lorsqu'un patient est considéré apte à recevoir une allogreffe de moelle osseuse et qu'un donneur compatible est trouvé, celui-ci reçoit un traitement au GM-CSF afin de mobiliser ses CSH dans le sang. Une leucaphérèse permet de prélever le sang du donneur contenant des CSH et cellules immunitaires, qui est ensuite transfusé au patient qui a reçu au préalable un conditionnement le préparant à la greffe.*

#### **a. Validation de l'indication et choix du donneur**

La première étape d'une greffe allogénique de moelle osseuse repose sur la mise en place d'un bilan visant à évaluer la capacité du patient à être greffé. Un index HCT-CI (Hematopoietic Cell Transplantation-specific Comorbidity Index) peut être calculé en fonction de l'âge, des comorbidités et du risque de complications du patient afin d'éviter les greffes sur des patients incapables d'en supporter la toxicité.

Si le patient est estimé capable de supporter une greffe, l'étape suivante est le choix du donneur. Sachant que les lymphocytes du patient peuvent reconnaître les cellules du greffon et enclencher un rejet, ou qu'au contraire les lymphocytes du greffon peuvent reconnaître les cellules saines du patient comme du non-soi et entraîner une GVHD, le choix d'un donneur compatible est primordial. Bien que le choix privilégié soit un donneur intra-familial aux allèles HLA identiques, aussi appelé géno-identique, cette option n'est pas envisageable pour tous les patients. En effet, même au sein d'une fratrie il existe seulement 25% de chances que deux individus soient géno-identiques. En cas d'absence d'un donneur intra-familial compatible, les registres de donneurs nationaux ou internationaux se révèlent d'une grande aide. Dans l'ordre, on préférera un donneur non apparenté phéno-identique noté 10/10 ("matched"), bien que la probabilité que deux individus non-apparentés aient les mêmes allèles HLA soit faible. Dans de nombreux cas, les patients sont donc greffés à partir de donneurs non apparentés et ayant une différence sur peu d'allèles HLA (entre 9/10 et 5/10, "HLA mismatched"). Ainsi en 2021, on a recensé en France 934 allogreffes à partir de donneurs apparentés contre 1122 à partir de donneurs non-apparentés (**Figure 18**).



**Figure 18: L'évolution du nombre d'allogreffes de CH par type de donneur en France en 2021.**

La majeure partie des allogreffes de cellules hématopoïétiques (CH) en France proviennent de donneurs volontaires non-apparentés, dont la proportion est relativement stable depuis 2012. La proportion de donneurs haplo-identiques non apparentés a cependant augmenté pour devenir en 2019 et 2020 la seconde catégorie de donneurs la plus importante, au détriment des donneurs apparentés non-haplo-identiques. La proportion de greffes à partir de sang placentaire reste quant-à-elle très faible et stable. (D'après l'Agence de la biomédecine (44).)

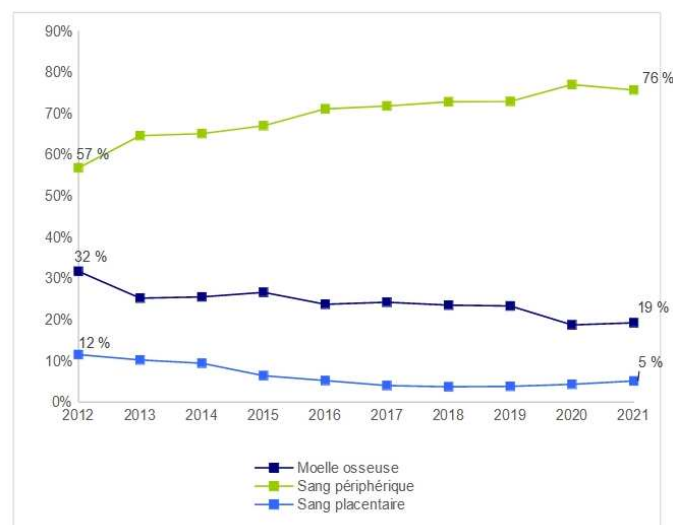
Le calcul de compatibilité HLA est basé sur 5 gènes: HLA-A, -B, -C, -DRB1 et -DQB1. Au total, dix allèles existent pour ces gènes, et une compatibilité 10/10 signifie que les dix allèles pour ces cinq gènes sont identiques entre le donneur et le patient.

En plus de l'histocompatibilité, d'autres facteurs tels que l'âge, le groupe sanguin ou le sexe du donneur sont étudiés afin d'avoir une association optimale entre le patient et le donneur. Par exemple, les greffes à partir de donneurs masculins et jeunes sont privilégiées aux donneuses féminines puisque les grossesses entraînent une variation du système immunitaire de la femme, ce qui peut augmenter l'immunogénicité de la greffe.

## b. Recueil du greffon

Les greffons peuvent être récupérés de trois manières différentes:

- Une aspiration de moelle osseuse du donneur peut s'effectuer sous anesthésie générale, par ponctions à partir des os du bassin généralement.
- Une mobilisation des cellules hématopoïétiques (CH) peut être effectuée par injection de G-CSF (Granulocyte-Colony Stimulating Factor), auquel cas les CH quittent la moelle osseuse et passent dans la circulation sanguine suite à l'attraction du facteur de croissance. Une cytaphérèse permet alors de collecter le sang du donneur contenant les CH, et de les transfuser au patient. Cette méthode de collecte est la plus courante, et représente 76% des allogreffes de CH en France en 2021 par exemple (**Figure 19**).
- Les CH peuvent enfin être prélevées à partir de sang placentaire après l'accouchement et conservées dans une banque de sang de cordon. Cette méthode réduit le risque de rejet de la greffe, mais les cellules greffées étant très immatures, elles nécessitent davantage de temps pour reconstruire un système hématopoïétique complet chez le patient après greffe.



**Figure 19 : L'activité d'allogreffe de CH par type de donneur et d'origine du greffon en 2021 et son évolution depuis 2009 en France.**

*La principale source de greffons pour des allogreffes de cellules hématopoïétiques (CH) provient de sang périphérique mobilisé, suivi par les prélèvements de moelle osseuse en proportion plus de trois fois inférieure. Les greffes de sang placentaire restent très minoritaires, avec une proportion décroissante depuis 2009. (D'après l'Agence de la Biomédecine (44)).*

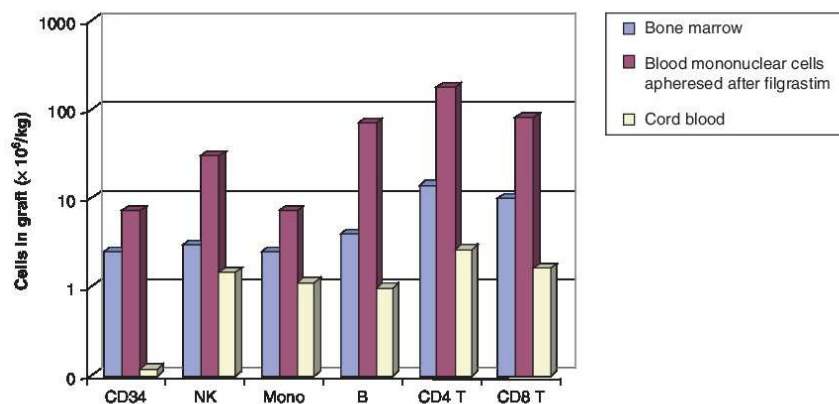
### c. Conditionnement du patient

Lorsqu'un donneur compatible a été trouvé, le patient entre dans une phase de conditionnement (45). Il existe deux formes de conditionnement: myéloablatif (MA) conventionnel ou non-myéloablatif, pouvant être d'intensité réduite. Le choix dépend principalement de l'état de santé globale du patient ainsi que de son âge. Le conditionnement myéloablatif consiste en une chimiothérapie telle que le busulfan ou la cyclophosphamide parfois associée à une irradiation corporelle totale (TBI, total body irradiation). Ceci vise à éliminer au maximum les blastes résiduels chez le patient, mais surtout à réduire le risque de rejet de la greffe et ainsi favoriser la prise de greffe. Le système immunitaire du patient est alors très affaibli puisque ce traitement provoque une aplasie médullaire, c'est-à-dire un manque de cellules sanguines dont font partie les cellules immunitaires. En particulier, le manque de neutrophiles (neutropénie) ou de monocytes (monocytopénie) peut durer deux à trois semaines, alors que la lymphopénie peut durer plusieurs mois, puisque la reconstitution d'une population lymphocytaire mature nécessite plus de temps que la reconstitution myéloïde. Ceci a pour effet d'augmenter drastiquement le risque d'infections chez le patient entre le conditionnement et le moment où la greffe permet de reconstruire le système immunitaire. Pour les patients les plus faibles, ayant en général des comorbidités ou plus de 55-60 ans, un conditionnement non myéloablatif ou d'intensité réduite (RIC, reduced intensity conditioning) est préféré afin de diminuer le risque d'infection et d'affaiblissement du corps. L'aplasie induite est réversible contrairement au conditionnement MA, et repose sur un traitement à la fludarabine et/ou une TBI. Le conditionnement non-myéloablatif reste ainsi moins efficace que le MA, et le risque de rechute est plus élevé. Dans les deux cas, le patient est hospitalisé durant tout le traitement, dans un secteur protégé permettant de réduire les risques d'infection.

### 3. Reconstitution hématologique et immunologique

Suite à une greffe allogénique de moelle osseuse, les cellules du donneur colonisent la moelle osseuse du patient et ses différents organes via la circulation sanguine, et permettent à terme la mise en place d'un nouveau système immunitaire sain. Cette régénération immunitaire a lieu en deux phases.

Durant les premières semaines suivant la greffe, les cellules de l'immunité innée telles que les neutrophiles, NK et monocytes vont rapidement retrouver leurs valeurs physiologiques et mettre en place une première immunité chez le patient. Cependant, la vitesse de rétablissement de cette immunité innée dépend de nombreux facteurs liés au greffon, tels que sa composition en lymphocytes ou en neutrophiles par exemple. Ainsi, l'origine du greffon est primordiale puisqu'il a été montré que le sang périphérique mobilisé contient plus de cellules immunitaires que la moelle osseuse par exemple (**Figure 20**). Les greffons obtenus à partir de sang de cordon quant à eux ne contiennent que très peu de cellules immunitaires matures, et un nombre extrêmement bas de cellules CD34+, associés à un taux de survie sans rechute plus bas dû à une reconstitution beaucoup plus lente du système immunitaire. Ainsi, les neutrophiles sont régénérés à partir de 14 jours lors d'une greffe de cellules du sang périphérique, alors que la durée est de 21 jours pour une greffe de moelle osseuse et environ 30 jours pour un greffon provenant de sang de cordon (46).



**Figure 20: Le contenu en cellules immunitaires de greffons provenant de moelle osseuse, sang mobilisé ou sang de cordon.**

Les doses standard de cellules immunitaires perfusées à partir des trois types de greffons sont indiquées par kg de poids corporel du receveur. Les greffons de sang périphérique contiennent la plus grande quantité de cellules immunitaires, suivis par les greffons de moelle osseuse. Le sang de cordon quant-à-lui ne contient que très peu de cellules immunitaires différenciées, et un nombre très minime de CD34+, expliquant la plus longue période nécessaire à la reconstitution hématopoïétique chez les patients recevant cette greffe. (D'après J. Storek, 2008 (47)).

Par la suite, les lymphocytes B et T CD8 commencent à voir leur nombre augmenter chez le patient greffé, mais ils n'atteindront leurs valeurs optimales qu'après environ 2

à 3 mois. Enfin, les lymphocytes T CD4 ont la vitesse de régénération la plus basse et nécessitent plus d'un an pour retrouver des valeurs optimales. Cette seconde phase de mise en place d'une immunité adaptative est donc extrêmement lente chez les patients greffés, et peut être impactée par des facteurs interventionnels (immunosuppresseurs) ou par des complications (GVHD, infections, rechute). Durant les 100 premiers jours post greffe, le patient est donc particulièrement susceptible aux infections fongiques et bactériennes. De plus, chez les patients âgés le thymus est atrophié, réduisant sa capacité à reconstituer une population de lymphocytes T naïfs à partir des précurseurs présents dans le greffon. Par conséquent, les patients plus jeunes greffés à partir de sang mobilisé avec une grande proportion de cellules immunitaires auront une reconstitution plus rapide. Celle-ci peut toutefois être associée à une GVHD dans le cas où les lymphocytes du greffon attaqueraient les cellules saines du donneur. Tout l'enjeu de la greffe est donc d'équilibrer au mieux tous ces paramètres du donneur, du greffon, et du suivi médical afin d'obtenir les plus grandes chances de survie sans rechute.

#### 4. Réactions allogéniques post-greffe

Suite à la greffe, différents types de réactions allogéniques peuvent se produire chez le patient, pouvant être néfastes comme la GVHD ou bénéfiques comme la GVL. Dans les deux cas, la réaction est principalement médiée par les lymphocytes CD8+ ou NK, avec un faible impact des LT CD4 ou LB.

##### a. GVHD

L'une des complications les plus fréquentes après une allogreffe est la maladie du greffon contre l'hôte (GVHD). Les cellules immunitaires du greffon vont reconnaître des antigènes du receveur comme du non-soi et l'attaquer, ceci étant associé à de nombreux effets secondaires pouvant conduire au décès du patient. Cette pathologie est classée en deux catégories aux symptômes, facteurs de risques et prise en charge différents.

##### GVHD aigüe



Si la GVHD est détectable durant les 100 premiers jours post-greffe alors elle est considérée comme aiguë. Les symptômes associés sont des brûlures ou rougeurs aux extrémités, des éruptions cutanées pouvant toucher le corps entier menant parfois à des ampoules ou desquamations, des troubles digestifs importants tels que diarrhée, crampes abdominales, vomissements, ainsi que des troubles hépatiques pouvant inclure une insuffisance hépatique et la jaunisse. En fonction du nombre et de la gravité des symptômes, la GVHD aiguë est classée en 4 catégories de risque allant du grade 1 associé à des symptômes légers au grade 4 associé à de très graves symptômes.

Ces symptômes ont plus de risques d'apparaître lorsqu'il n'y a pas assez de compatibilité entre le donneur et le receveur, que le receveur n'a pas reçu assez d'immunosuppresseurs après la greffe, ou que la greffe contient une trop grande proportion de lymphocytes du donneur.

### **GVHD chronique**

Lorsque la GVHD se déclare plus de 100 jours après la greffe, elle est considérée comme chronique. Elle peut apparaître à plus ou moins long terme et durer quelques mois voire plusieurs années, avec des symptômes variés. On peut citer des troubles de la peau (brunissement, desquamation, éruptions cutanées), une sécheresse oculaire intense, une sécheresse buccale avec ou sans ulcères buccaux, des troubles digestifs similaires à la GVHD aiguë, ainsi que des infections et difficultés à respirer. La GVHD chronique peut aussi causer des lésions légères ou permanentes aux organes touchés en fonction de sa gravité.

Afin de réduire le risque de GVHD aiguë ou chronique, ou de la traiter une fois apparue, les patients reçoivent après la greffe une combinaison d'immunosuppresseurs tels que la cyclosporine et le méthotrexate, ou encore le tacrolimus. La durée du traitement est adaptée à chaque patient en fonction des symptômes.

### **b. GVL**

L'efficacité de la greffe allogénique de moelle osseuse repose sur l'effet du greffon contre la leucémie, ou GVL (graft versus leukemia) (48,49). Les cellules du donneur, et en particulier les lymphocytes, vont reconnaître des antigènes à la surface des blastes

et les attaquer. Ces antigènes sont, pour la plupart, des MiHA (minor histocompatibility antigens) exprimés à la surface des blastes mais absents de la surface des cellules saines. Ces MiHA proviennent de l'expression de protéines très polymorphes, à la variabilité essentiellement due à des mésappariements de la lignée germinale, induisant un polymorphisme de nucléotides (SNP, single nucleotide polymorphism).

Comme décrit par Sweeney et Vyas (50), différentes observations cliniques démontrent l'importance de la GVL:

- Il existe une anti-corrélation entre l'apparition d'une GVHD et le risque de rechute.
- Les patients traités avec des greffons déplétés en LT (afin d'éviter la GVHD) ont un risque de rechute plus élevé.
- La transfusion de lymphocytes du donneur améliore le pronostic des patients (voir Chapitre 3).
- Le conditionnement des patients avec une intensité réduite (RIC) avant une greffe de moelle osseuse, trop faible pour éliminer à lui seul les cellules leucémiques, permet tout de même une rémission chez un grand nombre de patients due à la GVL.
- Les mécanismes d'échappement des tumeurs au système immunitaire lors des rechutes post-allogreffe démontrent un rôle central des cellules immunitaires et leur description fait toujours l'objet d'intenses recherches

La GVL permet entre autres, lors d'une greffe allogénique de moelle osseuse, d'éliminer les blastes résiduels et non détectables (nommés MRD, minimal residual disease) ayant résisté au traitement. Elle permet ainsi d'augmenter le taux de survie et réduire le risque de rechute des patients atteints de LAM de manière significative. Cependant, elle reste souvent associée à un risque de GVHD pouvant être très dommageable pour le patient. Certaines stratégies d'amélioration de la GVL peuvent aggraver la GVHD, alors que les méthodes de réduction de la GVHD peuvent inhiber la GVL. Ainsi, la séparation de ces deux effets et la mise en place de stratégies de préservation de la GVL sans aggravation de la GVHD est un réel défi pour la communauté scientifique.

## II. Immuno-surveillance et immuno-édition tumorale

### 1. Immuno-surveillance et détection

#### a. Perspectives historiques

La première démonstration d'un effet du système immunitaire contre un cancer a été apportée par William B. Colley, lorsqu'il publie en 1891 un article dans *Annals of Surgery* décrivant plusieurs patients atteints d'un sarcome et ayant spontanément développé un érysipèle (51). Suite à cette infection bactérienne de la peau, leurs tumeurs se sont résorbées au point de totalement disparaître. W.B. Colley cultive alors les bactéries responsables de l'érysipèle et démontre que l'inoculation de cette préparation à des patients conduit à des réponses cliniques remarquables contre ce cancer. En 1893, il publie la première étude clinique reproduisant ce phénomène (52). Il écrivit alors la phrase *"If erysipelas, a disease produced by a specific organism, could cure a case of undoubted sarcoma when occurring accidentally, it seemed fair to presume that the same benign action would be exerted in a similar case if erysipelas could be artificially produced"*, établissant avant l'heure les prémices de l'immunothérapie.

Ces résultats tombent ensuite dans l'oubli jusqu'en 1957, lorsque Paul Erlich, un médecin allemand, démontre l'existence d'une "surveillance immunitaire". Il fait l'hypothèse que des facteurs génétiques induisent continuellement des modifications au niveau des cellules, et que des mécanismes les éliminent avant qu'elles ne deviennent cancéreuses. Erlich ne possède cependant pas les moyens techniques de vérifier son hypothèse, et il sera nécessaire d'attendre le développement des premiers modèles murins de sarcome pour que d'autres chercheurs ajoutent un élément primordial à cette hypothèse. Gross (1943), Foley (1953), et Prehn et Main (1957) démontrent qu'après un traitement au MCA (méthylcholanthrène) les souris développent un carcinome. Cependant, une inoculation à très faible dose d'extraits de tumeur permet quant à elle de créer une immunité contre la tumeur. Ils énoncent alors que la tumeur est probablement "immunologiquement distincte" du tissu sain. La dernière pièce a été ajoutée par le Dr Lewis Thomas, utilisant pour la première fois le terme d'immuno-surveillance pour décrire l'action du système immunitaire pour détecter et éliminer les cellules cancéreuses.

Le concept d'immuno-surveillance a plus tard été décrit par Schreiber comme étant composé de trois étapes (53). Tout d'abord, le système immunitaire est capable d'**éliminer** les cellules cancéreuses alors qu'elles se développent. Cependant, dans une grande partie des cas la phase d'élimination ne permet pas de supprimer toutes les cellules tumorales. Ces dernières prolifèrent, et durant un temps il existe un **équilibre** entre les blastes et le système immunitaire qui cohabitent chez l'hôte. Enfin, les cellules cancéreuses peuvent posséder des caractéristiques leur permettant d'être résistantes et ainsi d'**échapper** au système immunitaire. Celui-ci ne permet plus de combattre la tumeur, et celle-ci prolifère.

## b. Les acteurs de l'immuno-détection

La communauté scientifique a supposé pendant longtemps que les lymphocytes permettaient d'empêcher le développement primaire des tumeurs lors des premières étapes de leur progression, ayant ainsi un effet protecteur chez l'hôte immunocompétent. Depuis, il a été démontré à de nombreuses reprises que les lymphocytes T sont les principales cellules médiatrices de l'immunosurveillance tumorale. C'est ainsi que Shankaran et al. ont utilisé le un modèle de souris RAG2-/- afin de tester le rôle des cellules T. En effet, les souris déficientes pour le gène RAG2 (recombination activating gene 2) ou RAG1 son partenaire obligatoire sont incapables d'effectuer le réarrangement somatique des récepteurs aux antigènes (TCR et BCR), et ne produisent donc pas de lymphocytes T ou B. Les gènes RAG n'étant exprimés que dans la lignée lymphoïde, leur absence permet d'étudier un effet des lymphocytes sur la progression tumorale sans impacter la présence des autres cellules immunitaires de l'organisme et en fait un modèle de choix. Ainsi, un traitement au MCA a été effectué sur des souris RAG2-/-, induisant le développement d'un sarcome chez 30/52 souris au lieu de 11/57 chez les souris RAG2+/+ après 160 jours (54). La même expérience a été reproduite chez des souris déficientes pour RAG1, avec des résultats similaires. De plus, des souris n'exprimant pas de lymphocytes T  $\alpha\beta$ , T  $\gamma\delta$ , ou NK forment significativement plus de tumeurs que les souris contrôles sauvages respectives (55-57). Wang et al. ont ainsi montré dans un contexte de LAM portant la translocation MLL-AF9 que des souris immunodéficientes développent une leucémie plus rapidement que leurs contrôles immunocompétents (58). Les lymphocytes NK sont actifs très tôt grâce à leur rôle dans l'immunité innée, puis sont suivis par une action

des LT plus tardive. Les lymphocytes semblent donc avoir un rôle dans la surveillance immunitaire et la détection des cellules cancéreuses, médiée par des fonctions effectrices.

### c. Les fonctions effectrices principales de l'immuno-surveillance

A l'origine de l'immunosurveillance se trouve la capacité des cellules T et NK à reconnaître et éliminer les cellules cancéreuses dès leur détection, grâce à leur action cytotoxique. Dans le cas des cellules NK, la perforine (pfp) est un effecteur essentiel de la réponse, puisqu'il a été montré que des souris déficientes *Pfp*<sup>-/-</sup> développent deux à trois fois plus de tumeurs que des souris contrôles *Pfp*<sup>+/+</sup> lorsqu'elles étaient traitées au MCA (59–62). La réponse est cependant dépendante de la voie de signalisation de l'interféron gamma (IFN- $\gamma$ ). Ainsi, l'action des lymphocytes dans la surveillance tumorale est principalement basée sur deux éléments, leur action cytotoxique et la production de la cytokine IFN- $\gamma$  (54).

L'IFN- $\gamma$  est une cytokine essentielle à la réponse anti-tumorale, qui participe à l'immunité innée et adaptative. Produite par les lymphocytes innés (NK, ILC-1, NK-T) et adaptatifs (CD4<sup>+</sup> Th1, CD8<sup>+</sup>), elle se lie à son récepteur ancré à la surface des cellules phagocytaires. Ce récepteur est composé de deux chaînes IFN- $\gamma$ R1 permettant la fixation de deux molécules d'INF- $\gamma$ , ainsi que deux chaînes IFN- $\gamma$ R2. La fixation du dimère d'IFN- $\gamma$  sur son récepteur permet aux Janus kinases JAK1 et JAK2, continuellement fixées dessus, de s'activer et ainsi phosphoryler l'IFN- $\gamma$ R1. Ceci conduit à la phosphorylation de STAT1 (Signaling Transducer and Activator of Transcription), un facteur de transcription qui se dimérise, transloque vers le noyau, et permet la transcription de nombreux gènes régulant le cycle cellulaire, l'apoptose ou encore la différenciation (63). La voie JAK/STAT est à la fois activée par de nombreuses cytokines (IFN- $\gamma$ , IL-10, IL-12, IL-15...), mais permet aussi d'activer elle-même en retour la production de cytokines (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-12, Granzyme B...). Par conséquent, la voie de l'IFN- $\gamma$  peut induire une activation des cellules NK et phagocytaires (polynucléaires neutrophiles, cellules dendritiques, macrophages), ainsi

qu'une augmentation de l'expression du CMH-I et CMH-II, stimulant ainsi la présentation d'antigènes et la réponse immunitaire. L'IFN- $\gamma$  peut aussi agir en liaison avec le TNF afin d'activer les macrophages, bien que le TNF soit lui-même cytotoxique et capable d'induire l'apoptose des cellules tumorales par liaison à son récepteur de mort TNF-R1.

Dans un contexte oncogénique, des anticorps monoclonaux dirigés contre l'IFN- $\gamma$  ont permis dès les années 90 de mettre en évidence une augmentation de la vitesse de prolifération de la tumeur, et ainsi un rôle crucial de cette molécule dans la réponse anti-tumorale. Parallèlement, des souris déficientes pour l'IFN- $\gamma$  sont plus sensibles au carcinogène MCA, et une absence d'expression des récepteurs à l'IFN- $\gamma$  ou à STAT1 entraîne une augmentation de 10 à 20 fois de la sensibilité au MCA (61,64,65). De plus, il a été montré que l'IFN- $\gamma$  pouvait induire l'expression de p16 et p21, deux molécules essentielles afin d'inhiber le cycle cellulaire et induire l'apoptose des cellules tumorales (66,67). L'activation IFN- $\gamma$ -dépendante de STAT1 permet aussi d'induire la voie des caspases-1, -3 et -8 ainsi que le récepteur de mort cellulaire FAS aboutissant à l'apoptose de la cellule tumorale ou infectée (68–70). Dans le cas des LAM, un essai clinique est actuellement en Phase I dans le but de tester si l'administration d'IFN- $\gamma$  (Actimmune®) chez des patients en rechute post-allogreffe de moelle osseuse permet de promouvoir une GVL (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT04628338). Le traitement est effectué en monothérapie ou en conjonction avec une infusion de leucocytes du donneur, et administré trois fois par semaine. Dans cette étude pilote, des biopsies de moelle osseuse pré- et post- traitement permettront d'évaluer l'activation de la voie de l'IFN- $\gamma$  (expression du CMH-I, CMH-II, STAT1, et la molécule d'adhésion des leucocytes et cellules endothéliales ICAM-1, permettant leur migration).

#### d. Distinction des cellules transformées vs progéniteurs sains

La distinction efficace entre les cellules saines et néoplasiques est un réel enjeu pour l'organisme. Très tôt, des antigènes spécifiques exprimés à la surface de cellules cancéreuses ont été mis en évidence. En 1994, Noguchi et al. ont ainsi immunisé des souris avec un peptide muté de la protéine p53, puis ont récupéré leurs lymphocytes CD8+. Mis en contact avec des cellules HLA-matched mais exprimant le même peptide

muté de p53, les LT ont été capables de les lyser. Outre ce mécanisme dépendant du CMH, les cellules NK sont capables de reconnaître des peptides exprimés par les cellules tumorales tels qu'ULBP et MICA, qui se lient au récepteur activateur NKG2D à la surface des cellules NK.

Ces marqueurs spécifiques sont nommés antigènes associés aux tumeurs (TAA, tumor associated antigens) lorsqu'ils ont une faible spécificité pour la tumeur, ou antigènes spécifiques aux tumeurs (TSA, tumors specific antigens) lorsqu'ils y sont très associés. Tous deux proviennent majoritairement de la grande instabilité génétique tumorale conduisant à l'expression de ces antigènes à partir de protéines mutées. Chronologiquement, les cellules NK sont les premières capables de détecter les cellules transformées, de présenter aux cellules dendritiques les TAA/TSA, qui conduiront à la présentation des peptides aux LT afin d'induire une réponse immunitaire adaptative contre les cellules tumorales. Dans le cas des LAM, de nombreux TAA/TSA ont été mis en évidence tels que WT1, Survivin, CD33 ou encore CD123 (voir Chapitre 3-III).

Cependant, ces marqueurs ne sont pas toujours exprimés ou peuvent être perdus lors du développement tumoral, les cellules cancéreuses ne sont alors pas assez pro-inflammatoires pour déclencher une réponse immunitaire ou y deviennent résistantes. De plus, des cancers apparaissent même chez des patients immunocompétents, indiquant que l'efficacité de l'immunosurveillance n'est pas toujours suffisante et que la tumeur développe des mécanismes permettant de résister : c'est l'échappement tumoral.

## 2. Immuno-édition tumorale et échappement

L'échappement tumoral peut être de deux types: l'immuno-sélection ou l'immuno-subversion.

### a. Immuno-sélection

L'hétérogénéité et l'instabilité génétique des cellules tumorales favorisent l'apparition de plusieurs clones aux caractéristiques différentes subissant une sélection darwinienne. Certains blastes, soit de manière innée soit à la suite de modifications dans la tumeur, deviennent très peu immunogènes. Au cours de la phase d'équilibre,

les cellules les plus immunogènes sont éliminées par l'organisme alors que les moins immunogènes ne sont pas détectées et peuvent proliférer librement, de manière non-régulée par l'organisme: c'est l'immuno-sélection.

Ainsi, certaines des cellules tumorales n'expriment pas ou très peu de TAA/TSA et sont alors indétectables par le système immunitaire. La croissance tumorale devient encore plus efficace lorsqu'un des clones devient incapable de répondre à l'IFN- $\gamma$ . En présence de cette molécule, ces cellules tumorales n'augmentent donc pas l'expression du CMH-I et deviennent indétectables par les LT CD8+. Dans le cas des LAM, les mécanismes d'échappement au système immunitaire de l'hôte restent très peu connus à ce jour. Dans les LAM, de nombreux TAA ont été mis en évidence, mais très peu de TSA existent puisque la plus grande partie des antigènes exprimés par les blastes sont aussi exprimés par les cellules saines (71). Les lymphocytes qui les reconnaissent ont donc une très faible affinité contre ces antigènes qu'ils considèrent comme du soi.

Un autre mécanisme répandu d'immuno-sélection repose sur la perte d'expression du CMH par des clones tumoraux. En effet, le CMH n'étant pas essentiel à la survie des cellules, les clones tumoraux qui perdent ou réduisent l'expression du CMH survivent mieux puisqu'ils ne sont pas reconnus par les LT et échappent ainsi à l'immunosurveillance et à l'élimination par l'organisme. Une absence de CMH-I par exemple empêchera l'activation des LT CD8+ et favorisera donc une absence d'activité cytotoxique contre la tumeur (72-74). Cependant, la perte d'expression du CMH-I est très rare dans les LAM, bien qu'elle reste associée chez les patients à une leucocytose au diagnostic et pourrait permettre un échappement immunitaire (75-77). La réduction d'expression du CMH-II quant à elle a été observée chez des patients leucémiques et associée à une rechute post-greffe de moelle osseuse (17 sur 34 patients testés) (78). Les mécanismes sous-jacents de cette perte d'expression du CMH-II ont été grandement étudiés au cours des dernières années. Gambacorta et al. ont récemment démontré que l'expression de PRC2 (polycomb repressive complex 2) par les cellules leucémiques était associée à un remodelage de la chromatine réduisant son accessibilité. L'inhibition pharmacologique de PRC2 permet cependant de rétablir l'expression du CMH-II ainsi qu'un effet GVL, faisant de cette protéine un facteur épigénétique clé de l'immuno-sélection.



Il a été montré que les cellules NK pouvaient reconnaître et éliminer les cellules ayant perdu l'expression de leur CMH-I (voir Chapitre 2-III). La perte du CMH-I doit cependant être associée à l'expression de récepteurs activateurs à la surface de la cellule pour induire une activation des NK. Dans un contexte tumoral, la perte d'expression par les cellules cancéreuses de récepteurs activateurs de la réponse immunitaire, tels que le NKG2D, va donc inhiber la réponse innée anti-tumorale par absence d'activation des cellules NK (79). Chez les patients atteints de LAM, il a été montré que leurs cellules NK ont une diminution d'expression des récepteurs activateurs tels que NKp46, NKp30, NKp44, corrélée à une capacité cytotoxique très faible (80).

Enfin, dans un contexte inflammatoire, les cellules NK sont capables d'éliminer certaines cellules dendritiques et LT afin d'éviter une inflammation excessive et délétère. Dans les LAM, il a été montré que les cellules NK pouvaient perdre cette capacité, ayant pour conséquence l'accumulation des LT et cellules dendritiques tolérogènes, ainsi qu'une inflammation excessive aboutissant à un épuisement des cellules immunitaires (81).

## b. Immuno-subversion

Le second mécanisme, l'immuno-subversion, permet de dévier activement la réponse immunitaire contre les lymphocytes eux-mêmes et ainsi éviter qu'ils n'attaquent les cellules tumorales.

Lors de la phase d'équilibre, une balance existe entre la proportion de cytokines anti-tumorales telles que l'IL-12 et l'IFN $\gamma$ , et les cytokines pro-tumorales telles que l'IL-10 et l'IL-23. Lorsque la proportion des cytokines pro-tumorales devient plus importante, l'organisme entre dans la phase d'échappement et connaît un réarrangement important du microenvironnement tumoral. Les cellules cancéreuses produisent des cytokines immuno-suppressives telles que l'IL-10, VEGF, TGF- $\beta$  ou le GM-CSF. Par ailleurs, en fonction du microenvironnement, certaines cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-6 et IL-1 $\beta$ , peuvent avoir un effet immunosuppresseur, et participer à l'inhibition de la réponse immunitaire de l'organisme. Le facteur de transcription NF- $\kappa$ B est inhibé, ce qui bloque la différenciation et la maturation des cellules dendritiques. Le TGF- $\beta$  est exprimé et

bloque lui aussi la maturation des DC, en plus d'avoir une action inhibitrice sur les LT et NK en favorisant la conversion des LT CD4+ naïfs en Treg (82). Ces Treg produisent à leur tour de l'IL-10 et du TGF- $\beta$  et ont la capacité d'inhiber la plupart des cellules immunitaires. De plus, la production accrue de GM-CSF et d'IL-1 $\beta$  entre autres par les cellules tumorales permet une prolifération importante des cellules immuno-suppressives d'origine myéloïde (MDSC, Myeloid Derived Suppressor Cells) qui vont inhiber les LT cytotoxiques et activer les Treg (83). Ces cytokines permettent aussi d'activer STAT3, qui empêche la différenciation myéloïde et induit la transcription de protéines pro-tumorales et anti-apoptotiques telles que c-myc, Bcl-xL, ou encore la cycline D1. Enfin, un microenvironnement inflammatoire et une inflammation excessive sont connus pour promouvoir la croissance tumorale. Par ailleurs, l'IL-6 et le TGF- $\beta$  produits en grande quantité par les cellules tumorales induisent l'activation des lymphocytes pro-inflammatoires Th17, qui permettent la production de VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) favorisant ainsi l'angiogenèse, essentielle à la croissance des tumeurs solides. Dans les LAM pédiatriques, la sécrétion de VEGF par les blastes est corrélée avec un risque plus élevé de rechute (84).

Outre les cytokines, l'immuno-subversion passe aussi par l'expression accrue de récepteurs de co-inhibition appelés points de contrôles immunitaires (IC, immune checkpoint). De nombreux IC exprimés par les LT CD4+ et CD8+ ont été mis en évidence, dont les plus importants sont PD-1, TIGIT, TIM-3, LAG3 et CTLA-4. Lors de la liaison de ces co-récepteurs avec leurs ligands respectifs (PD-L1/2, CD112/155, Gal-9, CMH-II et CD80/86 (B7.1/.2)) exprimés à la surface des blastes, l'activité des LT est inhibée, permettant ainsi la survie des cellules tumorales.

Dans les LAM, tout comme dans les tumeurs solides, R.M. Teague et al. (85) décrivent plus généralement que l'échappement tumoral repose sur la combinaison de plusieurs mécanismes tels que :

- l'établissement d'un microenvironnement métaboliquement hostile (86,87).
- une mauvaise costimulation des cellules T par les cellules tumorales conduisant à une anergie des cellules T (88).
- l'expression de ligands de costimulation négatifs tels que PD-L1 dans l'environnement tumoral (89,90).

- la production de cytokines et d'enzymes immuno-suppressives (91,92).
- l'expansion et/ou l'induction de types de cellules suppressives (Tregs et MDSC)(93,94).

Ces mécanismes peuvent être présents dès le début du développement tumoral, ou apparaître plus tard, et permettre aux cellules qui les expriment de survivre et proliférer de manière plus efficace que les autres. Les blastes induisent ainsi une tolérance centrale et périphérique. La tolérance centrale repose ici sur l'expression de TAA présents aussi à la surface des cellules saines induisant une absence d'engagement des cellules immunitaires contre la tumeur qu'ils considèrent comme le soi. La tolérance périphérique, plus complexe, repose sur la création d'un micro-environnement immuno-suppresseur inhibant les cellules immunitaires matures normalement capables de combattre la tumeur.

### **III. Immunothérapies anti-tumorales et optimisation de la réponse GVL**

Le traitement des LAM a pendant très longtemps reposé sur une chimiothérapie intensive, puis a été complété par de nouvelles approches ciblées à travers les régulateurs épigénétiques tels que les agents hypométhylants, ou encore des molécules inhibitrices. Ces dernières années, la vision générale du traitement des LAM a été amenée à évoluer pour tirer profit du système immunitaire afin de traiter la maladie. Ces traitements, nommés immunothérapies, reposent sur la stimulation des lymphocytes du patient ou l'infusion de nouvelles cellules immunitaires capables d'induire un effet du greffon contre la leucémie (GVL). Les possibilités thérapeutiques sont virtuellement infinies et de nombreux essais cliniques très prometteurs sont déjà en cours afin de tirer avantage des avancées de la recherche.

#### **1. Identification de cibles thérapeutiques**

L'identification d'antigènes utilisables afin de cibler les blastes leucémiques est complexifiée par différents facteurs, puisque l'antigène idéal doit: (1) être fortement exprimé à la surface des blastes leucémiques, (2) être exprimé de manière constante

dans au moins une (ou plusieurs) sous-catégorie LAM, (3) ne pas être exprimé à la surface des cellules saines de l'organisme, et (4) être exprimé à la surface des cellules initiateuses de la leucémie telles que les progéniteurs ou cellules souches leucémiques afin d'éradiquer complètement la pathologie à sa source. Les antigènes regroupant toutes ces caractéristiques sont très rares, et la plus grande majorité sont également exprimés à la surface des cellules hématopoïétiques saines, pouvant induire de sévères complications post-traitement telles qu'une myélosuppression. Certaines cibles ont cependant été identifiées et semblent être des candidats potentiels, tels que:

- WT1 (Wilms' tumor 1) : WT1 est un facteur de transcription impliqué dans la régulation de la croissance cellulaire et la différenciation (95–97). Sa surexpression ou mutation dans les LAM est associée à la présence de cellules au phénotype très immature, à un taux de prolifération élevé et à une résistance accrue à la chimiothérapie. Il est cependant très peu exprimé à la surface des cellules saines, ce qui en fait un candidat de choix pour les immunothérapies. De plus, parmi ses 36 peptides immunogènes, Doubrovina et al. ont montré que 29 pouvaient être reconnus et ciblés par des LT spécifiques de WT1 alors que les cellules saines étaient épargnées, suggérant un ciblage préférentiel des cellules tumorales (98).
- Survivine : La Survivine est un membre de la famille des inhibiteurs de l'apoptose (IAP) exprimé chez 60% des LAM de l'adulte. Il a été démontré que la Survivine empêche l'apoptose et permet la réparation de l'ADN dans les cellules de LAM, ce qui pourrait contribuer à la croissance agressive et à la résistance à la chimiothérapie observées dans cette maladie (99,100).
- PRAME (preferentially expressed antigen in melanoma) et MAGE (melanoma-associated antigen): Dans les LAM, PRAME et MAGE ont des rôles très similaires mais non liés, puisqu'ils permettent une inhibition de l'apoptose en régulant l'activité des caspases, ainsi qu'une augmentation de la croissance et réparation de l'ADN des blastes (97). Différents essais cliniques en monothérapie ou en combinaison à une chimiothérapie ont montré que l'inhibition de PRAME ou MAGE permettait une induction de l'apoptose ainsi qu'une inhibition de la prolifération cellulaire. De nouveaux essais cliniques

sont en cours afin de tester des candidats-vaccins, ainsi que des LT aux TCR spécifiques de ces TAA.

- CD33 : Cette protéine transmembranaire est un récepteur de surface exprimé sur les cellules myéloïdes dont les blastes de LAM. Récemment, le gemtuzumab ozogamicin (GO) a été approuvé par la FDA comme traitement ciblé contre les LAM CD33+. Cependant, chez les patients les plus âgés la toxicité contre les cellules saines reste trop importante avec une efficacité très limitée. De plus, une étude a récemment montré que cibler CD33 avec le GO pouvait mener à un échappement tumoral par immuno-sélection des clones n'exprimant pas le CD33.
- CD123 (interleukin-3 receptor alpha chain) : CD123 est un récepteur transmembranaire exprimé à la surface des cellules souche hématopoïétiques ainsi que des progéniteurs myéloïdes (101). Son expression est accrue dans les blastes de LAM ainsi que les cellules initiateuses de leucémie (Leukemia Initiating Cells, LIC), et est associée à un risque de rechute très élevé ainsi qu'un faible taux de survie.

Outre ces gènes très exprimés dans les cellules leucémiques mais ayant aussi une certaine expression dans les cellules saines, les néo-antigènes ouvrent une voie alternative pour identifier de nouvelles cibles. En effet, lors de leur développement, les cellules tumorales peuvent acquérir des mutations leur conférant un avantage sélectif. Ces mutations peuvent aboutir à l'expression de protéines mutées, et ainsi à la création de néo-antigènes qui ne sont exprimés qu'à la surface des blastes et pas sur les cellules saines. Ces antigènes, nommés TSA, sont reconnus par des LT ayant une très forte cytotoxicité puisqu'ils ne sont pas soumis à une sélection thymique, contrairement aux LT spécifiques des TAA qui, puisque les antigènes reconnus sont aussi exprimés par certaines cellules du soi, sont moins cytotoxiques. Chen (2017) a montré qu'il existait une forte corrélation entre la charge tumorale en néo-antigènes et la charge mutationnelle, elle-même associée à la réponse aux immunothérapies et au taux de survie des patients (102,103). Ainsi, l'expression des TAA NPM1 muté ou FLT3 muté par les cellules tumorales peut induire une réponse des LT CD8+ cytotoxiques contre

les blastes, qui sont reconnus et éliminés par ces lymphocytes, ce qui en fait des cibles potentielles pour les sous-catégories de patients exprimant ces mutations (104–106).

Enfin, les miHA (minor histocompatibility antigens) sont des peptides extrêmement polymorphes présentés par le CMH, souvent issus de SNP (single nucleotide polymorphism). Ils peuvent ainsi être reconnus par les LT et déclencher une réponse immunitaire. Dans les greffes, même si le donneur et le patient sont compatibles au niveau de leur complexe majeur d'histocompatibilité, les antigènes mineurs d'histocompatibilité (miHA) peuvent différer, causant ainsi un rejet de greffe à plus long terme qu'une incompatibilité de CMH. Ainsi, dans les LAM, si un patient reçoit une greffe HLA-matched avec une incompatibilité au niveau d'un miHA, les LT du donneur vont pouvoir reconnaître et attaquer les blastes, dans une réaction de GVL. Si le miHA est aussi exprimé à la surface des cellules saines, une GVHD sera enclenchée puisque les LT vont attaquer les tissus sains du patient. Cependant, il a été montré par Marijt et al. (2003) que cibler des miHA exclusivement exprimés à la surface des cellules hématopoïétiques tels que le HA-1 ou HA-2 permettait d'induire une GVL efficace sans pour autant induire une GVHD sévère (107,108). Différents essais cliniques ont ainsi montré le potentiel du ciblage des miHA dans les LAM récurrentes (NCT03326921), R/R (NCT04464889) ou de risque élevé (109).

## 2. DLI: Donor Lymphocytes Infusion

L'infusion de cellules T du donneur (DLI, donor lymphocyte infusion), est une forme d'immunothérapie basée sur la transfusion à un patient de cellules d'un donneur sain compatible. Dans les LAM, la DLI peut être employée après une greffe allogénique de moelle osseuse afin de réduire le risque de rechute et accroître la réponse GVL(110–112). Les mécanismes restent peu connus, mais une partie repose sur la réversion de l'épuisement des cellules T (T-cell exhaustion) observé après une greffe de moelle osseuse par l'augmentation de l'expression de PD1, TIM3 et CTLA4 entre autres (113,114).

La DLI présente de nombreux avantages. Tout d'abord, contrairement aux chimiothérapies ou radiothérapies, la toxicité reste minimale et est bien tolérée sur le long terme par les patients (115). De plus, la flexibilité du traitement en fait une thérapie adaptable puisqu'elle peut être donnée en une fois ou par injections

successives, en monothérapie ou accompagnée d'autres thérapies complémentaires en fonction de l'état du patient. Un des défis des greffes allogéniques est la rechute post-transplantation et sa prise en charge: la DLI est alors une solution envisageable qui a montré ses effets en induisant une rémission complète chez certains patients (116,117). Une étude sur 339 patients en rechute post-allogreffe, dont 43% ont reçu une DLI, a montré un réel avantage de la transfusion avec une survie à 2 ans de 21% avec DLI contre seulement 9% sans.

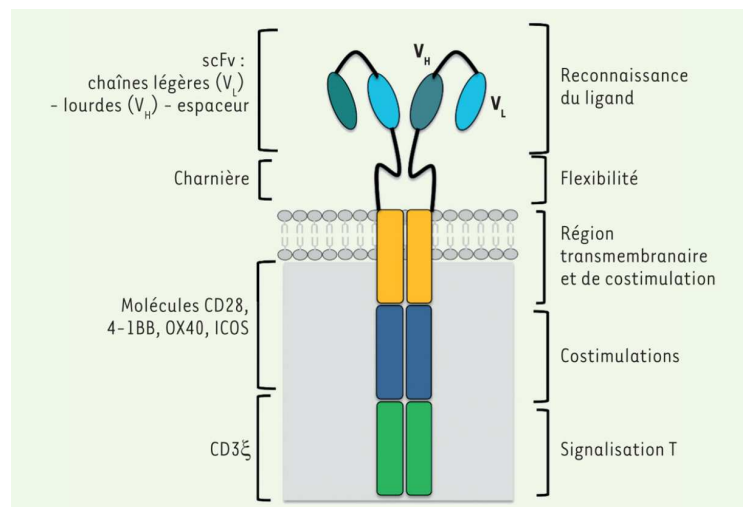
Cependant, comme beaucoup d'immunothérapies cellulaires, elle est accompagnée d'un risque de GVHD puisque les lymphocytes infusés ont la capacité de reconnaître les cellules saines du patient et de les attaquer. Afin de réduire ce risque de complications, les patients reçoivent en général un traitement immunosuppresseur. De plus, le succès de la DLI dépend de plusieurs facteurs, notamment de l'état immunitaire du patient, de l'étendue de la leucémie résiduelle et du type et du nombre de lymphocytes perfusés. Par conséquent, une sélection minutieuse des patients, une surveillance étroite et un perfectionnement de la manipulation des cellules avant la transfusion sont nécessaires pour assurer la sécurité et l'efficacité de la DLI chez les patients atteints de LAM (118).

### 3. Cellules CAR-T

Parmi les immunothérapies cellulaires, le développement des cellules CAR-T (chimeric antigenic receptor T-cell) au cours des dernières années est un réel espoir pour les patients atteints de leucémie. Ces cellules sont des LT qui proviennent du sang du patient lui-même et collectées par leucaphérèse, puis sont modifiées génétiquement et amplifiées afin d'accroître leur sensibilité aux antigènes tumoraux, et finalement re-perfusées au patient. Tout comme avant une greffe de moelle osseuse, le patient reçoit des immunosuppresseurs, avec en général une combinaison de fludarabine et de cyclophosphamide.

Le récepteur membranaire des cellules CAR-T est composé de plusieurs domaines (**Figure 21**). En extracellulaire, le CAR possède un domaine scFv (fragment simple chaîne d'anticorps) de reconnaissance du ligand, en général le CD19, ainsi qu'un domaine charnière permettant une flexibilité utile à la détection d'antigènes. La région transmembranaire permet un ancrage du récepteur à la membrane, alors qu'en

intracellulaire un domaine de co-stimulation permet l'expression de molécules telles que le CD28, OX40 ou ICOS. En intracellulaire, le CAR possède aussi un domaine de signalisation T permettant une transduction du signal lors de l'activation du récepteur. Différentes générations de CAR ont été développées, avec pour variation le nombre de signaux de co-stimulation et leur nature. La 4ème génération permet la production de cytokines telles que l'IL-12, induisant la sécrétion d'IFN- $\gamma$ , alors que la 5ème génération va permettre d'activer directement certaines voies de signalisation essentielles au fonctionnement des LT, avec par exemple l'expression de la chaîne bêta du récepteur à l'IL-2 (IL-2R $\beta$ ) au sein du domaine intracellulaire du CAR, permettant une activation de la voie JAK/STAT3-5.



**Figure 21: Les récepteurs chimériques d'antigènes (CAR)**

*Les récepteurs des cellules CAR-T sont composés de différents domaines ayant chacun une fonction précise. En extracellulaire, le scFv (fragment simple chaîne d'anticorps) permet une reconnaissance du ligand, et le domaine charnière permet une flexibilité. Le récepteur est ancré à la membrane par une région transmembranaire. En intracellulaire, un domaine de co-stimulation permet une expression de molécules co-activatrices telles que le CD28, 4-1BB, OX40 ou encore ICOS, et un domaine de signalisation permet la transduction du signal (en général, le domaine intracellulaire de la chaîne CD3 $\zeta$ ). (D'après V. Catros, 2019(119))*

Dans les LAL et LLC (leucémie lymphoïde chronique), les cellules CAR-T ont démontré une réelle efficacité (120–122). Celle-ci reste cependant très limitée dans les LAM pour différentes raisons:

- Le manque de TSA spécifiques des LAM (LSA, Leukemia specific antigens).



- La persistance des cellules CAR pouvant entraîner soit un épuisement du système immunitaire et son inactivation, soit une myéloablation persistante chez le patient.
- L'immuno-édition permettant aux cellules leucémiques de perdre l'antigène ciblé par les CAR, tel que le CD19, et ainsi que proliférer sans être détectées (123).
- La production très complexe de CAR-T à partir de cellules de patients leucémiques, notamment dû à une inhibition de l'expansion des LT par les blastes et l'environnement immuno-suppresseur.

Certains essais cliniques en cours sont cependant très prometteurs, tels que celui mené au City of Hope Medical Center (NCT02159495) par injection de CAR-T de seconde génération ciblant le CD123. Cette étude de Phase I a été menée sur 31 patients atteints de LAM en rechute ou réfractaire (R/R) ou de néoplasie des cellules dendritiques plasmacytoïdes. Parmi les 6 patients atteints de LAM R/R, 2 ont reçu une dose faible de 50 millions de CAR-T, et 4 ont reçu une dose forte de 200 millions de CAR-T. Suite à l'injection de la dose faible, 1 patient sur 2 a connu une rémission morphologique, lui ayant permis de recevoir une seconde injection de CAR-T après 3 mois. Suite à cela, le patient a connu une chute de la charge blastique passant de 77.9% à 0.9%. Pour les patients ayant reçu une dose élevée, 2/4 sont entrés en rémission complète et ont pu recevoir une greffe de moelle osseuse, alors que les 2 autres ont connu une rémission partielle (124,125). Aucun effet myéloablatif n'a été détecté chez les patients, et le SRC (syndromes de relargage cytokiniques) présenté par les patients a été léger et contrôlable (4 grade 1 et 1 grade 2). Cette étude, première chez l'homme à avoir testé dans CAR-T ciblant le CD123, démontre le potentiel de cette immunothérapie dans le traitement des LAM.

D'autres études très récentes ont démontré la possibilité d'utiliser de nouvelles cibles, telles que le CD70, pour développer des cellules CAR-T. Cette molécule est classiquement exprimée par les LT activés, et par liaison à son récepteur CD27, permet une co-stimulation et le déclenchement de signaux de survie cellulaire. Le CD70 peut cependant être exprimé par les blastes dans certaines LAM, ce qui augmente leur résistance aux thérapies. Leick et al. (2022) ont ainsi développé une approche qui

combine un traitement pharmacologique par AZA, permettant d'augmenter l'expression du CD70 à la surface des cellules myéloïdes, et une injection de cellules CAR-T modifiées pour stabiliser leur liaison au CD70. Ces CAR-T ont ainsi montré une liaison plus importante à leur ligand, ainsi qu'une activité cytotoxique très importante *in vivo* (126). De plus, pour contrer la perte de TAA par les blastes, de nouvelles cellules CAR-T bispécifiques permettent désormais de cibler deux antigènes tumoraux à partir d'un seul type de cellules CAR T. X. He et al. ont ainsi montré que des CAR T ciblant CD13 et TIM3, des antigènes très exprimés dans les LAM, permettait d'éliminer les blasts *in vitro* et *in vivo*. Dans les cellules saines, TIM3 est principalement exprimé dans les LT épuisés et très peu dans les CSH, ce qui expliquerait la cytotoxicité très réduite de cette approche. Ces études montrent donc que le développement des CAR-T est essentiel à l'avancée des immunothérapies anti-cancéreuses et pourraient devenir une part importante de l'avenir des traitements anti-leucémiques, bien que la découverte de nouvelles cibles et le perfectionnement des CAR soient nécessaires.

#### 4. Cellules NK

Les cellules NK ont une capacité naturelle à reconnaître les cellules infectées et à les éliminer, elles sont ainsi un allié redoutable dans les traitements anti-leucémiques (127,128). De nombreuses stratégies sont donc envisagées pour tirer profit des caractéristiques de ces cellules, menant à des essais pré-cliniques ou cliniques aux résultats préliminaires encourageants. Comme démontré par Myers et Miller (129), les cellules NK peuvent provenir de différentes sources telles que: le patient lui-même (autologue), un donneur haplo-identique, du sang de cordon, des lignées cellulaires de NK, des cellules souches dérivées en NK (iPSC, induced pluripotent stem cells), ou encore de CAR-NK suivant la lignée des cellules CAR-T. Pour toutes ces sources, outre la production ou l'expansion des cellules NK, la limitation majeure repose sur les mécanismes d'évasion de la tumeur au système immunitaire. Ainsi, forcer le contact entre une cellule NK et des blastes leucémiques permettrait d'augmenter l'efficacité de la réponse. Des molécules dites d'engagement bi- ou tri-spécifiques (TriKE, Tri-specific killer cell engager) ont ainsi été développées à partir de fragments dérivés d'anticorps spécifiques d'antigènes tumoraux et permettant de forcer cette liaison.

En Janvier 2023, la société Innate Pharma (sponsorisée par Sanofi) a publié dans un article des données précliniques démontrant le rôle d'un TriKE ciblant les LAM (nommé IPH6101/SAR'579 ou SAR443579 )(130). Cet anticorps engage les récepteurs NKp46 et CD16a à la surface des cellules NK, ainsi que le CD123 à la surface des blastes. Cette étude montre que l'expression du CD64 (récepteur à l'IgG) à la surface des blastes inhibe la cytotoxicité induite par les anticorps anti-CD123 (ADCC, antibody dependent cell cytotoxicity) in vitro. Cependant, l'expression des NK cell engagers permet de lever cette inhibition par l'action couplée des récepteurs NKp46 et CD16a, induisant une très forte réponse immunitaire contre les cellules leucémiques. Cette réponse induit la production de cytokines et l'activation des NK seulement en présence de blastes leucémiques, de manière ciblée et très peu toxique. D'après les auteurs, chez le primate non-humain, la déplétion du CD123 par ce NK-cell engager n'a montré aucun signe de toxicité et une inflammation très réduite due à la spécificité de l'activation (130). Un essai clinique est ainsi en cours chez des patients atteints de LAM R/R, B-ALL ou MDS à haut risque, afin de déterminer la dose limitante évitant une toxicité, ainsi que l'efficacité du SAR443579 (NCT05086315).

## 5. Anticorps recrutant des lymphocytes

Au cours des dernières années, en plus des anticorps monoclonaux tels que le lintuzumab (anti-CD33) et des anticorps conjugués à des toxines tels que le gemtuzumab ozogamicine (anti-CD33) ou les IMG632 et SL-401 (anti-CD123), de nouveaux types d'anticorps artificiels ont été développés et promettent de devenir une part essentielle dans les traitements anti-cancéreux. Parmi eux, les BiTEs ont été les mieux décrits.

Les BiTEs sont des anticorps monoclonaux bi-spécifiques (Bi-specific T-cell engager), c'est-à-dire qu'ils reconnaissent deux peptides spécifiques: l'un à la surface des blastes (TAA), l'autre à la surface des LT (molécule CD3). Ils sont ainsi capables de se fixer aux deux cellules en même temps et former un pont, forçant un rapprochement entre le blaste et la cellule T, ce qui accroît son activité cytotoxique (131). De plus, cet effet est très rapide et indépendant du CMH et des molécules de co-stimulation, évitant ainsi les mécanismes d'immuno-évasion tumoraux tels que la perte du CMH-I (132,133). Différents traitements ont été mis en place afin de tester ces anticorps dans les cancer

solides tels que le Tebentafusp dans le mélanome uvéal (ClinicalTrials.gov Identifiers: NCT05315258, NCT03070392), ou encore le Blinatumomab dans certains cas de leucémie aiguë lymphoblastique, tous deux approuvés par la FDA (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT02393859).

Dans les LAM, différents BiTEs ont été développés. La cible la plus courante est le CD33, exprimé par les blastes mais aussi par environ 30% des cellules hématopoïétiques saines. Cependant, il a été montré *in vitro* que l'incubation de LT avec des cellules saines CD34+ autologues en présence ou absence de BiTE CD33xCD3 ne modifiait pas significativement le potentiel des cellules à former des colonies (CFU assay). De plus, l'injection de ces cellules saines dans des souris préalablement irradiées NOD/SCID IL2Ry permettait l'établissement d'un chimérisme similaire dans les deux groupes (134,135). Différents essais cliniques de Phase 1 chez des patients en LAM R/R ont débuté afin de tester la tolérance et l'efficacité de ces composés (AMG330: NCT02520427, AMG673: NCT03224819, AMV564:NCT03144245, GEM333: NCTT03516760, (136)). Les premiers résultats sont encourageants malgré un taux très élevé d'événements adverses lors du traitement tels que le syndrome de relargage cytokinique (SRC)(137), menant à une production aberrante d'IL-6, IFN- $\gamma$  et TNF- $\alpha$ , une activation excessive du système immunitaire et finalement des dommages systémiques d'une très grande ampleur chez le patient (vomissement, diarrhées, dommages hépatiques, tachycardie...).

D'autres cibles telles que le CD123, CLEC12A ou encore FLT3 sont aussi en cours d'analyse (138,139). Pour ce dernier, une récente étude de Brauchle et al. a démontré une augmentation de la cytotoxicité des LT ainsi qu'une réduction de la charge blastique et une augmentation du taux de survie chez la souris. Chez le primate non-humain (*Macaca fascicularis*), le traitement a induit l'élimination des cellules FLT3 positives dans le sang et la moelle osseuse. L'ensemble de ces résultats, ainsi que le développement de dérivés plus complexes des BiTEs ayant une plus grande spécificité tels que les DARTs (Dual affinity re-targeting), BiKes (bi-specific NK cell engager), ou TriKes (tri-specific NK cell engager), ouvre la voie vers de nouveaux traitements ciblés, bien que le risque de SRC soit encore très élevé à l'heure actuelle. A terme, ces thérapies basées sur des anticorps poly-spécifiques pourraient permettre de modifier

l'action des cellules effectrices T et NK afin de rendre leur activation plus rapide, durable et efficace contre les LAM.

## 6. Immunisation spécifique de la leucémie

L'une des causes principales de la rechute post-traitement est la persistance de cellules leucémiques (en général des cellules souches leucémiques ou cellules initiatrices de leucémie) indétectables, un phénomène nommé maladie résiduelle minimale (MRD, minimal residual disease). La greffe allogénique de moelle osseuse, avec son effet GVL, est la stratégie principale pour lutter contre ce phénomène mais elle reste principalement accessible aux patients de moins de 60 dû au risque de morbidité. Pour les patients de plus de 60 ans, une autre stratégie employée pour réduire cette MRD repose sur les vaccins thérapeutiques, particulièrement à base de cellules dendritiques (DC, dendritic cells).

Les DC ont une capacité à reconnaître et présenter à leur surface les antigènes tumoraux, afin d'activer une réponse des LT cytotoxiques. Cependant, les TAA/TSA sont rares et les DC ne représentent qu'1% des cellules mononuclées circulantes (PBMC, peripheral blood mononucleated cells). Ainsi, l'injection d'un vaccin contenant un grand nombre de DC chargées en antigènes tumoraux pourrait permettre d'augmenter la présentation d'antigènes au LT, et par conséquent promouvoir une réponse immunitaire plus forte contre la leucémie.

Les DC autologues ne sont pas assez nombreuses pour être collectables, ainsi on privilégie la collecte de cellules précurseurs des DC (monocytes ou blastes leucémiques) qui seront différenciées in vitro à l'aide de GM-CSF et IL-4 puis chargés en antigènes tumoraux et administrés au patient. Dans le cas des blastes, les cellules sont irradiées avant d'être injectées au patient afin d'éviter une amplification de la LAM (140–142). Leur avantage principal face aux monocytes est qu'elles gardent l'entièreté de leur panel d'antigènes leucémiques, induisant ainsi une réponse théoriquement plus forte que les vaccins à base de monocytes dérivés. Cependant, cette piste d'immunothérapie est peu à peu abandonnée puisque la différenciation des cellules s'avère très peu efficace et extrêmement variable. De plus, il a été montré que les vaccins à base de dérivés de cellules leucémiques avaient la capacité d'inactiver la

réponse immunitaire en induisant une forte activation des Treg, et donc une tolérance immunitaire (143).

## 7. Inhibiteurs de points de contrôle immunitaires

Les points de contrôle immunitaires (checkpoints immunitaires, CI) sont un ensemble de récepteurs et ligands associés qui permettent de réguler la réponse immunitaire dans le but d'éviter un engagement excessif et ses effets adverses sur l'organisme. Lors du développement tumoral, les blastes peuvent utiliser à leur avantage ces points de contrôles pour échapper à la réponse immunitaire. Ainsi, des inhibiteurs de ces points de contrôle (ICI) ont été développés afin de bloquer leur action inhibitrice.

L'une des molécules les plus importantes est PD1 (Programmed Cell Death 1), un récepteur exprimé à la surface des LT. Lorsque la cellule tumorale exprime son ligand PD-L1, il se lie au récepteur PD1, activant différentes voies de signalisation (PI3K/AKT et Ras/MAPK) aboutissant à l'expression de Bcl-xL et ERK 1/2 qui augmentent la survie cellulaire, la prolifération ainsi que la production de cytokines. Les inhibiteurs de cette voie de signalisation sont donc extrêmement pertinents dans le traitement des cancers. Différents essais cliniques ont donc utilisé des inhibiteurs de PD1 tels que le nivolumab ou pembrolizumab, ou des inhibiteurs de PD-L1 tels que le durvalumab, combinés ou non avec un agent hypométhylant (azacytidine). A ce jour, l'effet bénéfique de ces traitements dans les LAM est significatif (33% de réponse), bien qu'il induise chez certains patients une toxicité immune pouvant conduire au décès (144). Dans le cas de la molécule CTLA-4 et de ses ligands B7.1/2, le traitement par ipilimumab a montré un taux de réponse très élevé de 59%, bien qu'il conduise aux mêmes effets adverses que les anti-PD1.

Comme décrit précédemment, le recrutement de MDSC est un élément important permettant l'évasion des cellules tumorales. Ainsi, l'inhibition de ces cellules immuno-suppresseurs pourrait permettre d'améliorer la réponse anti-tumorale. Dans les lymphomes, il a été montré que des molécules comme la gemcitabine ou le 5-fluorouracil sont capables d'induire une apoptose des MDSC avec une très grande spécificité, permettant une augmentation de la sécrétion d'IFN- $\gamma$  par les LT-CD8+ (145,146).

Ainsi, chacune des thérapies décrites possède un fort potentiel anti-tumoral, bien qu'à l'heure actuelle aucune ne soit suffisamment efficace seule. La combinaison d'une immuno-thérapie avec une chimiothérapie ou radiothérapie, ou encore avec une autre immuno-thérapie est de plus en plus envisagée. L'objectif est de cibler différents acteurs de l'immunité d'une part, et d'autre part d'induire un effet immuno-modulateur. En effet, il a été montré par exemple que la radiothérapie et certaines chimiothérapies comme les anthracyclines (doxorubicine, mitoxantrone, ou oxaliplatine) pouvaient induire une immunité anti-tumorale par un processus nommé mort cellulaire immunogène (MCI) (147,148). Contrairement à l'apoptose, une mort cellulaire programmée non-immunogène, la MCI induit une expression de calréticuline à la surface des blastes de manière précoce, molécule reconnue par les cellules dendritiques qui vont être capables de détecter la cellule tumorale et la phagocyter. L'association de plusieurs traitements est donc essentielle à la prise en charge optimale des patients atteints de LAM.

## Résumé du Chapitre 3

- ◆ Les allogreffes de moelle osseuse sont principalement indiquées dans les LAM pour leur effet GVL.
- ◆ L'efficacité de la GVL dépend de nombreux paramètres du patient, du greffon et de la prise en charge médicale.
- ◆ L'immuno-surveillance est un processus efficace mais faillible, principalement dû à l'échappement tumoral.
- ◆ Les immunothérapies anti-leucémiques en développement sont très variées et ciblent principalement l'épuisement des cellules immunitaires, la résistance à la mort cellulaire des blastes et des LIC ainsi que leur perte d'expression du HLA.
- ◆ Les immunothérapies actuelles ont montré un très grand potentiel anti-leucémique par une amplification de l'effet GVL. Cependant, des études supplémentaires restent nécessaires afin d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques et de réduire les risques de morbidités dues aux traitements, pour optimiser la réponse GVL chez les patients.



---

# Objectifs

---

Les LAM restent l'un des sous-types de leucémies au plus mauvais pronostic pour les patients, principalement dû au risque très élevé de rechute après traitement. La principale méthode utilisée pour réduire ce risque de rechute consiste en une greffe allogénique de moelle osseuse, où l'on prélève de la moelle sur un donneur sain qu'on transfuse au patient leucémique. Par cette méthode, le risque de rechute passe de 75 à 40%, ce qui est significativement mieux mais signifie qu'il reste 40% des patients qui rechutent toujours. L'objectif principal de mon projet de thèse a ainsi été d'identifier les acteurs moléculaires de la réponse GVL, dans le but de les moduler afin d'optimiser l'efficacité de la réponse GVL.

Pour ce faire, notre travail s'est découpé en deux parties.

## **1) Développement d'un modèle murin de réponse GVL**

Tout d'abord, nous avons développé et caractérisé un modèle murin pré-clinique de GVL dans un modèle leucémique portant la translocation MLL-AF9. Cette translocation représente environ 20% des LAM pédiatriques et environ 5% des LAM de l'adulte. Elle est capable d'induire à elle seule la transformation de cellules progénitrices GMP en cellules leucémiques très agressives. En effet, l'injection de ces blastes chez des souris permet d'induire une LAM létale en 14 jours, avec une infiltration très importante dans la moelle osseuse, le sang et les organes les plus irrigués tels que la rate. Ce modèle, d'une grande reproductibilité, a donc été choisi dans notre étude.

En parallèle, nous avons tiré avantage du modèle murin MataHari qui permet l'expression de lymphocytes T-CD8+ monoclonaux dirigés contre un antigène mineur d'histocompatibilité présent à la surface de toutes les cellules mâles (antigène H-Y lié à la présence du chromosome Y). En effet, les souris MataHari sont déficientes pour le gène *Rag2* qui est essentiel à la recombinaison des TCR et immunoglobulines. Ces souris ne sont donc naturellement pas capables de produire des lymphocytes B ou T matures. Cependant, les souris MataHari expriment en supplément un transgène leur permettant l'expression d'un seul et unique TCR : le TCR anti-H-Y. Ainsi, ces souris produisent uniquement des lymphocytes T-CD8+ monoclonaux, tous dirigés contre cet

antigène mâle. A partir de la rate de ces souris, il est possible d'obtenir une préparation contenant les lymphocytes MataHari qui seront activés puis amplifiés *in vitro* afin d'obtenir une population cellulaire presque entièrement constituée de lymphocytes MataHari activés.

Ainsi, il nous a été possible d'injecter des blastes leucémiques mâles dans des souris receveuses femelles préalablement irradiées, puis d'injecter quelques jours plus tard les lymphocytes MataHari dans ces mêmes souris receveuses afin d'induire une réponse GVL. Dans ce contexte, toute la réponse des lymphocytes est dirigée exclusivement contre les seules cellules mâles en présence: les blastes leucémiques. Ce processus mime ainsi une thérapie cellulaire dirigée contre un unique antigène, et a été validé par différentes méthodes décrites dans l'article qui suit.

## **2) Identification des acteurs moléculaires impliqués dans la résistance à la GVL**

Suite à la validation du modèle de thérapie cellulaire, nous avons voulu identifier les caractéristiques des cellules leucémiques qui résistent à l'effet GVL. Pour ce faire, nous avons développé un modèle de blastes portant la translocation MLL-AF9 entièrement résistants à la GVL. Ce modèle a ensuite été étudié par des analyses transcriptomiques afin d'identifier les gènes ou groupes de gènes importants pour la résistance à la GVL, et ainsi cibler ces vulnérabilités afin de re-sensibiliser les blastes à l'action de la thérapie cellulaire.

L'objectif principal de ce projet est donc d'améliorer la compréhension des mécanismes de la réponse GVL à travers le développement d'un modèle murin novateur, afin de réduire le risque de rechute chez les patients leucémiques ayant reçu une thérapie cellulaire.

---

# Résultats

---

## Article non-publié

### **MLL-AF9-driven GVL-resistant blasts upregulate gene signatures associated to the erythroid lineage**

**AUTEURS:** Chaïma Benaksas-Kabeche, Mathilde Rieux-Laucat, Nicolas Ayas, Duong Ho Nhat, Emmanuelle Latour, Paul-Arthur Meslin, Frank Ling, Matthieu Duchmann, Lois Kelly, Camille Vaganay, Paolo Ayaka, Ronan Thibaut, Philippe Bousso, David Michonneau, Raphaël Itzykson, Camille Lobry, Alexandre Puissant.

**ÉTAT:** En préparation.

**JOURNAL:** NA

# MLL-AF9-driven GVL-resistant blasts upregulate gene signatures associated to the erythroid lineage

Chaïma Benaksas-Kabeche, Mathilde Rieux-Laucat, Nicolas Ayas, Duong Ho Nhat, Emmanuelle Latour, Paul-Arthur Meslin, Frank Ling, Matthieu Duchmann, Lois Kelly, Camille Vaganay, Paolo Ayaka, Ronan Thibaut, Philippe Bousso, David Michonneau, Raphaël Itzykson, Camille Lobry, Alexandre Puissant.

## ABSTRACT

Allogeneic-hematopoietic stem cell transplantation (allo-HSCT) is a major curative treatment for hematologic malignancies, and in particular for Acute Myeloid Leukemia (AML). This treatment relies on the capacity of the donor's lymphocytes to detect and kill the patient's residual blasts, termed Graft *versus* Leukemia effect (GVL), therefore eliminating the minimal residual disease (MRD) and reducing the risk of relapse. However, some patients relapse even after an allo-HSCT. The mechanisms of this GVL response are not yet fully understood and need to be uncovered in order to leverage its full potential. Our team developed a preclinical GVL mouse model that recapitulated features observed in AML patients. Our study suggests that GVL-resistant blasts can exhibit erythroid-like molecular features, making it a possible target for the optimization of the GVL response in patients.

## INTRODUCTION

Acute Myeloid Leukemia (AML) is a heterogeneous hematologic malignancy characterized by a rapid proliferation of undifferentiated hematopoietic cells in the bone marrow, blood and highly irrigated tissues such as the spleen. This infiltration leads to a defective hematopoiesis by lack of production of differentiated hematopoietic cells, which causes a number of symptoms in patients (1–4).

Despite the advances in AML treatments, most patients still receive intensive chemotherapy and a majority of them relapse from a minimal residual disease (MRD) despite a phase of initial chemotherapy response (3). In order to reduce the risk of relapse, eligible patients can undergo an allogeneic-hematopoietic stem cell transplantation (allo-HSCT) while in remission. The beneficial effect of the graft relies on the immune-mediated Graft-*versus*-Leukemia (GVL) response (5,6). This response is mediated by the donor's immune cells, in particular its cytotoxic lymphocytes, that are able to detect and eliminate

the patient's residual blasts by recognising their minor histocompatibility antigens (miHA)(7). The GVL response can be really efficient for some patients that reach long term disease free survival, but others will relapse after the allo-HSCT and the prognosis is then particularly poor (6).

Previous studies have shown that AML cells could escape the GVL response by creating an immunosuppressive microenvironment, or blocking the activation of effector cells. In this study, we developed an *in vivo* preclinical GVL mouse model by single miHA-mismatched HSCT. We took advantage of the MataHari mouse model targeting the male H-Y antigen combined with male blasts carrying the pro-leukemic MLL-AF9 translocation(8–10). After validating the GVL model, we compared the transcriptome of naive and GVL-resistant blasts. Our study shows that GVL-resistant blasts can upregulate heme- and erythroid-related transcriptional programs, suggesting the acquisition of erythroid-like molecular features, while their immune response-related programs remain shut down. This phenomenon might give a selective advantage to leukemic cells, allowing them to escape the GVL response and become resistant to the graft.

## RESULTS

### Generation of a preclinical GVL model.

To study the GVL response in an AML context, we relied on the generation of a MataHari mouse model carrying a single minor histocompatibility antigen (miHA) mismatch(11,12). Female MataHari mice are RAG-deficient (*Rag2*<sup>-/-</sup>), therefore they cannot produce mature B- or T-cells carrying receptors. However, they bear a transgene allowing for the expression of specific CD8<sup>+</sup> T-cells carrying an anti-HY TCR that targets a peptide from the male *Uty* gene. These lymphocytes can thereby recognise and eliminate any male cell that carries the HY antigen.

In our model, we injected MLL-AF9 translocation-driven male blasts (9) into sub-lethally irradiated female C57BL/6 recipient mice, followed by MataHari lymphocytes injections (**Figure 1A**). As a control, we took advantage of the OT-I mouse model that targets a specific peptide from chicken ovalbumin, absent in our context. These OT-I cells are therefore control non-targeting lymphocytes, termed here CT. Prior to injection, the lymphocytes were tested for proper activation (CD25, CD44), specific TCR chains (Va2 for CT and Vb8.3 for MataHari, MH), and absence of exhaustion (PD1) (**Figure 1B**).

On day 13 after leukemic cells injection, control mice exhibited about 75% of MLL-AF9 blasts in the spine compared to less than 10% in the MH-treated group (**Figure 1C**). In femurs, where the blast percentage is even higher, the effect of the graft is all the more significant (**Figure 1C**). Finally, in the spleen the disease burden was significantly lower in the MH-treated context compared to the CT group.

A second identical experiment was performed to assess the survival of leukemic mice treated with CT or MH T-cells, and showed that CT mice died between days 12 and 14

whereas MH-treated mice survived significantly longer, with 1 out of 8 mice that survived more than 50 days (**Figure 1D**).

Collectively, our results validated the presence of an efficient GVL response in our AML mouse model, that significantly reduced the disease burden and increased the overall survival of MH-treated mice compared to CT.

### Combination of MH T-cells and chemotherapy

Relapse is the first cause of death after allo-HSCT, and different strategies are employed to prevent it. When patients relapse, one of the possible treatments is a second round of treatment called salvage chemotherapy. In our murine model, we aimed at recapitulating this scenario by injecting naive male MLL-AF9 blasts into 4 groups of female recipient mice (**Figure 2A**). Three days later, we injected MH T-cells into two groups to induce a GVL response and CT T-cells in the other two groups. On day 9, bone marrow (BM) biopsies showed a significant disease reduction between the two MH-treated and CT-treated animal groups, respectively (**Figure 2B**). Following the biopsies, we started a course of standard intravenously injected chemotherapy once a day, based on a combination of 100 mg/kg Cytarabine for 5 days associated with 1 mg/kg Doxorubicin (anthracycline) on days 1-3. On day 14, a second BM biopsy allowed for the assessment of the post-treatment disease burden (**Figure 2C**). Mice that only received CT T-cells presented a particularly high disease burden and died shortly after the biopsy, whereas the group treated with MH T-cells alone showed signs of a significant GVL response ( $p$ -value  $<0.0001$  when compared to the 1st group). Mice treated with chemotherapy however did not show any sign of disease, with 0% of MLL-AF9 blasts detected. These two chemotherapy-treated groups were followed until day 18, when 3 MH and 1 CT mice died of unknown reasons. The remaining mice presented 22.2, 6.7, 4.8 and 2.2% of blasts for the CT group treated with chemotherapy, and only 0 and 0.2% for the mice treated with MH and chemotherapy (**Figure 2D**). Aware that no meaningful comparison can be carried, our results still suggest that GVL induction followed by chemotherapy in our model might be more efficient than either of them alone. Further experiments are however needed to validate this hypothesis and uncover the mechanisms involved.

### Characterization of a therapeutic window for the GVL response

In AML patients, allo-HSCT is usually performed after the first round of chemotherapy while the patient is in complete remission (13). At that stage no blasts are detectable in the patient's blood, making the GVL even more efficient at eliminating the small number of residual undetected blasts. Therefore, to further validate our preclinical GVL model, we injected MLL-AF9 blasts into 4 groups of mice followed by an injection of MH lymphocytes either on day 3, day 5 or day 7. As a control, we injected CT T-cells into the fourth cohort on day 3 (**Figure 3**). Nine days after the MLL-AF9 blasts injection, a bone marrow biopsy

revealed that a GVL response was induced in our model. As expected, mice exhibited a high GVL efficiency when MH T-cells were injected at day 3 (**Figure 3A**, p-value <0.01 compared to CT group). However, the magnitude of response was drastically diminished upon MH T cell injection at day 5 after leukemia engraftment (p-value < 0.05 compared to CT), and completely disappeared when T-cells were injected 7 days after the blasts. These results were confirmed on day 14 by evaluating the disease burden in the bone marrow isolated from the spine and femurs of the animals (**Figures 3B and 3C**), and by measuring the spleen weight as a consensus means of evaluating the severity of the disease (**Figure 3D**). Therefore, there is a window of time when GVL is efficient and the further away from it you inject the immune cells, the lower the efficiency becomes. These results suggest that we are able to recapitulate in our preclinical model a feature observed in AML patients, thereby confirming its relevance for the study of GVL.

### Induction of GVL-resistant AML blasts

Relapse after allo-HSCT is mostly due to AML blasts surviving the action of immune cells. Understanding how these blasts can escape the GVL response and resist the action of T-cells is therefore a major concern in the field. Leveraging our GVL murine model, we aimed at inducing GVL-resistant blasts and identifying genes that are important for their resistance phenotype.

We injected naive MLL-AF9-driven blasts into a cohort of sublethally irradiated female recipient mice, followed by a CT or MH T-cell injection to induce GVL (**Figure 4A**). A bone marrow biopsy validated the presence of a GVL response on day 11 (**Figure 4B**, C1). The mice were then euthanized, the residual blasts were cell sorted by flow cytometry and reinjected into a second cohort of female recipient mice that received either CT or MH T-cells. The residual blasts were once again sorted and reinjected into a 3rd cohort of recipient mice, receiving CT or MH lymphocytes. The final residual blasts theoretically survived 3 cycles of either CT or MH T-cell treatment, the latter corresponding to our GVL-resistant blasts. Their resistance phenotype was validated by bone marrow biopsy and no significant difference between the mice receiving CT or MH T-cells were noticed after three cycles of exposure of our residual blast population to the T cells, indicating that we were able to derive a T CD8+ cell-resistant leukemic blast population (**Figure 4-B**). These results were confirmed upon mouse demise in bone marrow and spleen of the animals injected with blasts from the 3rd cycle of exposure to MH cells (**Figures 4C and 4D**). These results confirmed that 3 cycles of treatment were sufficient to collect a GVL-resistant blast population.

### Identification of heme metabolism- and erythroid lineage-related genes as upregulated in GVL-resistant blasts

In a similar experiment to **Figure 4A**, we profiled the transcriptome of GVL-resistant blasts over the course of consecutive exposure to MH T cells. Blasts from MH-treated conditions in

the 1st and 3rd cycles (C1 and C3) were sorted and subjected to bulk RNA-sequencing (RNAseq). As a control, we profiled blasts that underwent one CT lymphocytes treatment. When compared to the CT condition, MH-treated cells from C1 and C3 exhibited a remarkably similar transcriptomic profile, with most of the up- and down-regulated genes being the same in the two conditions (**Figure 4E**). In consequence, we focused our attention on the top common differentially-expressed genes between the MH vs CT from one exposure and MH from 3 cycles of exposure vs CT. Downregulated genes were not enriched in any particular cellular pathway, and most of them already have a known role in AML development such as *E2f3* (14,15). However, among the 8 common upregulated genes, 5 belong to heme- and erythroid-lineage-related pathways with, for instance, an upregulation of *Alas2*, the enzyme which catalyzes the first rate-limiting step of the heme biosynthesis, and of the various hemoglobin chains *Hba-a1*, *Hba-a2*, and *Hbb-bs* (**Figures 4F and 4G**). Our data suggest that the acquisition of these erythroid features might be important for GVL-resistance in our AML model.

#### Identification of a successive upregulation of immune- and erythroid-related signatures in GVL-resistant blasts

After identifying that heme metabolism-related genes were upregulated in GVL-resistant blasts, we performed a gene set enrichment analysis (GSEA) between blasts that underwent respectively one or three cycles of exposure MH T cells and the control condition (one cycle of CT T-cells) (**Figures 5A and 5B**). We identified an induction of immune-related gene sets after the 1st cycle of MataHari treatment, with pathways such as the interferon gamma (IFN $\gamma$ ) or inflammatory response (**Supplementary Table 1**), which is consistent with the fact that the leukemic blasts were targeted by MH cells. However, after 3 cycles of exposure to MH cells, the residual blasts exhibited an activation of erythroid-related transcriptional programs but no significant induction of inflammation- and interferon-related gene sets was detected. (**Figure 5B**). This suggests that during the cycles of treatment a selection takes place, first leukemic blasts tend to activate inflammation-related pathways upon exposure to MH T cells, indicating that they are sensitive to their cytotoxic activity (**Figure 5A**). Then, residual leukemic blasts which exhibit erythroid-like features become selected over the course of cycles to T cell exposure and as they become resistant to their anti-leukemic activity, inflammatory and interferon-related gene signatures remain silenced. In both conditions, the *MLL-AF9*-related gene signature was nonetheless present and upregulated. We then decided to determine which specific pathways were up- or down-regulated after 3 cycles of MH treatment compared to 1 (C3 vs C1 comparison, **Figures 5C and 5D**). As expected, we found an upregulation of heme metabolism after 3 cycles of treatment along with a downregulation of immune response-related pathways such as the interferon gamma (IFN $\gamma$ ) or the inflammatory response.

Altogether, these results suggest that after one cycle of T-cell treatment, blasts are confronted to an environment where immune pathways are activated and where



inflammation and cytokine production are promoted, with the activation of the IL-6-STAT3 pathway among others, that might play a role in GVL-resistance since it is known to prevent myeloid differentiation and induce the production of anti-apoptotic proteins such as c-myc or Bcl-xL. With an increasing number of exposure to MH T-cells, leukemic cells switch towards the silencing of immune response-related genes signatures in favor of the upregulation of other ones, such as the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway which was reported to promote the self-renewal and proliferation of leukemia stem cells. More interestingly, there was also a strong enrichment in these blasts for erythroid-like transcriptional features related to erythroid lineage, *Gata1*-targeted genes, and heme metabolism as observed at the gene-level.

Finally, M. J. Christopher et al published an article featuring RNA sequencing-based transcriptomic results from AML patients who relapsed after an allo-HSCT (16). The comparison of transcriptomics data before the graft and at relapse allowed the identification of differentially expressed genes, corresponding to genes whose expression is either up-regulated or down-regulated at relapse compared to the sample before the graft. This allowed the identification of a relapse associated signature, termed “AML\_ALLO\_HSCT\_DOWN”. Taking advantage of this existing signature, we compared it to all the erythroid signatures from the c2 and c3 collections from the MSigDB database (**Figure 5E**). This comparison showed a significant correlation between the relapse signature and erythroid-related transcriptional programs. These results validate in AML patients the observations that we made in our preclinical mouse model. This justifies both the use of our preclinical model for the study of the GVL effect, and the development of further investigations to decipher the role of acquisition of erythroid-like features as a molecular mechanism of post-allograft AML relapse .

## DISCUSSION

Improving the GVL response is a highly promising therapeutic approach for the treatment of AML, but it is hampered by significant challenges, primarily the resistance of certain AML blasts to the immune response. To address this issue, our study focused on developing a novel model of GVL response in AML. Our preclinical model demonstrated remarkable similarities to AML patients, highlighting its significance as a tool for investigating the mechanisms underlying GVL resistance.

### Role of the erythroid pathway in GVL-resistance

Studies have shown that loss of major histocompatibility complex II (MHC II) genes, including *HLA-DPA1*, *HLA-DPB1*, *HLA-DQB1*, and *HLA-DRB1*, by AML cells can cause GVL failure in about 40% of patients (17). M.J. Christopher et al. analyzed 34 AML patients and found that 50% of them (17/34) exhibited a loss of expression of MHC II genes. However, in our model,

we did not observe this loss of CMH II genes (16). Instead, we observed a resistance phenotype associated with an upregulation of the immune response after 1 cycle of MH treatment, followed by an activation of erythroid-like transcriptional programs.

AML blasts have been shown to express erythroid lineage-associated genes such as CD71 in patients, and its association with cellular iron uptake is similar to our findings of upregulated iron uptake and related pathways in GVL-resistant blasts. Iron uptake is essential for the proliferation and survival of AML cells, and the expression of iron-regulating proteins is increased in AML cells. Our data shows that the relapse signature is correlated with an increased “iron uptake and transport” signature, highlighting the importance of iron metabolism in AML pathogenesis and suggesting that targeting iron uptake pathways could be a promising therapeutic strategy to minimize the risk of AML relapse after allo-HSCT.

In parallel, porphyrins are important organic compounds involved in heme synthesis, which is critical for oxygen transport in the blood via hemoglobin. In AML, porphyrin metabolism is altered, resulting in the accumulation of porphyrin precursors in the blood and urine of patients. Heme metabolism, which is closely related to porphyrin metabolism, has also been implicated in AML development, progression, and drug sensitivity. Changes in the expression and activity of heme biosynthesis enzymes are thought to contribute to leukemic cell survival and proliferation. Our findings suggest that GVL resistant blasts exhibit increased expression of signatures associated with heme and porphyrin metabolism. Consequently, intervening in these pathways could potentially restore the sensitivity of leukemic cells to the GVL effect, thus offering a promising therapeutic avenue for the treatment of AML

Finally, our study found that the *Gata1* pathway, which is responsible for regulating erythroid differentiation, was strongly associated with AML relapse. This was observed through the correlation of three *Gata1*-related gene sets with the relapse signature (**Figure 5E**). Additionally, in comparing cells that received 3 cycles of MH treatment and CT, the erythroid pathway was the highest-ranked (T3 vs CT, **Figure 5B**). The reason for erythroid differentiation in AML blasts is not yet fully understood, but there are indications that the upregulation of the EPO-ACTIVATES-RAS gene set may play a role. Erythropoietin (EPO) has been shown to stimulate the growth and survival of AML cells by activating the Ras pathway through binding to the EPO receptor (EPOR) on the surface of AML blasts, leading to the activation of Janus Kinase 2 (JAK2) signaling pathway, and ultimately promoting cell growth and inhibiting apoptosis of AML blasts.

Altogether, these results suggest that heme-metabolism and more generally erythroid pathways play a significant role in GVL-resistance of AML blasts. These speculations need to be validated. We have recently designed shRNAs targeting two major genes related to heme-metabolism that were both found upregulated in our study: *Gata1* and *Alas2*. After injection of naive GVL-sensitive and GVL-resistant MLL-AF9 blasts that are knocked down for

these genes into recipient mice, we will treat them with MH T-cells and evaluate if GVL-resistant blasts are resensitized to the GVL after *Gata1* or *Alas2* knock down.

### Role of IFN $\gamma$ in GVL-resistance

Several studies have suggested that interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ) expression may play a role in the resistance of AML cells to the GVL effect. In our study, we also found a significant association between IFN- $\gamma$  expression and GVL response in mice (**Supplementary Table 1**). After 1 cycle of treatment, gene sets related to IFN- $\gamma$  pathway are ranked the highest. While IFN- $\gamma$  is typically linked to anti-tumor responses, it may promote tumor progression under certain conditions. In our study, we observed that IFN- $\gamma$  expression was associated with GVL response in mice, indicating its potential as a therapeutic target to enhance the efficacy of GVL. However, after three cycles of exposure to MH cells, erythroid-like characteristics were observed, and the inflammatory hallmarks associated with IFN- $\gamma$  were silenced. Further research is needed to investigate the role of IFN- $\gamma$  in the GVL response and to explore therapeutic strategies targeting this pathway, such as inhibiting its mediators in GVL-resistant blasts.

In conclusion, our study highlights the importance of investigating the mechanisms underlying the resistance of AML cells to immunotherapies such as GVL. Our model effectively recapitulates several important features of AML patients, and our findings suggest that targeting heme- and porphyrin-related pathways as well as erythroid lineage-related genes could be a promising strategy to overcome GVL resistance in AML.

## MATERIAL AND METHODS

### AML mouse model

All mouse experiments were approved by the French National Committee on Animal Care, and submitted to an ethical review (DAP APAFIS#28821). For all mouse experiments, sample size was determined by historical penetrance of MLL-AF9 driven leukemia development *in vivo*.

GMP were collected from C57BL/6 mice and were retrovirally transduced with an MCSV-MLL-AF9-IRESNeo vector containing a dsRed fluorescence cassette. dsRed+ cells were then sorted and injected into lethally irradiated recipient C57BL/6 mice (2x5.5Gy). Once the mice showed signs of leukemia they were sacrificed and AML blasts were collected from femurs, spine, or spleen. The bones were crushed in Red Blood Cell Lysis Buffer HybriMax (Sigma Aldrich), incubated for 10mins and washed twice in PBS (Gibco). Cells were then sorted on their dsRed positivity, resuspended in HBSS (Gibco) and reinjected into recipient sublethally irradiated mice (3.5Gy). After several serial transplants we obtained stable AML blasts that induce a lethal leukemia in 14 days.

For all experiments, injections are done in the tail vein with 200 000 MLL-AF9-driven blasts. Blasts were injected into 5-10 weeks old sublethally irradiated (3.5Gy) C57BL/6 males for amplification and maintenance of leukemic cells. For all experiments, blasts were injected into 7-9 weeks old sublethally irradiated (3.5) female C57BL/6 mice.

Bone marrow biopsies were performed according to guidelines of the institutional review board.

### **GVL mouse models**

The MataHari mouse model has been previously described (B6.Cg-Rag2tm1Fwa Tg(TcraMataHari,TcrbMatahari), Valujskikh et al., 2002). Homozygous MataHari mice were obtained from the Bouso Team (Institut Pasteur), maintained in the IRSL mouse facility and crossed with C57BL/6J OlaHsd mice (ordered from Envigo and maintained in the IRSL mouse facility). The heterozygous mice were used throughout this article and termed MataHari (MH).

OT-I Rag2<sup>-/-</sup> anti-OVA TCR transgenic mice ((B6.129S6-Rag2 Tg(TcraTcrb)1100Mjb)) mice were ordered from Taconic, bred and maintained as homozygous.

In all murine experiments, 10 million MH or OT-I T-cells were resuspended in HBSS (Gibco) and injected into the tail vein of mice.

### **Lymphocyte Activation**

8- to 16-months-old MataHari were sacrificed and the spleen was collected. Spleen was crushed in Red Blood Cell Lysing Buffer HybriMax (Sigma Aldrich) then spinned for 5min at 1800rpm. Cells were washed twice with PBS (Gibco), then nude RPMI-1640 Glutamax (Fischer-scientific) was added to resuspend the pellet.  $\frac{1}{3}$  of this solution was separated, and we added 50 $\mu$ M UTY antigenic peptide (WMHHNMDLI, CliniSciences). After 2hrs of incubation at 37°C 5% CO<sub>2</sub>, these cells were mixed the the  $\frac{2}{3}$  left and MLR media was added (RPMI-1640 Glutamax media supplemented with 10% FBS, 0.1% of Gentamicin, 1% of filtered HEPES and 0.2% of BetaMercaptoethanol). Cells were incubated for 2 days at 37°C 5%CO<sub>2</sub>. At day 2, cells were Ficoll and mononucleated live cells were collected, washed in PBS and resuspended in fresh MLR medium supplemented with 200U/mL IL-2 (R&D Systems). After 2-5 days of incubation, MataHari lymphocytes were collected and antibody stained before being used for experiments.

OT-I lymphocytes are activated with the same method, with lymph nodes collected in addition to spleens and the incubation made in MLR medium containing 10 $\mu$ M SL8 antigenic peptide (SIINFEKL, H2Kb, Fisher Scientific).

### **Antibodies and Flow Cytometry Assays**

Antibodies to CD8 and V $\beta$ 8.3 were ordered from BioLegend, anti-CD25 and CD44 from eBioscience, and anti-PD1 and V $\alpha$ 2 from BD Biosciences. Cells were stained in PBS (Gibco) containing 2mM EDTA and 2.5%BSA, and assessed in a BD FACSCanto II flow cytometer. MLL-AF9 blasts were sorted using a BD FACSAria II or III.

### Chemotherapy

Naive MLL-AF9 blasts were collected from male leukemic mice and reinjected into sublethally irradiated female recipient mice. On day 3, 10 million MH or CT T-cells were injected into the tail vein. On day 9, after a BM biopsy, mice were either treated with vehicle (HBSS, Gibco) or 5+3 chemotherapy. Cytarabine was given once daily for 5 days (100 mg/kg, IV) in combination with doxorubicin (1 mg/kg, IV) once daily on days 1-3. Mice were then sacrificed, bones and spleen collected and analyzed by flow cytometry.

### Induction of GVL-resistant blasts and bulk RNA-sequencing

Naive MLL-AF9 blasts were collected from male leukemic mice and reinjected into sublethally irradiated 8-weeks old female C57BL/6 recipient mice. Three or six days later, half of the mice received an injection of 10 million MataHari (MH) T-cells and the other half received 10 million OT-I T-cells (CT). After 11 days, a bone marrow biopsy was performed by aspiration of the content of the femur to validate the GVL effect. On day 14, mice were sacrificed and blasts from the spleen were collected and analyzed by flow cytometry. Cells from femurs and spine were pooled and also analyzed by flow cytometry for the evaluation of the disease burden. Leukemia MLL-AF9 dsRed<sup>+</sup> cells from bones were sorted and correspond to the 1st cycle of treatment. These residual blasts were reinjected into a second cohort of sublethally irradiated female recipient mice, followed by an injection of either CT or MH T-cells. After sacrifice, residual blasts that theoretically received either 2 cycles of MH or 2 cycles of CT T-cells were reinjected into a 3rd cohort of recipient female mice that underwent a 3rd round of treatment. Residual blasts from the 3rd cycle therefore received either rounds of MH treatment or 3 rounds of CT T-cells. Cells from MH and CT conditions at T1 (cycle 1) and MH condition at T3 were frozen down, RNA was extracted and submitted to bulk RNA sequencing (TruSeq stranded mRNA - NovaSeq 600,2\*100 paired-ends, 70M reads)).

### Gene enrichment analyses

Gene Set Enrichment Analyses (GSEA) allows the calculation of enrichment scores for each pair of sample and gene set, or between two gene sets. The GSEA v3.0 software was used to identify functional associations of the molecular phenotypes induced by any indicated cross-compared conditions with a compendia of gene signatures including the MSigDB v6.2 c2 collection of 4,762 curated gene sets and the c3 collection of 836 motif gene sets. Gene sets with less than 15 genes or with more than 500 genes were excluded from the analysis. GSEA was performed using weighted enrichment statistics on a pre-ranked list of genes after filtering out non expressed genes (genes with median FPKM expression below 1 in both

compared conditions). Genes were ranked using their log<sub>2</sub> fold change of expression between compared conditions. Gene sets with a nominal  $P \leq 0.05$  were considered highly significant hits. Volcano plots were generated under R environment (v3.5.2) using the ggplot2 package.

#### Correlation between a relapse signature and erythroid-related gene signatures using single-sample GSEA (ssGSEA)

The relapse signature “AML\_ALLO\_HSCT\_DOWN” was retrieved from an article published by M. J. Christopher et al. comparing transcriptome analyses before and after allo-HSCT of AML patients who relapsed. Single-sample GSEA (ssGSEA) was used to calculate separate enrichment scores for each pair of one sample whose transcriptomic data was available from M. J. Christopher *et al.* and one given gene set (queried from the c2 and c3 collections of the MSigDB database). A Pearson correlation matrix was then computed between each ssGSEA score for the AML\_ALLO\_HSCT\_DOWN gene signature and all gene sets of interest related to erythroid-, *Gata1*-, and heme metabolism-related transcriptional programs.

#### Statistical analyses

All statistical analyses were performed using Prism v8 (GraphPad), R and Microsoft Excel. We used unpaired Student t-tests when the samples were normally distributed, with Welch's correction when the variance was different. For non-normal distributions, we used non-parametric two-tailed Mann-Whitney tests for two-group comparisons. ns: non-significant.

## REFERENCES

1. Pelcovits A, Niroula R. Acute Myeloid Leukemia: A Review. :3.
2. Khwaja A, Bjorkholm M, Gale RE, Levine RL, Jordan CT, Ehninger G, et al. Acute myeloid leukaemia. *Nat Rev Dis Primer*. 10 mars 2016;2(1):1-22.
3. Mesbahi Y, Trahair TN, Lock RB, Connerty P. Exploring the Metabolic Landscape of AML: From Haematopoietic Stem Cells to Myeloblasts and Leukaemic Stem Cells. *Front Oncol [Internet]*. 2022 [cité 10 mars 2023];12. Disponible sur: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fonc.2022.807266>
4. Shallis RM, Wang R, Davidoff A, Ma X, Zeidan AM. Epidemiology of acute myeloid leukemia: Recent progress and enduring challenges. *Blood Rev*. juill 2019;36:70-87.
5. Bleakley M, Riddell SR. Molecules and mechanisms of the graft-versus-leukaemia effect. *Nat Rev Cancer*. mai 2004;4(5):371-80.
6. Sweeney C, Vyas P. The Graft-Versus-Leukemia Effect in AML. *Front Oncol [Internet]*. 2019 [cité 10 mars 2023];9. Disponible sur: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fonc.2019.01217>
7. Goulmy E, Schipper R, Pool J, Blokland E, Falkenburg JH, Vossen J, et al. Mismatches of minor histocompatibility antigens between HLA-identical donors and recipients and the development of graft-versus-host disease after bone marrow transplantation. *N Engl J Med*. 1 févr 1996;334(5):281-5.
8. Muntean AG, Hess JL. The Pathogenesis of Mixed Lineage Leukemia. *Annu Rev Pathol*. 2012;7:283-301.
9. Corral J, Lavenir I, Impey H, Warren AJ, Forster A, Larson TA, et al. An Mll-AF9 fusion gene made by homologous recombination causes acute leukemia in chimeric mice: a method to create fusion oncogenes. *Cell*. 14 juin 1996;85(6):853-61.
10. Winters AC, Bernt KM. MLL-Rearranged Leukemias—An Update on Science and Clinical Approaches. *Front Pediatr [Internet]*. 2017 [cité 9 févr 2023];5. Disponible sur: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fped.2017.00004>
11. Miklos DB, Kim HT, Miller KH, Guo L, Zorn E, Lee SJ, et al. Antibody responses to H-Y minor histocompatibility antigens correlate with chronic graft-versus-host disease and disease remission. *Blood*. 1 avr 2005;105(7):2973-8.

12. Valujskikh A, Lantz O, Celli S, Matzinger P, Heeger PS. Cross-primed CD8(+) T cells mediate graft rejection via a distinct effector pathway. *Nat Immunol.* sept 2002;3(9):844-51.
13. Jethava YS, Sica S, Savani B, Socola F, Jagasia M, Mohty M, et al. Conditioning regimens for allogeneic hematopoietic stem cell transplants in acute myeloid leukemia. *Bone Marrow Transplant.* nov 2017;52(11):1504-11.
14. Eiring AM, Neviani P, Santhanam R, Oaks JJ, Chang JS, Notari M, et al. Identification of novel posttranscriptional targets of the BCR/ABL oncoprotein by ribonomics: requirement of E2F3 for BCR/ABL leukemogenesis. *Blood.* 15 janv 2008;111(2):816-28.
15. Gao C, Liu SG, Lu WT, Yue ZX, Zhao XX, Xing TY, et al. Downregulating CREBBP inhibits proliferation and cell cycle progression and induces daunorubicin resistance in leukemia cells. *Mol Med Rep.* oct 2020;22(4):2905-15.
16. Christopher MJ, Petti AA, Rettig MP, Miller CA, Chendamarai E, Duncavage EJ, et al. Immune Escape of Relapsed AML Cells after Allogeneic Transplantation. *N Engl J Med.* 13 déc 2018;379(24):2330-41.
17. Toffalori C, Zito L, Gambacorta V, Riba M, Oliveira G, Bucci G, et al. Immune signature drives leukemia escape and relapse after hematopoietic cell transplantation. *Nat Med.* avr 2019;25(4):603-11.



## FIGURES LEGENDS

### **Figure 1. MataHari T-cell injection induces GVL in AML mouse model**

(A)  $0.2 \times 10^6$  naive MLL-AF9-driven blasts were collected from male leukemic mice and injected into sublethally irradiated (3.5Gy) female recipient mice. After 3 days,  $10 \times 10^6$  CT or MH T-cells were injected. Depending on the experiment, mice were either euthanized on day 13 or survival was followed in a Kaplan-Meier experiment. (B) CT (left) and MH (right) T-cells were tested for activation (CD25, CD44), specific TCR expression (Va2 for CT and Vb8.3 for MH), and T-cell exhaustion (PD1) before being injected in mice. (C) At the endpoint, spines (left), femurs (middle) and spleens (right) were collected from mice and the disease burden was analyzed by flow cytometry.  $n=10$  mice per group. Data are shown as mean  $\pm$  SD. (D) Kaplan-Meier survival curve of mice treated with CT (black) or MH (red) T-cells.  $n=8$  mice per group.

### **Figure 2. Association of GVL and chemotherapy**

(A)  $0.2 \times 10^6$  naive MLL-AF9-driven blasts were collected from male leukemic mice and injected into 20 sublethally irradiated (3.5Gy) female recipient mice. After 3 days,  $10 \times 10^6$  CT or MH T-cells were injected. On day 9, bone marrow biopsies were performed to evaluate the disease burden. Following the biopsies, 5 CT mice and 5 MH mice received a course of 5+3 chemotherapy based on a combination of 100 mg/kg Cytarabine for 5 days associated with 1 mg/kg Doxorubicin (anthracycline) on days 1-3. The other two groups of mice received HBSS instead of chemotherapy. On day 14, a second bone marrow biopsy was performed to evaluate the impact of chemotherapy. The two groups of mice that did not receive chemotherapy died the same day, and the two other groups were followed until day 18. (B) Bone marrow biopsies were performed on day 9 in CT- (grey) and MH-treated (red) groups.  $n=5$  mice per group. Data are shown as mean  $\pm$  SD. (C) Bone marrow biopsies were performed on day 14 after one course of chemotherapy. From left to right, the groups received respectively CT T-cells without chemotherapy, CT T-cells with chemotherapy, MH T-cells without chemotherapy and MH T-cells with chemotherapy. (D) Bone marrow analysis on spines and femurs collected from CT and MH-treated mice that received one course of chemotherapy. CT:  $n=4$  mice, MH:  $n=2$  mice.

### **Figure 3. Therapeutic window for the GVL response.**

(A) Four groups of female recipient C57BL/6 mice were injected with MLL-AF9-driven blasts, followed by an injection of MH T-cells on days 3 (light pink), 5 (pink) or 7 (red) after the blasts. As control, we injected CT T-cells on day 3 into the fourth cohort of mice (grey). Bone marrow biopsies were performed on day 9 after blast injection to evaluate the disease burden.  $n=6$  mice per group. (B, C) On day 12, mice were euthanized and the spine (B) and femurs (C) were collected to evaluate the disease burden. (D) Spleens were collected and we measured their weight as a consensus surrogate for disease burden.

#### **Figure 4. GVL-resistant blasts upregulate erythroid lineage-related genes**

(A) Naive MLL-AF9-driven blasts (light pink) were injected into a first cohort of sublethally irradiated recipient mice that received either a MH- or CT-T cell injection three days later. On day 14 mice were euthanized and residual blasts were recovered from the bone marrow. These blasts from the 1st cycle (C1, pink) were then injected into a second cohort of recipient mice that underwent either MH- or CT-T cells injection. Residual blasts from these mice were collected (C2, light red) and reinjected into a third cohort of mice. After undergoing an injection of MH- or CT-T cells we collected the residual blasts (red). The blasts collected after 3 cycles of MH treatments are considered resistant to the GVL response. (B) Bone marrow biopsies were performed on day 11 to evaluate the disease burden after an injection of CT T-cells at C1 (dark grey), MH T-cells at C1 (light grey), CT T-cells at C3 (red), MH T-cells at C3 (pink). n=6 mice per group. (C) When mice from C1 and C3 were euthanized, we analyzed the disease burden in bones (spine and femurs, left) and in the spleen (right) in the four groups. (D) Volcano plots of differentially expressed genes (DEG) in the bone marrow between mice treated with 1 cycle of MH and 1 cycle of CT T-cells (top, MH C1 vs CT C1) and between mice treated with 3 cycles of MH and 1 cycle of CT T-cells (bottom, MH C3 vs CT C1). Common DEG from the two comparisons are shown as red (common upregulated) or blue (common downregulated) dots. n=3 mice per group. (E) STRING network analysis reveals that 5/8 common upregulated genes from (D) are associated with heme metabolism (pink). Two are associated with complement (green), and one is unclassified (blue). (F) Heatmap of the common DEG from (D) and their associated pathways. Each mouse is shown separately.

#### **Figure 5. Leukemic blasts successively express immune- and erythroid lineage-related signatures after several cycles of MH treatment.**

(A) Gene set enrichment analyses (GSEA) of blasts that underwent 1 cycle of MH T-cells and the control condition that underwent 1 cycle of CT T-cells injection (MH C1 vs CT C1, left) and one associated enrichment plot (right). Erythroid-related (red), Immune-related (blue) and MLL-AF9-related (purple) gene sets are color coded. Red line:  $\text{abs}(\log_{10}(\text{p-value} = 0.05))$ . (B) GSEA of blasts that the 3rd cycle of MH T-cells injection and the control condition the 1st cycle of CT T-cells injection (MH C3 vs CT C1, left) and one associated enrichment plot (right). Erythroid-related (red), Immune-related (blue) and MLL-AF9-related (purple) gene sets are color coded. Red line:  $\text{abs}(\log_{10}(\text{p-value} = 0.05))$ . (C) Volcano plot of the differentially expressed pathways between MH-treated blasts from the 3rd and 1st cycles (MH C3 vs MH C1). All significantly differentially expressed pathways are marked as red dots. Red line:  $-\log_{10}(\text{p-value} = 0.05)$ . (D) Enrichment plots associated with (C). (E) Correlation between the relapse signature (AML\_ALLO\_HSCT\_DOWN) from M. J. Christopher et al. and all the erythroid signatures from c2 and c3 collections (MSigDB database).

# FIGURES

Figure 1

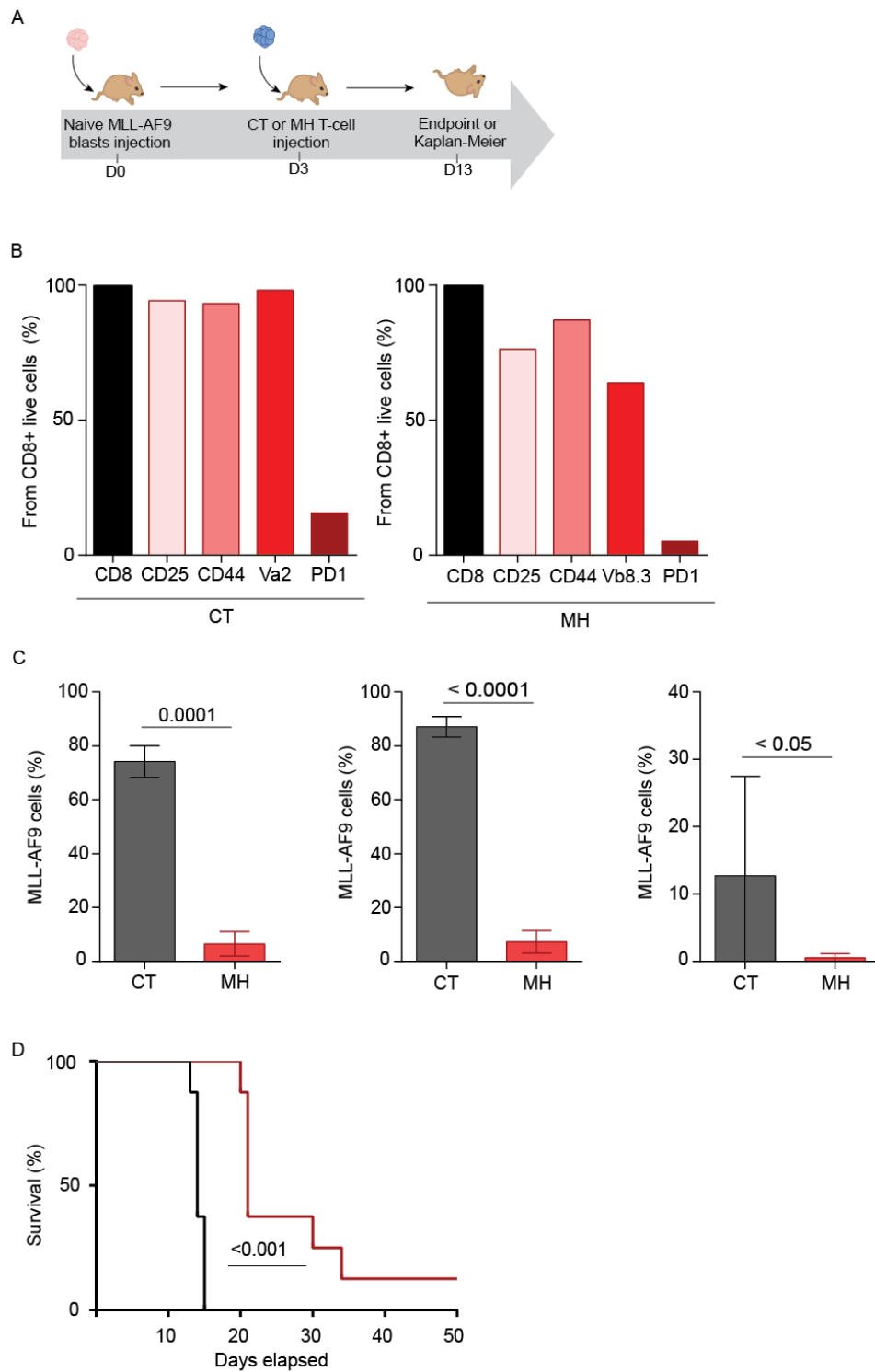
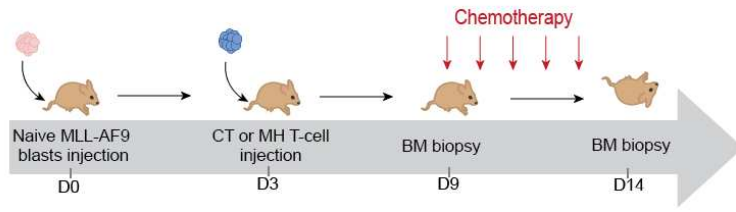
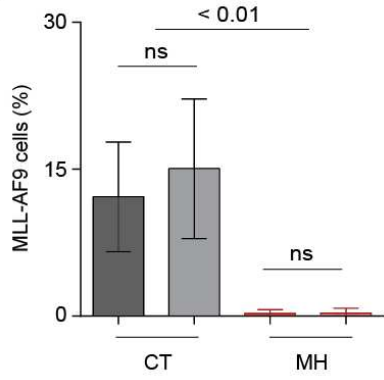


Figure 2

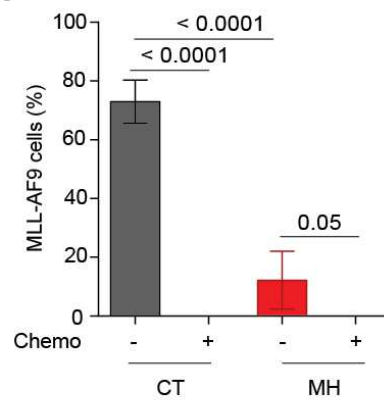
A



B



C



D

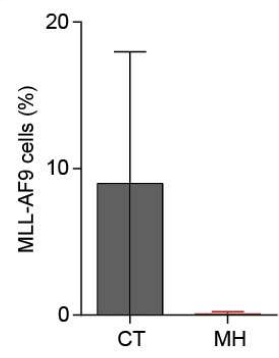


Figure 3

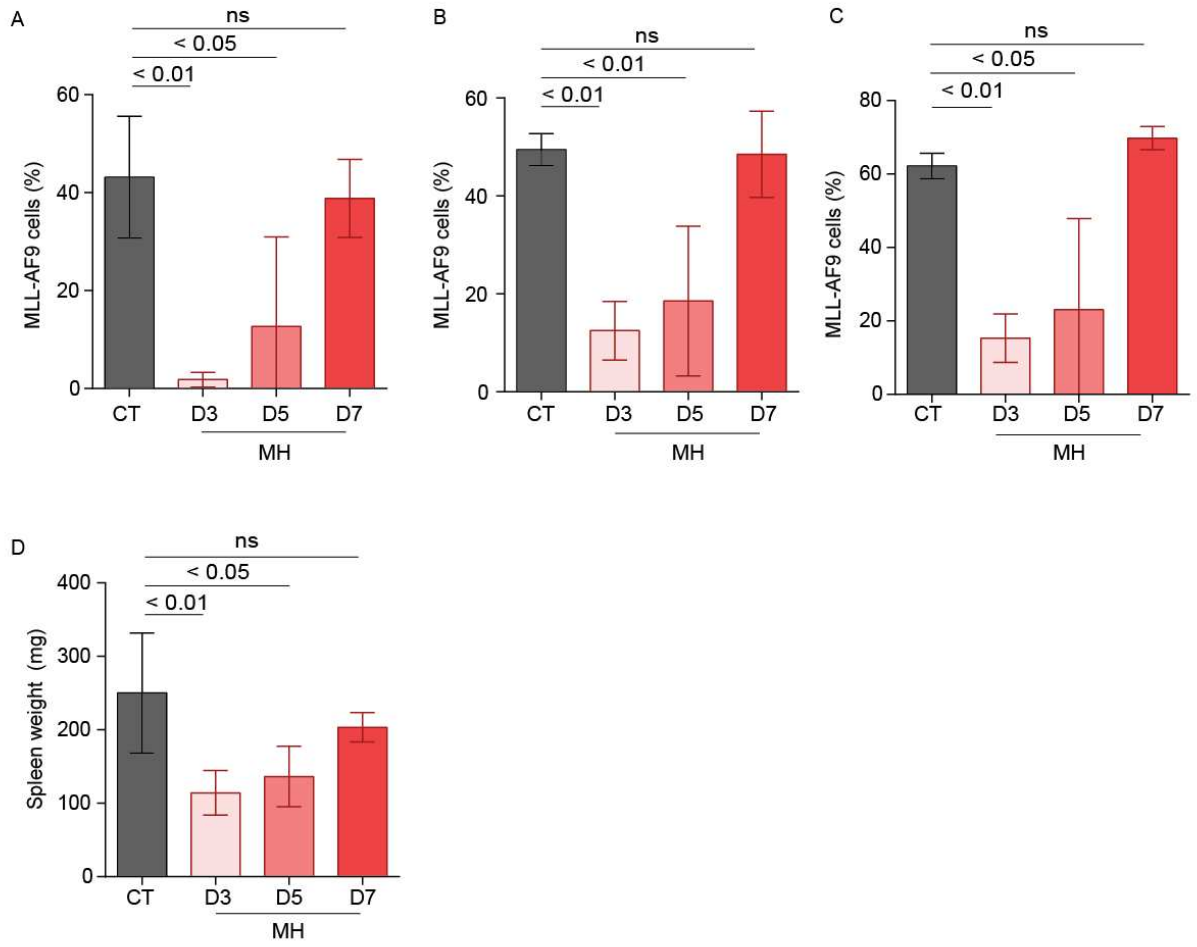


Figure 4

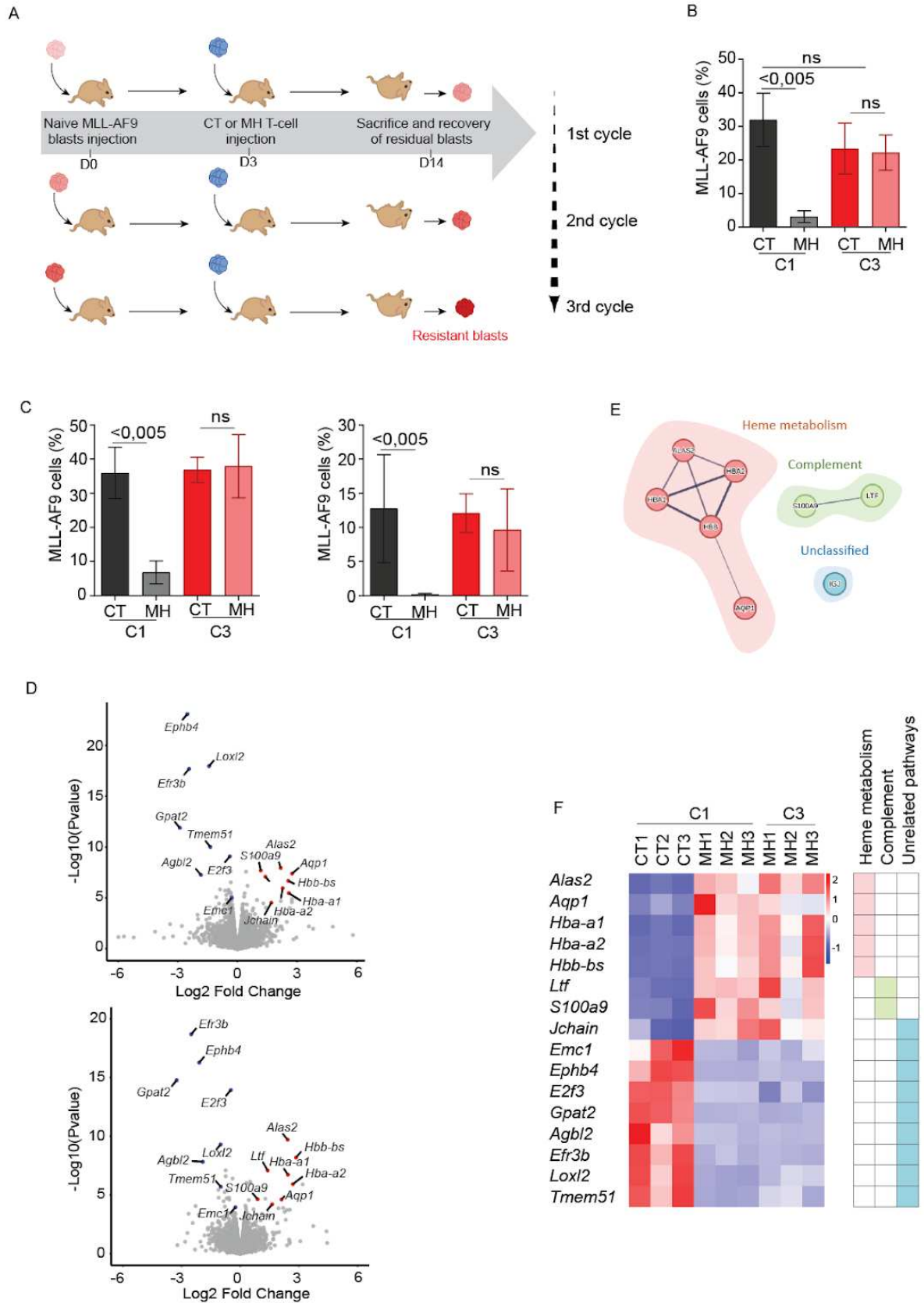
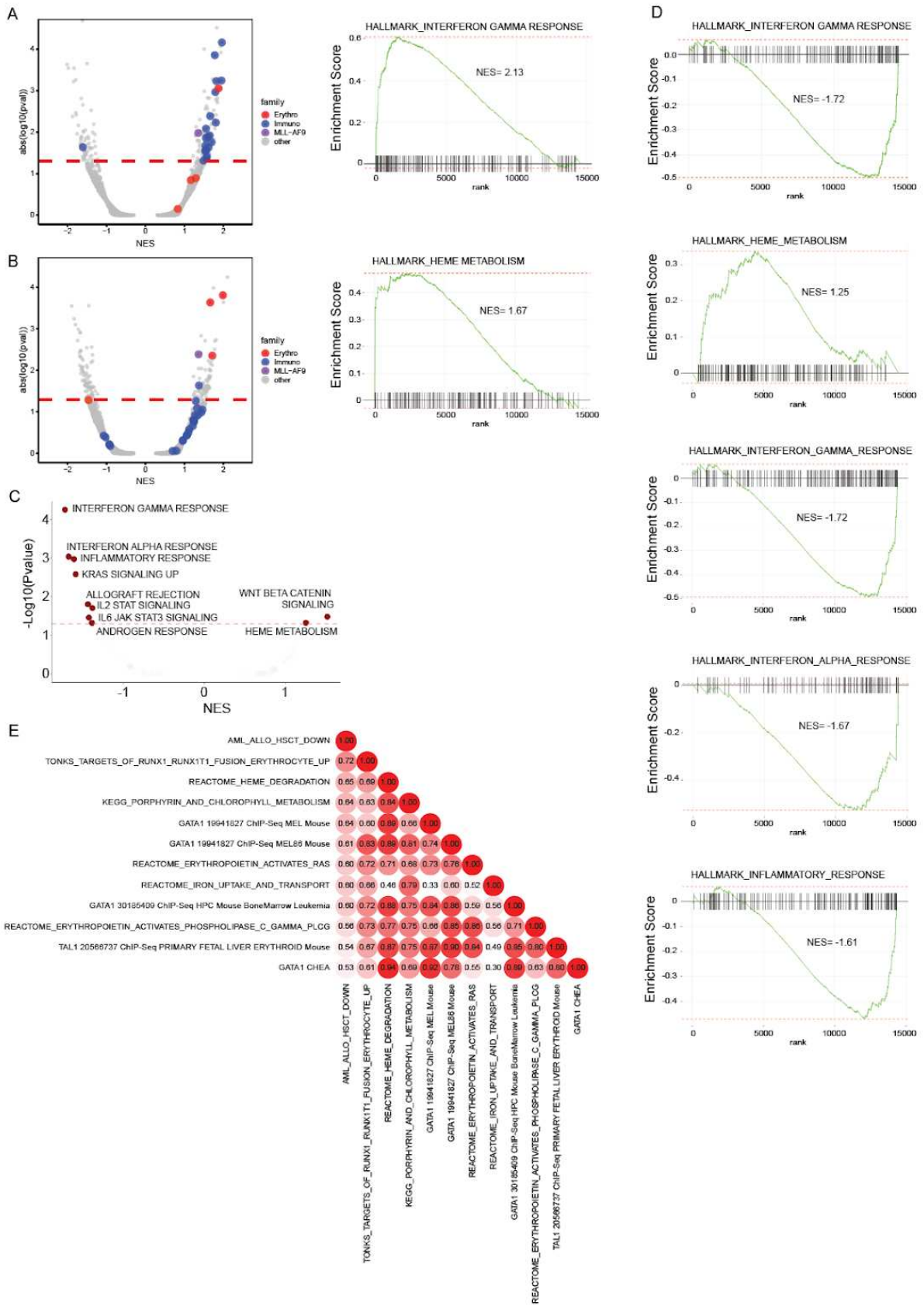


Figure 5



# SUPPLEMENTARY TABLE

Supplementary Table 1

A

pathway	pval	padj	NES	size
HALLMARK_INTERFERON_GAMMA_RESPONSE	1,10E-08	5,50E-07	2,1252	168
HALLMARK_INTERFERON_ALPHA_RESPONSE	8,49E-06	0,0002	2,0379	83
WP_TYPE_IL_INTERFERON_SIGNALING_IFNG	6,86E-05	0,0043	1,9609	26
REACTOME_INTERFERON_SIGNALING	0,0001	0,0082	1,7809	144
SANA_RESPONSE_TO_IFNG_UP	0,0006	0,0303	1,9514	41
REACTOME_INTERFERON_GAMMA_SIGNALING	0,0006	0,0305	1,8221	59
WELCH_GATA1_TARGETS	0,0009	0,0438	1,8745	19
ICHIBA_GRAFT_VERSUS_HOST_DISEASE_D7_UP	0,0011	0,0526	1,7941	85
ICHIBA_GRAFT_VERSUS_HOST_DISEASE_35D_UP	0,0041	0,1645	1,6635	102
WP_OVERVIEW_OF_PROINFLAMMATORY_AND_P	0,0059	0,2237	1,8071	34
HALLMARK_INFLAMMATORY_RESPONSE	0,0083	0,1377	1,5538	144
KUMAR_TARGETS_OF_MLL_AF9_FUSION	0,0105	0,3482	1,3555	303
BROWNE_INTERFERON_RESPONSIVE_GENES	0,0120	0,3742	1,6504	51
HALLMARK_IL6_JAK_STAT3_SIGNALING	0,0130	0,1622	1,6036	65
KEGG_JAK_STAT_SIGNALING_PATHWAY	0,0138	0,4079	1,5504	89
MOSERLE_IFNA_RESPONSE	0,0175	0,4593	1,6981	20
SEKI_INFLAMMATORY_RESPONSE_LPS_UP	0,0210	0,5176	1,5404	60
REACTOME_INTERLEUKIN_7_SIGNALING	0,0232	0,5401	-1,6047	33
REACTOME_INTERFERON_ALPHA_BETA_SIGNALIN	0,0236	0,5422	1,6194	44
WP_IMMUNE_RESPONSE_TO_TUBERCULOSIS	0,0268	0,5696	1,5603	21
NATSUME_RESPONSE_TO_INTERFERON_BETA_UP	0,0282	0,5874	1,5341	48
MARSHALL_VIRAL_INFECTION_RESPONSE_DN	0,0383	0,6876	1,5762	24
TIAN_TNF_SIGNALING_VIA_NFKB	0,0428	0,7491	1,5683	16
EINAV_INTERFERON_SIGNATURE_IN_CANCER	0,0484	0,8098	1,4885	22
REACTOME_AQUAPORIN_MEDIATED_TRANSPORT	0,1283	1,0000	1,2947	36
HALLMARK_HEME_METABOLISM	0,1434	0,7171	1,1650	166

B

pathway	pval	padj	NES	size
WELCH_GATA1_TARGETS	0,0002	0,1950	1,9874	19
HALLMARK_HEME_METABOLISM	0,0002	0,0115	1,6649	166
KUMAR_TARGETS_OF_MLL_AF9_FUSION	0,0041	0,6682	1,3621	303
REACTOME_AQUAPORIN_MEDIATED_TRANSPORT	0,0044	0,6682	1,7172	36
HALLMARK_INTERFERON_GAMMA_RESPONSE	0,0231	0,5783	1,3734	168
RIZ_ERYTHROID_DIFFERENTIATION_GHR	0,0522	1,0000	-1,4626	25
REACTOME_INTERFERON_SIGNALING	0,0545	1,0000	1,2937	144
HALLMARK_INTERFERON_ALPHA_RESPONSE	0,0820	0,9501	1,3284	83
TIAN_TNF_SIGNALING_VIA_NFKB	0,0894	1,0000	1,4628	16
MOSERLE_IFNA_RESPONSE	0,1040	1,0000	1,4307	20
REACTOME_INTERFERON_GAMMA_SIGNALING	0,1213	1,0000	1,2731	59
WP_OVERVIEW_OF_PROINFLAMMATORY_AND_PROFIBROTIC_MEDIATORS	0,1216	1,0000	1,3413	34
BROWNE_INTERFERON_RESPONSIVE_GENES	0,1587	1,0000	1,2445	51
SEKI_INFLAMMATORY_RESPONSE_LPS_UP	0,1587	1,0000	1,2291	60
REACTOME_INTERFERON_ALPHA_BETA_SIGNALING	0,1730	1,0000	1,2450	44
ZHANG_INTERFERON_RESPONSE	0,2198	1,0000	1,2172	16
NATSUME_RESPONSE_TO_INTERFERON_BETA_UP	0,2625	1,0000	1,1279	48
SANA_RESPONSE_TO_IFNG_UP	0,3143	1,0000	1,1017	41
EINAV_INTERFERON_SIGNATURE_IN_CANCER	0,3551	1,0000	1,0691	22
REACTOME_INTERLEUKIN_7_SIGNALING	0,3762	1,0000	-1,0728	33
WP_TYPE_IL_INTERFERON_SIGNALING_IFNG	0,3775	1,0000	1,0528	26
HALLMARK_INFLAMMATORY_RESPONSE	0,4092	1,0000	-1,0244	144
HALLMARK_IL6_JAK_STAT3_SIGNALING	0,4818	1,0000	0,9637	65
MARSHALL_VIRAL_INFECTION_RESPONSE_DN	0,5036	1,0000	0,9572	24
ICHIBA_GRAFT_VERSUS_HOST_DISEASE_35D_UP	0,6136	1,0000	-0,9271	102
ICHIBA_GRAFT_VERSUS_HOST_DISEASE_D7_UP	0,6148	1,0000	-0,9240	85
REACTOME_HCMV_INFECTION	0,6646	1,0000	-0,9037	127
WP_IMMUNE_RESPONSE_TO_TUBERCULOSIS	0,8717	1,0000	0,6981	21

Supplementary Table 1.

(A, B) Table of the enriched pathways from **Figure 5A** (A) and **Figure 5B** (B). Pathways associated with an immune signature are in blue, those associated with an erythroid signature are in red. Pathways associated with an MLL-AF9 signature are in purple. Pval: p-value, padj: adjusted p-value, NES: normalized enrichment score, size: number of DE genes associated with the pathway.



---

## Discussion

---

### Modèles d'étude de la réponse GVL

L'optimisation de la réponse GVL est l'une des voies les plus prometteuses dans la prise en charge des LAM, bien qu'elle soit confrontée à de nombreux obstacles. La difficulté la plus importante étant la résistance de certaines cellules leucémiques à la réponse immunitaire, notre projet visait à développer un nouveau modèle de réponse GVL dans les LAM. Notre modèle préclinique a montré des similitudes remarquables avec les patients atteints de LAM, ce qui en fait un outil important pour l'étude des mécanismes de résistance à la GVL.

Différents modèles existent pour étudier la réponse GVL, qui peuvent être *in vitro* en cultivant des lignées cellulaires de LAM avec des cellules immunitaires du donneur, suivies d'une mesure de la production par les cellules immunitaires de cytokines telles que le TNF et l'IFN $\gamma$ , de leur prolifération et de leur action cytotoxique envers les blastes. Les modèles de xénogreffes dérivées de patients (patient derived xenografts, PDX) offrent la possibilité d'étudier la réponse des cellules du patient après exposition aux cellules immunitaires du donneur dans des souris immunodéficientes. Bien que les modèles PDX soient plus proches des patients, le contexte biologique est très complexe. L'identification et l'obtention de cellules immunitaires compatibles avec les blastes du patient peuvent constituer un défi, et de nombreux paramètres entrent en jeu, tels que la variété des antigènes engagés et des cellules immunitaires. De plus, les modèles PDX ne peuvent pas représenter fidèlement l'hétérogénéité des patients atteints de LAM, en raison de la sélection de sous-clones spécifiques. Pour ces raisons, nous avons décidé d'utiliser un modèle plus simple et plus robuste pour l'identification des gènes impliqués dans la réponse GVL. Notre modèle MataHari repose sur un seul mésappariement miHA, ce qui simplifie le système et réduit la complexité de la réponse immunitaire. Cela permet de mieux comprendre le mécanisme d'action des cellules immunitaires contre les cellules cancéreuses. De plus, ce modèle garantit que l'antigène cible soit exprimé de manière constante à la surface de nos cellules cancéreuses, ce qui n'est pas forcément le cas dans d'autres modèles. Les résultats sont d'autant plus

reproductibles, et les gènes ou voies de signalisation candidats identifiés ont donc plus de chances d'être applicables en clinique. Enfin, il a été démontré que les mésappariements miHA simples n'induisent pas de maladie délétère du greffon contre l'hôte (GVHD), ce qui évite que ce phénomène soit un facteur confondant dans les études *in vivo*.

Au fil des ans, de nombreux autres modèles que MataHari ont été développés sur un fond C57BL/6, présentés par M. Koyama et al (149). Parmi les plus courants, on retrouve les modèles murins OT-I et OT-II, ciblant respectivement les antigènes de l'ovalbumine OVA257-264 (SIINFEKL) et OVA323-339. La surexpression de ces antigènes dans n'importe quelles cellules tumorales permet de les rendre détectables par les lymphocytes CD8+ OT-I et OT-II, permettant l'étude des mécanismes de la GVL dans différents contextes. Cependant, un désavantage majeur de ces modèles est l'absence d'expression naturelle de ces antigènes chez l'Homme, contrairement au miHA associé au modèle MataHari.

## **Caractérisation de la fenêtre thérapeutique pour un effet**

### **GVL optimal**

Chez les patients, la greffe allogénique de moelle osseuse est le plus souvent réalisée à la suite d'une chimiothérapie, lors de la phase de rémission. Durant cette phase, la quasi-totalité des cellules cancéreuses est éliminée: la leucémie n'est plus détectable chez le patient. Cependant, on sait que le patient peut rechuter après l'expansion de cellules résiduelles non détectables, appelées MRD (minimal residual disease). C'est ainsi l'élimination de ces cellules résiduelles qui est ciblée lors des allogreffes. En effet, le petit nombre de cellules tumorales restant peut être éliminé par les cellules immunitaires du greffon. Lorsque la charge blastique est trop importante, la greffe n'a cependant aucun effet et n'est pas suffisante à elle seule pour éliminer la maladie. La proportion de cellules tumorales par rapport aux cellules du greffon est alors d'une très grande importance dans l'optimisation de la réponse GVL.

Dans notre modèle, nous avons observé que les cellules MH induisent une réponse GVL efficace lorsqu'elles sont injectées 3 jours après les blastes. Cependant, plus l'injection est faite tardivement et moins elle est efficace. Au jour 7, aucun effet GVL n'est ainsi détecté. **(Figure 3)** Au vue des connaissances actuelles, nous pouvons faire l'hypothèse que notre modèle reproduit ce qui est observé chez les patients. Au jour 3, la charge blastique étant très faible, les lymphocytes sont capables d'éliminer les blastes de la même manière qu'ils éliminent la MRD chez les patients en rémission. Cependant, plus l'injection est faite tardivement et plus la charge blastique augmente chez les souris, devenant trop élevée au jour 7 pour que les lymphocytes soient suffisants pour l'éliminer.

Bien que cette explication nous semble la plus probable, une autre hypothèse réside dans l'impact de l'irradiation sur la réponse immunitaire. En effet, il a été montré que l'irradiation permet une modulation de la réponse immunitaire ainsi que du microenvironnement. Elle induit une activation des cellules immunitaires innées, telles que les macrophages ou cellules dendritiques, aboutissant à la production de cytokines pro-inflammatoires et chimiokines favorisant l'action des lymphocytes cytotoxiques. De plus, chez les patients, l'irradiation peut induire la surexpression de molécules du CMH-I à la surface des cellules tumorales. Ce phénomène les rend détectables par les cellules immunitaires et permet leur élimination. Dans les mélanomes, il a aussi été démontré que l'irradiation pouvait avoir un effet sur de nombreux autres aspects de la réponse immunitaire anti-tumorale. Dans les quelques heures suivant l'irradiation, elle induit l'augmentation de la charge peptidique des cellules tumorales, ainsi que l'activation des voies de réparation de l'ADN et l'expression de peptides spécifiques. Il a aussi été montré que l'irradiation pouvait impacter des voies aussi variées que l'hypoxie, le stress cellulaire ou l'expression de néo-antigènes tumoraux. Ainsi, le fait que la réponse GVL soit la plus efficace lors d'une injection de lymphocytes 3 jours après l'injection de blastes pourrait être due, au moins en partie, à la proximité avec le moment d'irradiation des souris receveuses. Cette irradiation pourrait induire un environnement promouvant la réponse immunitaire et accroissant l'effet de l'injection des lymphocytes. Les injections de cellules T aux jours 5 et 7 étant plus éloignées de l'irradiation, elles ne bénéficient plus de l'environnement spécifique induit par l'irradiation. Afin de tester cette hypothèse, nous pourrions irradier de manière

sublétale des souris puis leur injecter des blastes leucémiques. Sept jours plus tard, nous pourrions irradier à nouveau ces souris, à différentes doses plus faibles, puis injecter des lymphocytes MH.

Ainsi, nous avons mis en évidence dans notre modèle murin une fenêtre de temps permettant un effet GVL efficace. Ce phénomène, aussi présent chez les patients, peut être expliqué par de nombreux processus et nécessite de plus amples expérimentations.

## **Rôle de la voie érythrocytaire dans la résistance à la GVL**

Ces dernières années, différentes études ont montré que la perte des gènes du complexe majeur d'histocompatibilité II (CMH II), parmi lesquels *HLA-DPA1*, *HLA-DPB1*, *HLA-DQB1* et *HLA-DRB1*, par les cellules de la LAM est, chez environ 40 % des patients, une cause d'échec de la GVL en raison d'une absence de détection par les cellules immunitaires (75,77,150). Ce phénomène a été observé par M.J. Christopher et al. qui ont analysé 34 patients atteints de LAM avant allo-HSCT et à la rechute, et ont observé une perte d'expression des gènes du CMH II chez 50% d'entre eux (17/34)(78). Dans notre modèle, cette perte des gènes associés au CMH II n'a pas été observée, et le phénotype de résistance a été associé à une augmentation de la réponse immunitaire après 1 cycle de traitement par cellules MH, suivie d'une activation des programmes transcriptionnels de type érythrocytaire.

Cette activation d'un programme érythrocytaire a déjà été observée dans une certaine mesure chez des patients atteints de LAM en dehors d'un contexte d'allogreffe, avec l'expression du marqueur érythrocytaire CD71 (récepteur de transfert 1) sur des blastes (151–153). Ce gène est associé à l'absorption cellulaire du fer, ce qui est similaire à notre observation de l'absorption du fer et des voies liées à l'hème et aux porphyrines qui sont régulées à la hausse dans les blastes résistants à la GVL. L'absorption du fer joue un rôle important dans le développement des LAM puisqu'il a été démontré que les cellules de la LAM ont une demande accrue en fer, qui est nécessaire à leur prolifération et à leur survie. L'expression des protéines régulatrices du fer, telles que le récepteur de la transferrine 1 (TfR1) et le transporteur de métaux

divalents 1 (DMT1), est également surexprimé dans les cellules de la LAM, ce qui indique leur capacité accrue d'absorption du fer(154).

L'absorption du fer est régulée par diverses voies de signalisation, notamment la voie du facteur inductible par l'hypoxie (HIF), qui sont des facteurs de transcription régulant l'expression des gènes impliqués dans le métabolisme du fer, l'angiogenèse et la survie cellulaire. Dans les LAM, la surexpression de HIF-1 $\alpha$  a aussi été observée, et favorise l'absorption du fer afin d'augmenter la survie et la prolifération des cellules de la LAM (155,156). Des thérapies par chélation du fer, qui réduisent la disponibilité du fer pour les cellules de la LAM, inhibent la prolifération des cellules de la LAM et induisent leur apoptose, et des chélateurs du fer tels que la déféroxamine et le déférasirox ont été étudiés en tant qu'agents thérapeutiques potentiels dans les LAM. Dans nos données, nous constatons que la signature de la rechute est corrélée à une augmentation de la signature "absorption et transport du fer" (**Figure 5F**), soulignant une fois de plus l'importance du métabolisme du fer dans la pathogenèse des LAM et suggérant que le ciblage des voies d'absorption du fer pourrait être une stratégie thérapeutique prometteuse pour minimiser le risque de rechute après une allogreffe.

Parallèlement, les porphyrines sont des composés organiques qui jouent un rôle crucial dans la synthèse de l'hème. L'hème est un composant essentiel de l'hémoglobine, qui est responsable du transport de l'oxygène dans le sang. Dans les LAM, des études ont démontré que le métabolisme des porphyrines est altéré, ce qui entraîne l'accumulation de précurseurs de porphyrines dans le sang et l'urine des patients (157,158). Des études ont également suggéré que le métabolisme de l'hème, qui est étroitement lié au métabolisme des porphyrines, joue un rôle dans le développement, la progression et la sensibilité aux médicaments des LAM. Plus précisément, des altérations de l'expression et de l'activité des enzymes impliquées dans la synthèse de l'hème ont été observées dans les cellules de la LAM, et l'on pense que ces changements contribuent à la survie et à la prolifération des cellules leucémiques. En outre, certains chercheurs ont suggéré que le ciblage du métabolisme de l'hème pourrait constituer une stratégie thérapeutique potentielle. Par exemple, l'inhibition de l'activité des enzymes de biosynthèse de l'hème peut conduire à l'accumulation de précurseurs toxiques de l'hème, ce qui peut induire la mort cellulaire dans les cellules leucémiques.

Enfin, *Gata1* est un régulateur principal de la différenciation érythrocytaire, et nous avons constaté que trois ensembles de gènes liés à *Gata1* étaient corrélés à notre signature de rechute (**Figure 5E**). De plus, il s'agit du programme transcriptionnel associé à la voie érythrocytaire à la p-value la plus élevée lorsque nous comparons les cellules ayant reçu 3 cycles de traitement MH et les cellules CT (MH T3 vs CT T1, **Figure 5B, Table supplémentaire 1**). La raison pour laquelle la différenciation érythrocytaire semble se produire dans les blastes de LAM reste à étudier, mais des indices pourraient résider dans la surexpression de la voie EPO-ACTIVATES-RAS. L'érythropoïétine (EPO) est une hormone qui stimule la production des globules rouges et dont il a été démontré qu'elle favorise la croissance et la survie des cellules des LAM. Elle peut également activer la voie Ras en se liant au récepteur de l'EPO (EPOR) à la surface des blastes leucémiques, ce qui entraîne l'activation de la voie de signalisation Janus Kinase 2 (JAK2), et enfin l'activation de Ras, favorisant la croissance cellulaire et inhibant l'apoptose des blastes de la LAM.

Dans l'ensemble, ces résultats suggèrent que le métabolisme de l'hème et plus généralement les voies érythrocytaires jouent un rôle prépondérant dans la résistance des cellules de LAM à la GVL. Ces hypothèses doivent cependant être validées. Dans ce but, nous avons récemment conçu des shRNAs (short hairpin RNAs, petits ARNs en épingle à cheveux) ciblant deux gènes majeurs liés au métabolisme de l'hème qui sont tous deux surexprimés dans notre étude : *Gata1* et *Alas2*. Après l'injection dans des souris receveuses de blastes MLL-AF9 naïfs ou résistants à la GVL dont l'expression de *Gata1* ou *Alas2* sera diminuée par shRNA, nous les traiterons avec des cellules T MH et évaluerons si les blastes résistants à la GVL sont re-sensibilisés à la GVL après le knock-down de *Gata1* ou *Alas2*.

## **Rôle de l'IFN $\gamma$ dans la résistance à la GVL**

Plusieurs études ont suggéré que l'expression de l'interféron gamma (IFN- $\gamma$ ) pourrait jouer un rôle dans la résistance des cellules de la LAM à l'effet GVL. Récemment, J. Vadakekolathu et al. ont montré que les profils d'ARNm liés à l'IFN- $\gamma$  permettent de prédire la résistance des patients atteints de LAM à la chimiothérapie (159). Bien que l'expression de l'IFN- $\gamma$  soit généralement associée à une réponse antitumorale, il a été démontré qu'elle pouvait favoriser la progression de la tumeur dans les cas de

mélanome. Dans des conditions d'exposition continue aux antigènes, l'IFN- $\gamma$  peut activer un programme cellulaire dépendant de STAT1 qui favorise la résistance à la radiothérapie et aux immunothérapies médiées par des inhibiteurs de points de contrôle immunitaire tels que CTLA-4 (cytotoxic T-lymphocyte antigen 4).

Dans notre étude, nous avons également trouvé une association significative entre l'expression de l'IFN- $\gamma$  et la réponse GVL chez la souris (**Table supplémentaire 1**). Après un cycle de traitement, les ensembles de gènes liés à la voie de IFN- $\gamma$  sont les plus surexprimés. Ces résultats suggèrent que l'inflammation et l'IFN- $\gamma$  peuvent jouer un rôle important dans la régulation de la réponse GVL précoce dans les LAM et qu'il peut s'agir d'une cible thérapeutique potentielle pour améliorer son efficacité dans le traitement des LAM résistantes. Cependant, après trois cycles d'exposition aux cellules MH, ces caractéristiques inflammatoires disparaissent au profit de caractéristiques érythrocytaires. D'autres études sont nécessaires pour mieux comprendre le rôle de l'IFN- $\gamma$  dans la réponse GVL et pour explorer des stratégies thérapeutiques ciblant cette voie de signalisation. Une approche possible consisterait à inhiber différents médiateurs de la voie de l'IFN- $\gamma$  dans les blastes résistants à la GVL après un ou plusieurs cycles de traitement MH, et à les co-cultiver avec des cellules T ou à les injecter dans des souris receveuses qui seront ensuite traitées avec des cellules T, afin d'évaluer si l'inhibition de ces médiateurs permet de resensibiliser les blastes à la réponse à la GVL.

En conclusion, l'ensemble de ces résultats montre que notre modèle récapitule de nombreuses caractéristiques importantes observées chez les patients leucémiques. De plus, la compréhension de la réponse GVL est étroitement liée à la compréhension de la manière dont les cellules tumorales sont capables de résister aux immunothérapies. Comprendre les mécanismes de la réponse GVL est donc un enjeu majeur, essentiel au développement de nouvelles thérapies efficaces contre les LAM.

---

## Articles publiés durant la thèse en co-auteur

---

### **P2RY2-AKT activation is a therapeutically actionable consequence of XPO1 inhibition in acute myeloid leukemia.**

Lin KH, Rutter JC, Xie A, Killarney ST, Vaganay C, **Benaksas C**, Ling F, Sodaro G, Meslin PA, Bassil CF, Fenouille N, Hoj J, Washart R, Ang HX, Cerda-Smith C, Chaintreuil P, Jacquel A, Auberger P, Forget A, Itzykson R, Lu M, Lin J, Pierobon M, Sheng Z, Li X, Chilkoti A, Owzar K, Rizzieri DA, Pardee TS, Benajiba L, Petricoin E, Puissant A, Wood KC. *Nat Cancer*. 2022 Jul;3(7):837-851. doi: 10.1038/s43018-022-00394-x. Epub 2022 Jun 6. PMID: 35668193

Le selinexor est un inhibiteur de l'exportine nucléaire XPO1 approuvé par la FDA (American Food and Drug Administration), et utilisé dans des cancers solides et liquides. Cette étude vise à identifier les mécanismes sous-jacents aux effets anticancéreux du selinexor, dans les leucémies aiguës myéloïdes (LAM). Il a été observé que le selinexor augmente les niveaux d'ATP extracellulaire, ce qui active le récepteur P2RY2 et sa voie de signalisation en aval impliquant la protéine AKT. L'étude a également démontré que l'axe P2RY2-AKT est crucial pour la survie des cellules de la LAM et que le ciblage de cette voie par des approches génétiques ou pharmacologiques sensibilise les cellules de LAM au traitement par le selinexor. De plus, la combinaison du selinexor avec l'inhibiteur d'AKT Ipatasertib a montré un effet synergique dans la suppression de la croissance des LAM à la fois *in vitro* et *in vivo*. Dans cette étude, j'ai pu démontrer que la combinaison de ces deux inhibiteurs était significativement plus efficace qu'une chimiothérapie standard (cytarabine et doxorubicine) sur un modèle murin syngénique portant la translocation MLL-AF9 ainsi que sur deux modèles de xénogreffes dérivées de cellules de patients (PDX). De plus, j'ai testé la combinaison des deux inhibiteurs sur PDX ainsi que sur des cellules primaires de patients *in vitro*, afin d'identifier une association entre le paysage



mutationnel des cellules de patients et leur réponse au traitement. Ces résultats suggèrent que l'axe P2RY2-AKT représente une cible thérapeutique potentielle dans les LAM et que la combinaison du selinexor avec des inhibiteurs de P2RY2 pourrait améliorer significativement l'efficacité du traitement au selinexor.

## Cystine uptake inhibition potentiates front-line therapies in acute myeloid leukemia.

Pardieu B, Pasanisi J, Ling F, Dal Bello R, Penneroux J, Su A, Joudinaud R, Chat L, Wu HC, Duchmann M, Sodaro G, Chauvel C, Castelli FA, Vasseur L, Pacchiardi K, Belloucif Y, Laiguillon MC, Meduri E, Vaganay C, Alexe G, Berrou J, **Benaksas C**, Forget A, Braun T, Gardin C, Raffoux E, Clappier E, Adès L, de Thé H, Fenaille F, Huntly BJ, Stegmaier K, Dombret H, Fenouille N, Lobry C, Puissant A, Itzykson R. *Leukemia*. 2022 Jun;36(6):1585-1595. doi: 10.1038/s41375-022-01573-6. Epub 2022 Apr 26. PMID: 35474100

A l'aide d'analyses métaboliques, nous avons exploré le potentiel thérapeutique de l'inhibition de l'absorption de la cystine pour améliorer l'efficacité des thérapies de première ligne dans les leucémies aiguës myéloïdes (LAM). Nous avons ainsi mis en évidence que les cellules de la LAM dépendent de l'absorption de la cystine pour survivre et que l'inhibition de ce processus par un traitement à la sulfasalazine sensibilise ces cellules à la chimiothérapie *in vitro* et *in vivo*. En particulier, l'anthracycline daunorubicine a démontré le plus grand effet synergique *in vitro*. Sur des échantillons primaires de patients, l'ajout de sulfasalazine à une chimiothérapie standard par daunorubicine et cytarabine induit un effet anti-leucémique significativement plus important que la chimiothérapie seule. Cette étude a également démontré que le mécanisme à l'origine de cet effet synergique impliquait l'induction d'espèces réactives de l'oxygène et de dommages à l'ADN. En outre, nous avons identifié plusieurs biomarqueurs potentiels qui pourraient être utilisés pour prédire quels patients atteints de LAM sont susceptibles de bénéficier d'un traitement par inhibition de l'absorption de la cystine. Dans cette étude, j'ai pu fournir une aide technique sur différentes expériences *in vivo*, en effectuant des biopsies de moelle osseuse et en participant au traitement des souris. Dans l'ensemble, l'étude suggère que l'inhibition de la capture de la cystine pourrait être une stratégie thérapeutique prometteuse pour améliorer le traitement des patients atteints de LAM.

### **A multiparametric niche-like drug screening platform in acute myeloid leukemia.**

Dal Bello R, Pasanisi J, Joudinaud R, Duchmann M, Pardieu B, Ayaka P, Di Feo G, Sodaro G, Chauvel C, Kim R, Vasseur L, Chat L, Ling F, Pacchiardi K, Vaganay C, Berrou J, **Benaksas C**, Boissel N, Braun T, Preudhomme C, Dombret H, Raffoux E, Fenouille N, Clappier E, Adès L, Puissant A, Itzykson R. *Blood Cancer J.* 2022 Jun 24;12(6):95. doi: 10.1038/s41408-022-00689-3. PMID: 35750691

Dans les Leucémies Aiguës Myéloïdes (LAM), la médecine fonctionnelle de précision s'appuie généralement sur des tests de sensibilité aux médicaments (DSS, drug sensitivity screen) *in vitro* à court terme sur des cellules primaires de patients. Pour améliorer la précision de ces tests, nous avons conçu une plateforme de DSS aux conditions proches de la niche médullaire puisqu'elle combine l'hypoxie physiologique, la coculture de cellules stromales mésenchymateuses et un milieu similaire au plasma. Cette plateforme est couplée à une analyse par cytométrie de flux multiparamétrique permettant d'identifier les lymphocytes, les cellules en cours de différenciation ou un enrichissement en cellules souches leucémiques au sein de la masse leucémique. Notre plateforme a été affinée en incluant des concentrations d'acides aminés et de cytokines similaires à celles du plasma, identifiées par des analyses métabolomiques et protéomiques ciblées d'échantillons primaires de plasma de moelle osseuse de LAM. Dans une cohorte de 45 échantillons de LAM enrichis en mutations NPM1c, notre test multiparamétrique de type niche a permis de prédire la réponse à la chimiothérapie d'induction anthracycline-cytarabine et d'identifier le ruxolitinib comme sensibilisateur à l'anthracycline-cytarabine. Dans cette étude, j'ai pu fournir une aide technique sur différentes expériences. Notre méthode de culture a préservé l'architecture clonale et les états transcriptionnels des cellules leucémiques primaires, ce qui en fait un outil potentiel pour la médecine de précision dans la LAM.

**Targeting acute myeloid leukemia dependency on VCP-mediated DNA repair through a selective second-generation small-molecule inhibitor.**

Roux B, Vaganay C, Vargas JD, Alexe G, **Benaksas C**, Pardieu B, Fenouille N, Ellegast JM, Malolepsza E, Ling F, Sodaro G, Ross L, Pikman Y, Conway AS, Tang Y, Wu T, Anderson DJ, Le Moigne R, Zhou HJ, Luciano F, Hartigan CR, Galinsky I, DeAngelo DJ, Stone RM, Auberger P, Schenone M, Carr SA, Guirouilh-Barbat J, Lopez B, Khaled M, Lage K, Hermine O, Hemann MT, Puissant A, Stegmaier K, Benajiba L. *Sci Transl Med.* 2021 Mar 31;13(587):eabg1168. doi: 10.1126/scitranslmed.abg1168.PMID: 33790022

Cette étude s'intéresse au potentiel thérapeutique du ciblage de la protéine contenant de la valosine (VCP), une protéine qui joue un rôle critique dans la réparation de l'ADN, dans le traitement des leucémies aiguës myéloïdes (LAM). En utilisant une approche de criblage à haut débit, nous avons identifié une petite molécule inhibitrice de VCP, le CB-5339, qui inhibe sélectivement la croissance des cellules de LAM sans affecter les cellules hématopoïétiques normales. Cette étude démontre que le traitement au CB-5339 induit des dommages à l'ADN et l'apoptose des cellules de LAM, et qu'il agit en synergie avec les chimiothérapies standards pour renforcer leur activité anti-leucémique. En outre, l'inhibition du VCP par le CB-5339 entraîne une diminution de l'activité de réparation de l'ADN par recombinaison homologe, qui est nécessaire à la survie des cellules de LAM. Dans cette étude, j'ai pu valider que le traitement au CB-5339 était efficace dans deux modèles murins de xénogreffes dérivées de cellules de patients (PDX) atteints de LAM. Ces résultats suggèrent ainsi que le CB-5339, en ciblant la réparation de l'ADN médiée par le VCP, pourrait constituer une stratégie thérapeutique prometteuse pour le traitement des LAM, et justifient la poursuite du développement clinique du CB-5339 en tant que nouvel agent anti-leucémique.

## The Folate Cycle Enzyme MTHFR Is a Critical Regulator of Cell Response to MYC-Targeting Therapies.

Su A, Ling F, Vaganay C, Sodaro G, **Benaksas C**, Dal Bello R, Forget A, Pardieu B, Lin KH, Rutter JC, Bassil CF, Fortin G, Pasanisi J, Antony-Debré I, Alexe G, Benoist JF, Pruvost A, Pikman Y, Qi J, Schlageter MH, Micol JB, Roti G, Cluzeau T, Dombret H, Preudhomme C, Fenouille N, Benajiba L, Golan HM, Stegmaier K, Lobry C, Wood KC, Itzykson R, Puissant A. *Cancer Discov.* 2020 Dec;10(12):1894-1911. doi: 10.1158/2159-8290.CD-19-0970. Epub 2020 Aug 21. PMID: 32826232

La dérégulation du métabolisme cellulaire a été démontrée comme étant un déterminant majeur de la progression des cancers, dont les leucémies aiguës myéloïdes (LAM). Notre étude s'intéresse ainsi au rôle de la méthylène-tétrahydrofolate réductase (MTHFR), enzyme du cycle des folates, dans la régulation de la réponse des cellules cancéreuses aux thérapies ciblant MYC. MYC est un facteur de transcription fréquemment dérégulé dans les cancers et constitue une cible thérapeutique prometteuse, mais l'inhibition de MYC à elle seule est souvent insuffisante pour induire la mort des cellules cancéreuses. Notre étude démontre que les niveaux d'expression de MTHFR sont élevés dans les cellules cancéreuses mutées pour MYC et que l'inhibition de MTHFR renforce l'efficacité des thérapies ciblant MYC *in vitro* et *in vivo*. De plus, il a été montré que l'inhibition de l'expression de MTHFR induit une résistance des cellules cancéreuses à des traitements tels que les BET inhibiteurs (Bromodomain and Extra-Terminal motif), des agents permettant un remodelage épigénétique essentiel à l'élimination des cellules de LAM. Dans cette étude, j'ai pu valider *in vitro* l'effet de la combinaison d'un BET inhibiteur (OTX-015) et différents traitements ciblant des enzymes impliquées dans la régulation épigénétique sur des cellules provenant de patients leucémiques. J'ai pu identifier un traitement, l'EPZ-6438, qui permet d'antagoniser l'effet de l'OTX-015, indiquant que les cibles de l'EPZ-6438 sont essentielles à l'action du BET inhibiteur OTX-015 et pourraient aussi être touchées lorsque MTHFR est inhibé. Mécaniquement, l'inhibition de MTHFR conduit à l'accumulation de métabolites du folate intracellulaires, qui induisent des dommages à l'ADN et renforcent l'apoptose en réponse à l'inhibition de MYC. Cette étude montre

que le MTHFR est un régulateur essentiel de la réponse des cellules cancéreuses induites par une mutation de MYC à la thérapie, et suggère que le ciblage du cycle des folates par des inhibiteurs du MTHFR pourrait être une stratégie prometteuse pour améliorer l'efficacité des thérapies ciblant MYC dans les LAM.

## **Niche-like Ex Vivo High Throughput (NEXT) Drug Screening Platform in Acute Myeloid Leukemia.**

Dal Bello Figueiras R, Pasanisi J, Joudinaud R, Duchmann M, Sodaro M, Chauvel C, Vasseur L, Pardieu B, Ling F, Pacchiardi K, Vaganay C, Faivre L, **Benaksas C**, Preudhomme C, Raffoux E, Clappier E, Ades L, Puissant A, Itzykson R. Blood 2020 Nov 136(Supplement 1):12-13 doi:10.1182/blood-2020-137048

Dans les leucémies aiguës myéloïdes (LAM), les cellules souches leucémiques (CSL) sont considérées comme responsables de la récurrence de la maladie et de la résistance à la chimiothérapie. Notre étude présente une nouvelle plateforme de criblage permettant d'identifier, sur cellules primaires de patients, les traitements qui ciblent les CSL (GPR56+). La plateforme utilise une combinaison de plusieurs paramètres clés qui imitent la niche de la moelle osseuse dans laquelle résident les CSL, notamment le degré d'hypoxie, la coculture de cellules stromales et les composants de la matrice extracellulaire. En criblant des cellules provenant de différents patients leucémiques portant des mutations du gène NPM1 avec une chimiothérapie standard (cytarabine et daunorubicine) combinée ou non à un panel d'autres traitements, nous avons validé la pertinence de notre plateforme. Nous avons pu mesurer la viabilité, différenciation, et capacité souche de nos cellules de LAM, et identifier grâce à notre plateforme des caractéristiques spécifiques à chaque traitement, telles que la capacité du venetoclax à éliminer les cellules souches leucémiques. En outre, la plateforme a permis d'identifier des médicaments qui améliorent l'efficacité des chimiothérapies standards lorsqu'ils sont donnés en complément. Cette étude, dans laquelle j'ai pu fournir une aide technique sur différents aspects, démontre ainsi que cette plateforme de criblage très similaire à la niche pourrait être un outil précieux pour développer des traitements plus efficaces contre les LAM.

---

## Bibliographie

---

1. Khwaja A, Bjorkholm M, Gale RE, Levine RL, Jordan CT, Ehninger G, et al. Acute myeloid leukaemia. *Nat Rev Dis Primer*. 10 mars 2016;2(1):1-22.
2. Key Statistics for Acute Myeloid Leukemia (AML) [Internet]. [cité 24 avr 2023]. Disponible sur: <https://www.cancer.org/cancer/acute-myeloid-leukemia/about/key-statistics.html>
3. Shallis RM, Wang R, Davidoff A, Ma X, Zeidan AM. Epidemiology of acute myeloid leukemia: Recent progress and enduring challenges. *Blood Rev*. juill 2019;36:70-87.
4. Hwang SM. Classification of acute myeloid leukemia. *Blood Res*. 31 juill 2020;55(S1):S1-4.
5. Grimwade D, Walker H, Oliver F, Wheatley K, Harrison C, Harrison G, et al. The Importance of Diagnostic Cytogenetics on Outcome in AML: Analysis of 1,612 Patients Entered Into the MRC AML 10 Trial. *Blood*. 1 oct 1998;92(7):2322-33.
6. Pelcovits A, Niroula R. Acute Myeloid Leukemia: A Review. :3.
7. Winters AC, Bernt KM. MLL-Rearranged Leukemias—An Update on Science and Clinical Approaches. *Front Pediatr* [Internet]. 2017 [cité 9 févr 2023];5. Disponible sur: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fped.2017.00004>
8. Okada Y, Feng Q, Lin Y, Jiang Q, Li Y, Coffield VM, et al. hDOT1L links histone methylation to leukemogenesis. *Cell*. 22 avr 2005;121(2):167-78.
9. Zhang W, Xia X, Reisenauer MR, Hemenway CS, Kone BC. Dot1a-AF9 Complex Mediates Histone H3 Lys-79 Hypermethylation and Repression of ENaC $\alpha$  in an Aldosterone-sensitive Manner. *J Biol Chem*. 30 juin 2006;281(26):18059-68.
10. Okada Y, Jiang Q, Lemieux M, Jeannotte L, Su L, Zhang Y. Leukaemic transformation by CALM-AF10 involves upregulation of Hoxa5 by hDOT1L. *Nat Cell Biol*. sept 2006;8(9):1017-24.
11. Corral J, Lavenir I, Impey H, Warren AJ, Forster A, Larson TA, et al. An Mll-AF9 fusion gene made by homologous recombination causes acute leukemia in chimeric mice: a method to create fusion oncogenes. *Cell*. 14 juin 1996;85(6):853-61.
12. Recommandations Leucémies aiguës de l'adulte [Internet]. VIDAL. [cité 29 sept 2022]. Disponible sur: <https://www.vidal.fr/maladies/recommandations/leucemies-aigues-de-l-adulte-4055.html>
13. Anthracycline Dose Intensification in Acute Myeloid Leukemia | NEJM [Internet]. [cité 27 sept 2022]. Disponible sur: <https://www-nejm-org.proxy.insermbiblio.inist.fr/doi/full/10.1056/NEJMoa0904544>



14. Lancet JE, Uy GL, Cortes JE, Newell LF, Lin TL, Ritchie EK, et al. CPX-351 (cytarabine and daunorubicin) Liposome for Injection Versus Conventional Cytarabine Plus Daunorubicin in Older Patients With Newly Diagnosed Secondary Acute Myeloid Leukemia. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 10 sept 2018;36(26):2684-92.
15. Targeted Therapy Drugs for Acute Myeloid Leukemia (AML) [Internet]. [cité 11 oct 2022]. Disponible sur: <https://www.cancer.org/cancer/acute-myeloid-leukemia/treating/targeted-therapy.html>
16. Ye D, Guan KL, Xiong Y. Metabolism, Activity, and Targeting of D- and L-2-Hydroxyglutarates. *Trends Cancer*. 1 févr 2018;4(2):151-65.
17. Molica M, Perrone S, Mazzone C, Niscola P, Cesini L, Abruzzese E, et al. CD33 Expression and Gentuzumab Ozogamicin in Acute Myeloid Leukemia: Two Sides of the Same Coin. *Cancers*. janv 2021;13(13):3214.
18. InfoCancer - ARCAGY - GINECO -Traitements - Greffes - Les greffes de moelle osseuse - Les allogreffes [Internet]. [cité 10 oct 2022]. Disponible sur: <http://www.arcagy.org/infocancer/traitement-du-cancer/greffes/les-greffes-de-moelle-osseuse/les-allogreffes.html/>
19. Tang D, Kang R, Coyne CB, Zeh HJ, Lotze MT. PAMPs and DAMPs: signal 0s that spur autophagy and immunity. *Immunol Rev*. sept 2012;249(1):158-75.
20. B and T Lymphocytes Related to the Adaptive Immune Response - Body Defenses and Fighting Infection | Lymphatic System and Immunity [Internet]. [pharmacy180.com](http://www.pharmacy180.com). [cité 10 mars 2023]. Disponible sur: <https://www.pharmacy180.com/article/b-and-t-lymphocytes-related-to-the-adaptive-immune-response-3642/>
21. Dubreuil L. Contribution des marqueurs polymorphes KIR et HLA sur le répertoire des cellules Natural Killer en greffes de cellules souches hématopoïétiques haplo-identiques [Internet] [These de doctorat]. Nantes; 2021 [cité 10 mars 2023]. Disponible sur: <https://www.theses.fr/2021NANT1041>
22. Chaplin DD. Overview of the Immune Response. *J Allergy Clin Immunol*. févr 2010;125(2 Suppl 2):S3.
23. Jullien D, Afanassieff M, Claudy A, Nicolas J, Kaiserlian D. CD1 : une nouvelle famille de molécules présentatrices d'antigènes aux caractéristiques singulières. *médecine/sciences*. 1999;15(1):7.
24. Prigozy TI, Naidenko O, Qasba P, Elewaut D, Brossay L, Khurana A, et al. Glycolipid antigen processing for presentation by CD1d molecules. *Science*. 26 janv 2001;291(5504):664-7.
25. Rossi FMV, Corbel SY, Merzaban JS, Carlow DA, Gossens K, Duenas J, et al. Recruitment of adult thymic progenitors is regulated by P-selectin and its ligand PSGL-1. *Nat Immunol*. juin 2005;6(6):626-34.
26. Kurobe H, Liu C, Ueno T, Saito F, Ohigashi I, Seach N, et al. CCR7-dependent cortex-to-medulla migration of positively selected thymocytes is essential for

- establishing central tolerance. *Immunity*. févr 2006;24(2):165-77.
27. Ueno T, Saito F, Gray DHD, Kuse S, Hieshima K, Nakano H, et al. CCR7 signals are essential for cortex-medulla migration of developing thymocytes. *J Exp Med*. 16 août 2004;200(4):493-505.
  28. THAPA P, FARBER DL. THE ROLE OF THE THYMUS IN THE IMMUNE RESPONSE. *Thorac Surg Clin*. mai 2019;29(2):123-31.
  29. Chapitre 6 [Internet]. [cité 10 mars 2023]. Disponible sur: [https://lvts.fr/Pages\\_html/Encyclopedies/Cours%20Immuno/chapitre%206.htm](https://lvts.fr/Pages_html/Encyclopedies/Cours%20Immuno/chapitre%206.htm)
  30. Kent A, Longino NV, Christians A, Davila E. Naturally Occurring Genetic Alterations in Proximal TCR Signaling and Implications for Cancer Immunotherapy. *Front Immunol* [Internet]. 2021 [cité 4 janv 2023];12. Disponible sur: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2021.658611>
  31. Zhang W, Triple RP, Samelson LE. LAT Palmitoylation: Its Essential Role in Membrane Microdomain Targeting and Tyrosine Phosphorylation during T Cell Activation. *Immunity*. 1 août 1998;9(2):239-46.
  32. Kisielow P, Blüthmann H, Staerz UD, Steinmetz M, von Boehmer H. Tolerance in T-cell-receptor transgenic mice involves deletion of nonmature CD4+8+ thymocytes. *Nature*. juin 1988;333(6175):742-6.
  33. Tanchot C, Guillaume S, Delon J, Bourgeois C, Franzke A, Sarukhan A, et al. Modifications of CD8+ T cell function during in vivo memory or tolerance induction. *Immunity*. mai 1998;8(5):581-90.
  34. Martin MD, Badovinac VP. Defining Memory CD8 T Cell. *Front Immunol*. 2018;9:2692.
  35. Glatzová D, Cebecauer M. Dual Role of CD4 in Peripheral T Lymphocytes. *Front Immunol* [Internet]. 2019 [cité 12 janv 2023];10. Disponible sur: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2019.00618>
  36. Herberman RB, Nunn ME, Lavrin DH. Natural cytotoxic reactivity of mouse lymphoid cells against syngeneic acid allogeneic tumors. I. Distribution of reactivity and specificity. *Int J Cancer*. 15 août 1975;16(2):216-29.
  37. Kiessling R, Klein E, Wigzell H. « Natural » killer cells in the mouse. I. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Specificity and distribution according to genotype. *Eur J Immunol*. févr 1975;5(2):112-7.
  38. Langers I, Renoux VM, Thiry M, Delvenne P, Jacobs N. Natural killer cells: role in local tumor growth and metastasis. *Biol Targets Ther*. 2012;6:73-82.
  39. Sojka DK, Yang L, Yokoyama WM. Uterine Natural Killer Cells. *Front Immunol*. 1 mai 2019;10:960.
  40. Scoville SD, Freud AG, Caligiuri MA. Modeling Human Natural Killer Cell Development in the Era of Innate Lymphoid Cells. *Front Immunol*. 2017;8:360.

41. Narni-Mancinelli É, Ugolini S, Vivier É. Les cellules natural killer - Adaptation et mémoire dans le système immunitaire inné. *médecine/sciences*. 1 avr 2013;29(4):389-95.
42. Perera Molligoda Arachchige AS. Human NK cells: From development to effector functions. *Innate Immun*. avr 2021;27(3):212-29.
43. Barnes DWH, Corp MJ, Loutit JF, Neal FE. Treatment of Murine Leukaemia with X Rays and Homologous Bone Marrow. *Br Med J*. 15 sept 1956;2(4993):626-7.
44. Agence de la biomédecine [Internet]. [cité 30 janv 2023]. Disponible sur: <https://rams.agence-biomedecine.fr/activite-nationale-de-greffe-de-csh-0>
45. Jethava YS, Sica S, Savani B, Socola F, Jagasia M, Mohty M, et al. Conditioning regimens for allogeneic hematopoietic stem cell transplants in acute myeloid leukemia. *Bone Marrow Transplant*. nov 2017;52(11):1504-11.
46. Seggewiss R, Einsele H. Immune reconstitution after allogeneic transplantation and expanding options for immunomodulation: an update. *Blood*. 13 mai 2010;115(19):3861-8.
47. Storek J. Immunological reconstitution after hematopoietic cell transplantation – its relation to the contents of the graft. *Expert Opin Biol Ther*. 1 mai 2008;8(5):583-97.
48. Bleakley M, Riddell SR. Molecules and mechanisms of the graft-versus-leukaemia effect. *Nat Rev Cancer*. mai 2004;4(5):371-80.
49. Blazar BR, Hill GR, Murphy WJ. Dissecting the biology of allogeneic HSCT to enhance the GvT effect whilst minimizing GvHD. *Nat Rev Clin Oncol*. août 2020;17(8):475-92.
50. Sweeney C, Vyas P. The Graft-Versus-Leukemia Effect in AML. *Front Oncol* [Internet]. 2019 [cité 10 mars 2023];9. Disponible sur: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fonc.2019.01217>
51. Coley WB. II. Contribution to the Knowledge of Sarcoma. *Ann Surg*. sept 1891;14(3):199-220.
52. Coley WB. The treatment of malignant tumors by repeated inoculations of erysipelas. With a report of ten original cases. 1893. *Clin Orthop*. janv 1991;(262):3-11.
53. Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. The Immunobiology of Cancer Immunosurveillance and Immunoediting. *Immunity*. 1 août 2004;21(2):137-48.
54. Shankaran V, Ikeda H, Bruce AT, White JM, Swanson PE, Old LJ, et al. IFN $\gamma$  and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature*. 26 avr 2001;410(6832):1107-11.
55. Girardi M, Glusac E, Filler RB, Roberts SJ, Propperova I, Lewis J, et al. The distinct contributions of murine T cell receptor (TCR) $\gamma$ delta+ and TCR $\alpha$ beta+ T cells to different stages of chemically induced skin cancer. *J Exp Med*. 1 sept

- 2003;198(5):747-55.
56. Girardi M, Oppenheim DE, Steele CR, Lewis JM, Glusac E, Filler R, et al. Regulation of cutaneous malignancy by gammadelta T cells. *Science*. 19 oct 2001;294(5542):605-9.
  57. Smyth MJ, Crowe NY, Godfrey DI. NK cells and NKT cells collaborate in host protection from methylcholanthrene-induced fibrosarcoma. *Int Immunol*. avr 2001;13(4):459-63.
  58. Wang Y, Chen C, Dong F, Ma S, Xu J, Gong Y, et al. NK cells play a significant role in immunosurveillance at the early stage of MLL-AF9 acute myeloid leukemia via CD226/CD155 interactions. *Sci China Life Sci*. déc 2015;58(12):1288-98.
  59. van den Broek ME, Kägi D, Ossendorp F, Toes R, Vamvakas S, Lutz WK, et al. Decreased tumor surveillance in perforin-deficient mice. *J Exp Med*. 1 nov 1996;184(5):1781-90.
  60. Smyth MJ, Thia KY, Street SE, Cretney E, Trapani JA, Taniguchi M, et al. Differential tumor surveillance by natural killer (NK) and NKT cells. *J Exp Med*. 21 févr 2000;191(4):661-8.
  61. Street SE, Cretney E, Smyth MJ. Perforin and interferon-gamma activities independently control tumor initiation, growth, and metastasis. *Blood*. 1 janv 2001;97(1):192-7.
  62. Smyth MJ, Thia KY, Street SE, MacGregor D, Godfrey DI, Trapani JA. Perforin-mediated cytotoxicity is critical for surveillance of spontaneous lymphoma. *J Exp Med*. 4 sept 2000;192(5):755-60.
  63. Owen KL, Brockwell NK, Parker BS. JAK-STAT Signaling: A Double-Edged Sword of Immune Regulation and Cancer Progression. *Cancers*. déc 2019;11(12):2002.
  64. Kaplan DH, Shankaran V, Dighe AS, Stockert E, Aguet M, Old LJ, et al. Demonstration of an interferon gamma-dependent tumor surveillance system in immunocompetent mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 23 juin 1998;95(13):7556-61.
  65. Dighe AS, Richards E, Old LJ, Schreiber RD. Enhanced in vivo growth and resistance to rejection of tumor cells expressing dominant negative IFN gamma receptors. *Immunity*. sept 1994;1(6):447-56.
  66. Braumüller H, Wieder T, Brenner E, Aßmann S, Hahn M, Alkhaled M, et al. T-helper-1-cell cytokines drive cancer into senescence. *Nature*. févr 2013;494(7437):361-5.
  67. Hobeika AC, Etienne W, Torres BA, Johnson HM, Subramaniam PS. IFN-gamma Induction of p21WAF1 Is Required for Cell Cycle Inhibition and Suppression of Apoptosis. *J Interferon Cytokine Res*. déc 1999;19(12):1351-61.
  68. Chin YE, Kitagawa M, Kuida K, Flavell RA, Fu XY. Activation of the STAT signaling pathway can cause expression of caspase 1 and apoptosis. *Mol Cell Biol*. sept 1997;17(9):5328-37.

69. Fulda S, Debatin KM. IFN $\gamma$  sensitizes for apoptosis by upregulating caspase-8 expression through the Stat1 pathway. *Oncogene*. avr 2002;21(15):2295-308.
70. Xu X, Fu XY, Plate J, Chong ASF. IFN- $\gamma$  Induces Cell Growth Inhibition by Fas-mediated Apoptosis: Requirement of STAT1 Protein for Up-Regulation of Fas and FasL Expression. *Cancer Res*. 1 juill 1998;58(13):2832-7.
71. Greiner J, Bullinger L, Guinn B, Döhner H, Schmitt M. Leukemia-Associated Antigens Are Critical for the Proliferation of Acute Myeloid Leukemia Cells. *Clin Cancer Res*. 14 nov 2008;14(22):7161-6.
72. Jäger E, Ringhoffer M, Altmannsberger M, Arand M, Karbach J, Jäger D, et al. Immunoselection in vivo: independent loss of MHC class I and melanocyte differentiation antigen expression in metastatic melanoma. *Int J Cancer*. 10 avr 1997;71(2):142-7.
73. Vago L, Perna SK, Zanussi M, Mazzi B, Barlassina C, Stanghellini MTL, et al. Loss of mismatched HLA in leukemia after stem-cell transplantation. *N Engl J Med*. 30 juill 2009;361(5):478-88.
74. Stölzel F, Hackmann K, Kuithan F, Mohr B, Füssel M, Oelschlägel U, et al. Clonal evolution including partial loss of human leukocyte antigen genes favoring extramedullary acute myeloid leukemia relapse after matched related allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Transplantation*. 1 avr 2012;93(7):744-9.
75. Brouwer RE, van der Heiden P, Schreuder GMT, Mulder A, Datema G, Anholts JDH, et al. Loss or downregulation of HLA class I expression at the allelic level in acute leukemia is infrequent but functionally relevant, and can be restored by interferon. *Hum Immunol*. mars 2002;63(3):200-10.
76. Savoia P, D'Alfonso S, Peruccio D, Isabella N, Falda M, Rasegotti L, et al. Loss of surface HLA class I molecules in leukemic myeloblasts is correlated with an increased leukocyte concentration at onset. *Haematologica*. 1 mars 1992;77(2):127-9.
77. Jan M, Leventhal MJ, Morgan EA, Wengrod JC, Nag A, Drinan SD, et al. Recurrent genetic HLA loss in AML relapsed after matched unrelated allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Blood Adv*. 19 juill 2019;3(14):2199-204.
78. Christopher MJ, Petti AA, Rettig MP, Miller CA, Chendamarai E, Duncavage EJ, et al. Immune Escape of Relapsed AML Cells after Allogeneic Transplantation. *N Engl J Med*. 13 déc 2018;379(24):2330-41.
79. Zitvogel L, Tesniere A, Kroemer G. Cancer despite immunosurveillance: immunoselection and immunosubversion. *Nat Rev Immunol*. oct 2006;6(10):715-27.
80. Costello RT, Sivori S, Marcenaro E, Lafage-Pochitaloff M, Mozziconacci MJ, Reviron D, et al. Defective expression and function of natural killer cell-triggering receptors in patients with acute myeloid leukemia. *Blood*. 15 mai 2002;99(10):3661-7.
81. Fauriat C, Moretta A, Olive D, Costello RT. Defective killing of dendritic cells by

- autologous natural killer cells from acute myeloid leukemia patients. *Blood*. 15 sept 2005;106(6):2186-8.
82. Wrzesinski SH, Wan YY, Flavell RA. Transforming growth factor-beta and the immune response: implications for anticancer therapy. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 15 sept 2007;13(18 Pt 1):5262-70.
  83. De Veirman K, Van Valckenborgh E, Lahmar Q, Geeraerts X, De Bruyne E, Menu E, et al. Myeloid-Derived Suppressor Cells as Therapeutic Target in Hematological Malignancies. *Front Oncol*. 8 déc 2014;4:349.
  84. de Bont ESJM, Fidler V, Meeuwssen T, Scherpen F, Hählen K, Kamps WA. Vascular endothelial growth factor secretion is an independent prognostic factor for relapse-free survival in pediatric acute myeloid leukemia patients. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. sept 2002;8(9):2856-61.
  85. Teague RM, Kline J. Immune evasion in acute myeloid leukemia: current concepts and future directions. *J Immunother Cancer*. 27 août 2013;1(1):13.
  86. Gatenby RA, Gillies RJ. Why do cancers have high aerobic glycolysis? *Nat Rev Cancer*. nov 2004;4(11):891-9.
  87. Calcinotto A, Filipazzi P, Grioni M, Iero M, De Milito A, Ricupito A, et al. Modulation of microenvironment acidity reverses anergy in human and murine tumor-infiltrating T lymphocytes. *Cancer Res*. 1 juin 2012;72(11):2746-56.
  88. Alexander JP, Kudoh S, Melsop KA, Hamilton TA, Edinger MG, Tubbs RR, et al. T-cells infiltrating renal cell carcinoma display a poor proliferative response even though they can produce interleukin 2 and express interleukin 2 receptors. *Cancer Res*. 15 mars 1993;53(6):1380-7.
  89. Dong H, Strome SE, Salomao DR, Tamura H, Hirano F, Flies DB, et al. Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion. *Nat Med*. août 2002;8(8):793-800.
  90. Sakuishi K, Apetoh L, Sullivan JM, Blazar BR, Kuchroo VK, Anderson AC. Targeting Tim-3 and PD-1 pathways to reverse T cell exhaustion and restore anti-tumor immunity. *J Exp Med*. 27 sept 2010;207(10):2187-94.
  91. Uyttenhove C, Pilotte L, Théate I, Stroobant V, Colau D, Parmentier N, et al. Evidence for a tumoral immune resistance mechanism based on tryptophan degradation by indoleamine 2,3-dioxygenase. *Nat Med*. oct 2003;9(10):1269-74.
  92. Rodriguez PC, Hernandez CP, Quiceno D, Dubinett SM, Zabaleta J, Ochoa JB, et al. Arginase I in myeloid suppressor cells is induced by COX-2 in lung carcinoma. *J Exp Med*. 3 oct 2005;202(7):931-9.
  93. Zou W. Regulatory T cells, tumour immunity and immunotherapy. *Nat Rev Immunol*. avr 2006;6(4):295-307.
  94. Gabilovich DI, Nagaraj S. Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nat Rev Immunol*. mars 2009;9(3):162-74.

95. Inoue K, Ogawa H, Sonoda Y, Kimura T, Sakabe H, Oka Y, et al. Aberrant overexpression of the Wilms tumor gene (WT1) in human leukemia. *Blood*. 15 févr 1997;89(4):1405-12.
96. Alberta JA, Springett GM, Rayburn H, Natoli TA, Loring J, Kreidberg JA, et al. Role of the WT1 tumor suppressor in murine hematopoiesis. *Blood*. 1 avr 2003;101(7):2570-4.
97. Steger B, Floro L, Amberger DC, Kroell T, Tischer J, Kolb HJ, et al. WT1, PRAME, and PR3 mRNA Expression in Acute Myeloid Leukemia (AML). *J Immunother Hagerstown Md* 1997. 2020;43(6):204-15.
98. Doubrovina E, Carpenter T, Pankov D, Selvakumar A, Hasan A, O'Reilly RJ. Mapping of novel peptides of WT-1 and presenting HLA alleles that induce epitope-specific HLA-restricted T cells with cytotoxic activity against WT-1(+) leukemias. *Blood*. 23 août 2012;120(8):1633-46.
99. Huang J, Lyu H, Wang J, Liu B. Influence of survivin-targeted therapy on chemosensitivity in the treatment of acute myeloid leukemia. *Cancer Lett*. 1 oct 2015;366(2):160-72.
100. Li Y, Lu W, Yang J, Edwards M, Jiang S. Survivin as a biological biomarker for diagnosis and therapy. *Expert Opin Biol Ther*. 2 nov 2021;21(11):1429-41.
101. Activity of SL-401, a targeted therapy directed to interleukin-3 receptor, in blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm patients | *Blood* | American Society of Hematology [Internet]. [cité 10 mars 2023]. Disponible sur: <https://ashpublications.org/blood/article/124/3/385/33131/Activity-of-SL-401-a-targeted-therapy-directed-to>
102. Darrigrand R. Immunomodulateurs de la voie de présentation par le complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (CMH-I) aux propriétés anti-tumorales [Internet] [phdthesis]. Université Paris-Saclay; 2020 [cité 10 mars 2023]. Disponible sur: <https://theses.hal.science/tel-03154681>
103. Chen L. P1.07-026 Predicting Tumor Mutational Burden (TMB) and Tumor Neoantigen Burden (TNB) of East Asian ANSCLC Patients by a Targeted Genomic Profiling. *J Thorac Oncol*. 1 nov 2017;12(11):S2006.
104. Greiner J, Ono Y, Hofmann S, Schmitt A, Mehring E, Götz M, et al. Mutated regions of nucleophosmin 1 elicit both CD4(+) and CD8(+) T-cell responses in patients with acute myeloid leukemia. *Blood*. 9 août 2012;120(6):1282-9.
105. van der Lee DI, Reijmers RM, Honders MW, Hagedoorn RS, de Jong RC, Kester MG, et al. Mutated nucleophosmin 1 as immunotherapy target in acute myeloid leukemia. *J Clin Invest*. 1 févr 2019;129(2):774-85.
106. Graf C, Heidel F, Tenzer S, Radsak MP, Solem FK, Britten CM, et al. A neoepitope generated by an FLT3 internal tandem duplication (FLT3-ITD) is recognized by leukemia-reactive autologous CD8+ T cells. *Blood*. 1 avr 2007;109(7):2985-8.
107. Marijt WAE, Heemskerk MHM, Kloosterboer FM, Goulmy E, Kester MGD, van der Hoorn MAWG, et al. Hematopoiesis-restricted minor histocompatibility

- antigens HA-1- or HA-2-specific T cells can induce complete remissions of relapsed leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 4 mars 2003;100(5):2742-7.
108. Cai J, Lee J, Jankowska-Gan E, Derks R, Pool J, Mutis T, et al. Minor H Antigen HA-1-specific Regulator and Effector CD8+ T Cells, and HA-1 Microchimerism, in Allograft Tolerance. *J Exp Med*. 5 avr 2004;199(7):1017-23.
  109. van Balen P, Jedema I, van Loenen MM, de Boer R, van Egmond HM, Hagedoorn RS, et al. HA-1H T-Cell Receptor Gene Transfer to Redirect Virus-Specific T Cells for Treatment of Hematological Malignancies After Allogeneic Stem Cell Transplantation: A Phase 1 Clinical Study. *Front Immunol*. 2020;11:1804.
  110. Kolb HJ, Mittermüller J, Clemm C, Holler E, Ledderose G, Brehm G, et al. Donor leukocyte transfusions for treatment of recurrent chronic myelogenous leukemia in marrow transplant patients. *Blood*. 15 déc 1990;76(12):2462-5.
  111. Collins RH, Shpilberg O, Drobyski WR, Porter DL, Giralto S, Champlin R, et al. Donor leukocyte infusions in 140 patients with relapsed malignancy after allogeneic bone marrow transplantation. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. févr 1997;15(2):433-44.
  112. Orti G, Barba P, Fox L, Salamero O, Bosch F, Valcarcel D. Donor lymphocyte infusions in AML and MDS: Enhancing the graft-versus-leukemia effect. *Exp Hematol*. avr 2017;48:1-11.
  113. Kong Y, Zhang J, Claxton DF, Ehmann WC, Rybka WB, Zhu L, et al. PD-1(hi)TIM-3(+) T cells associate with and predict leukemia relapse in AML patients post allogeneic stem cell transplantation. *Blood Cancer J*. 31 juill 2015;5(7):e330.
  114. Liu L, Chang YJ, Xu LP, Zhang XH, Wang Y, Liu KY, et al. Reversal of T Cell Exhaustion by the First Donor Lymphocyte Infusion Is Associated with the Persistently Effective Antileukemic Responses in Patients with Relapsed AML after Allo-HSCT. *Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant*. juill 2018;24(7):1350-9.
  115. Dholaria B, Savani BN, Labopin M, Luznik L, Ruggeri A, Mielke S, et al. Clinical applications of donor lymphocyte infusion from an HLA-haploidentical donor: consensus recommendations from the Acute Leukemia Working Party of the EBMT. *Haematologica*. janv 2020;105(1):47.
  116. Ho VT, Kim HT, Kao G, Cutler C, Levine J, Rosenblatt J, et al. Sequential infusion of donor-derived dendritic cells with donor lymphocyte infusion for relapsed hematologic cancers after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Am J Hematol*. déc 2014;89(12):1092-6.
  117. Rautenberg C, Nachtkamp K, Dienst A, Schmidt PV, Heyn C, Kondakci M, et al. Sorafenib and azacitidine as salvage therapy for relapse of FLT3-ITD mutated AML after allo-SCT. *Eur J Haematol*. avr 2017;98(4):348-54.
  118. Maffini E, Ursi M, Barbato F, Dicaldo M, Roberto M, Campanini E, et al. The prevention of disease relapse after allogeneic hematopoietic cell transplantation



- in acute myeloid leukemia. *Front Oncol.* 2022;12:1066285.
119. Catros V. Les CAR-T cells, des cellules tueuses spécifiques d'antigènes tumoraux - De nouvelles générations pour le traitement des tumeurs solides. *médecine/sciences.* 1 avr 2019;35(4):316-26.
  120. Brentjens RJ, Davila ML, Riviere I, Park J, Wang X, Cowell LG, et al. CD19-targeted T cells rapidly induce molecular remissions in adults with chemotherapy-refractory acute lymphoblastic leukemia. *Sci Transl Med.* 20 mars 2013;5(177):177ra38.
  121. Davila ML, Riviere I, Wang X, Bartido S, Park J, Curran K, et al. Efficacy and toxicity management of 19-28z CAR T cell therapy in B cell acute lymphoblastic leukemia. *Sci Transl Med.* 19 févr 2014;6(224):224ra25.
  122. Porter DL, Levine BL, Kalos M, Bagg A, June CH. Chimeric antigen receptor-modified T cells in chronic lymphoid leukemia. *N Engl J Med.* 25 août 2011;365(8):725-33.
  123. Orlando EJ, Han X, Tribouley C, Wood PA, Leary RJ, Riester M, et al. Genetic mechanisms of target antigen loss in CAR19 therapy of acute lymphoblastic leukemia. *Nat Med.* oct 2018;24(10):1504-6.
  124. Mardiana S, Gill S. CAR T Cells for Acute Myeloid Leukemia: State of the Art and Future Directions. *Front Oncol.* 6 mai 2020;10:697.
  125. Budde L, Song JY, Kim Y, Blanchard S, Wagner J, Stein AS, et al. Remissions of Acute Myeloid Leukemia and Blastic Plasmacytoid Dendritic Cell Neoplasm Following Treatment with CD123-Specific CAR T Cells: A First-in-Human Clinical Trial. *Blood.* 7 déc 2017;130(Suppl\_1):811-811.
  126. Leick MB, Silva H, Scarfò I, Larson R, Choi BD, Bouffard AA, et al. Non-cleavable hinge enhances avidity and expansion of CAR-T cells for acute myeloid leukemia. *Cancer Cell.* 9 mai 2022;40(5):494-508.e5.
  127. Leung W. Infusions of allogeneic natural killer cells as cancer therapy. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 1 juill 2014;20(13):3390-400.
  128. Ruggeri L, Capanni M, Urbani E, Perruccio K, Shlomchik WD, Tosti A, et al. Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants. *Science.* 15 mars 2002;295(5562):2097-100.
  129. Myers JA, Miller JS. Exploring the NK cell platform for cancer immunotherapy. *Nat Rev Clin Oncol.* févr 2021;18(2):85-100.
  130. Gauthier L, Virone-Oddos A, Beninga J, Rossi B, Nicolazzi C, Amara C, et al. Control of acute myeloid leukemia by a trifunctional NKp46-CD16a-NK cell engager targeting CD123. *Nat Biotechnol.* 12 janv 2023;1-11.
  131. Huehls AM, Coupet TA, Sentman CL. Bispecific T-cell engagers for cancer immunotherapy. *Immunol Cell Biol.* mars 2015;93(3):290-6.
  132. Dreier T, Lorenczewski G, Brandl C, Hoffmann P, Syring U, Hanakam F, et al. Extremely potent, rapid and costimulation-independent cytotoxic T-cell response

- against lymphoma cells catalyzed by a single-chain bispecific antibody. *Int J Cancer*. 20 août 2002;100(6):690-7.
133. Offner S, Hofmeister R, Romaniuk A, Kufer P, Baeuerle PA. Induction of regular cytolytic T cell synapses by bispecific single-chain antibody constructs on MHC class I-negative tumor cells. *Mol Immunol*. févr 2006;43(6):763-71.
  134. Dutour A, Marin V, Pizzitola I, Valsesia-Wittmann S, Lee D, Yvon E, et al. In Vitro and In Vivo Antitumor Effect of Anti-CD33 Chimeric Receptor-Expressing EBV-CTL against CD33 Acute Myeloid Leukemia. *Adv Hematol*. 2012;2012:683065.
  135. Arndt C, von Bonin M, Cartellieri M, Feldmann A, Koristka S, Michalk I, et al. Redirection of T cells with a first fully humanized bispecific CD33-CD3 antibody efficiently eliminates AML blasts without harming hematopoietic stem cells. *Leukemia*. avr 2013;27(4):964-7.
  136. Ravandi F, Stein AS, Kantarjian HM, Walter RB, Paschka P, Jongen-Lavrencic M, et al. A Phase 1 First-in-Human Study of AMG 330, an Anti-CD33 Bispecific T-Cell Engager (BiTE®) Antibody Construct, in Relapsed/Refractory Acute Myeloid Leukemia (R/R AML). *Blood*. 29 nov 2018;132:25.
  137. Lee DW, Gardner R, Porter DL, Louis CU, Ahmed N, Jensen M, et al. Current concepts in the diagnosis and management of cytokine release syndrome. *Blood*. 10 juill 2014;124(2):188-95.
  138. Brauchle B, Goldstein RL, Karbowski CM, Henn A, Li CM, Bücklein VL, et al. Characterization of a Novel FLT3 BiTE Molecule for the Treatment of Acute Myeloid Leukemia. *Mol Cancer Ther*. 2 sept 2020;19(9):1875-88.
  139. Mani R, Goswami S, Gopalakrishnan B, Ramaswamy R, Wasmuth R, Tran M, et al. The interleukin-3 receptor CD123 targeted SL-401 mediates potent cytotoxic activity against CD34+CD123+ cells from acute myeloid leukemia/myelodysplastic syndrome patients and healthy donors. *Haematologica*. août 2018;103(8):1288-97.
  140. van den Ancker W, van Luijn MM, Westers TM, Bontkes HJ, Ruben JM, de Gruijl TD, et al. Recent advances in antigen-loaded dendritic cell-based strategies for treatment of minimal residual disease in acute myeloid leukemia. *Immunotherapy*. janv 2010;2(1):69-83.
  141. Li L, Giannopoulos K, Reinhardt P, Tabarkiewicz J, Schmitt A, Greiner J, et al. Immunotherapy for patients with acute myeloid leukemia using autologous dendritic cells generated from leukemic blasts. *Int J Oncol*. avr 2006;28(4):855-61.
  142. Roddie H, Klammer M, Thomas C, Thomson R, Atkinson A, Sproul A, et al. Phase I/II study of vaccination with dendritic-like leukaemia cells for the immunotherapy of acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol*. avr 2006;133(2):152-7.
  143. Curti A, Trabanelli S, Onofri C, Aluigi M, Salvestrini V, Ocadlikova D, et al. Indoleamine 2,3-dioxygenase-expressing leukemic dendritic cells impair a leukemia-specific immune response by inducing potent T regulatory cells. *Haematologica*. déc 2010;95(12):2022-30.

144. Daver N, Garcia-Manero G, Basu S, Boddu PC, Alfayez M, Cortes JE, et al. Efficacy, Safety, and Biomarkers of Response to Azacitidine and Nivolumab in Relapsed/Refractory Acute Myeloid Leukemia: A Nonrandomized, Open-Label, Phase II Study. *Cancer Discov.* mars 2019;9(3):370-83.
145. Apetoh L, Végran F, Ladoire S, Ghiringhelli F. Restoration of antitumor immunity through selective inhibition of myeloid derived suppressor cells by anticancer therapies. *Curr Mol Med.* juill 2011;11(5):365-72.
146. Vincent J, Mignot G, Chalmin F, Ladoire S, Bruchard M, Chevriaux A, et al. 5-Fluorouracil selectively kills tumor-associated myeloid-derived suppressor cells resulting in enhanced T cell-dependent antitumor immunity. *Cancer Res.* 15 avr 2010;70(8):3052-61.
147. Obeid M, Tesniere A, Ghiringhelli F, Fimia GM, Apetoh L, Perfettini JL, et al. Calreticulin exposure dictates the immunogenicity of cancer cell death. *Nat Med.* janv 2007;13(1):54-61.
148. Zitvogel L, Apetoh L, Ghiringhelli F, Kroemer G. Immunological aspects of cancer chemotherapy. *Nat Rev Immunol.* janv 2008;8(1):59-73.
149. Koyama M, Hill GR. Mouse Models of Antigen Presentation in Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Front Immunol.* 14 sept 2021;12:715893.
150. Toffalori C, Zito L, Gambacorta V, Riba M, Oliveira G, Bucci G, et al. Immune signature drives leukemia escape and relapse after hematopoietic cell transplantation. *Nat Med.* avr 2019;25(4):603-11.
151. Acharya S, Kala PS. Role of CD71 in acute leukemia- An immunophenotypic marker for erythroid lineage or proliferation? *Indian J Pathol Microbiol.* 2019;62(3):418-22.
152. Liu Q, Wang M, Hu Y, Xing H, Chen X, Zhang Y, et al. The Usefulness of CD71 Expression by Flow Cytometry in the Diagnosis of Acute Leukemia. *Blood.* 16 nov 2012;120(21):2533.
153. Wu B, Shi N, Sun L, Liu L. Clinical value of high expression level of CD71 in acute myeloid leukemia. *Neoplasma.* 2016;63(5):809-15.
154. Wang F, Lv H, Zhao B, Zhou L, Wang S, Luo J, et al. Iron and leukemia: new insights for future treatments. *J Exp Clin Cancer Res.* 13 sept 2019;38(1):406.
155. Deynoux M, Sunter N, Hérault O, Mazurier F. Hypoxia and Hypoxia-Inducible Factors in Leukemias. *Front Oncol* [Internet]. 2016 [cité 10 mars 2023];6. Disponible sur: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fonc.2016.00041>
156. Vukovic M, Guitart AV, Sepulveda C, Villacreces A, O'Duibhir E, Panagopoulou TI, et al. Hif-1 $\alpha$  and Hif-2 $\alpha$  synergize to suppress AML development but are dispensable for disease maintenance. *J Exp Med.* 14 déc 2015;212(13):2223-34.
157. Fukuda Y, Wang Y, Lian S, Lynch J, Nagai S, Fanshawe B, et al. Upregulated heme biosynthesis, an exploitable vulnerability in MYCN-driven leukemogenesis. *JCI Insight.* 2(15):e92409.

158. Lin KH, Xie A, Rutter JC, Ahn YR, Lloyd-Cowden JM, Nichols AG, et al. Systematic Dissection of the Metabolic-Apoptotic Interface in AML Reveals Heme Biosynthesis to Be a Regulator of Drug Sensitivity. *Cell Metab.* 7 mai 2019;29(5):1217-1231.e7.
159. Vadakekolathu J, Minden MD, Hood T, Church SE, Reeder S, Altmann H, et al. Immune landscapes predict chemotherapy resistance and immunotherapy response in acute myeloid leukemia. *Sci Transl Med.* 3 juin 2020;12(546):eaaz0463.