

THESE DE DOCTORAT

NANTES UNIVERSITE

ECOLE DOCTORALE N° 605

Biologie-Santé

Spécialité : « *Biologie cellulaire et biologie du développement* »

Par

Audrey GRAIN

Recherche de cibles antigéniques d'intérêt dans les leucémies aiguës lymphoblastiques B de l'enfant

Thèse présentée et soutenue à Nantes, le 5 février 2025

Unité de recherche : UMR S CNRS 6075 UMR1307 Centre de Recherche en cancérologie et Immunologie
Intégrée Nantes – Angers CRCI2NA

Rapporteurs avant soutenance :

Virginie Gandemer
Christophe Ferrand

PU-PH Hématologie pédiatrique CHU de Rennes
Directeur de Recherche EFS Besançon UMR1098

Composition du Jury :

Président : (à préciser après la soutenance)

Examineurs : André Baruchel
Dir. de thèse : Emmanuel Scotet
Co-dir. de thèse : Béatrice Clémenceau
Co-en de thèse : Marion Eveillard

PU-PH hématologie pédiatrique – Hôpital Robert Debré APHP
Directeur de Recherche – UMR1307 – CRCI2NA
Ingénieur hospitalier principal – UMR1307 – CRCI2NA
PU-PH Hématologie biologique – CHU de Nantes

Invité(s)

Christèle Gras-Leguen

PU-PH - Urgence pédiatrique CHU de Nantes

Table des matières

REMERCIEMENTS :	4
LISTE DES ABBREVIATIONS	5
LISTE DES FIGURES :	6
INTRODUCTION	8
1. La leucémie aigüe lymphoblastique	9
1.1. Physiopathologie et épidémiologie :	9
1.2. Predispositions :	9
1.3. Génétique des LAL de l'enfant et leucémogénèse	10
1.3.1. Génétique des LAL-B :	10
1.3.1.1. Anomalie de la ploïdie :	10
1.3.1.2. Anomalies de structures :	11
1.3.1.3. Autres anomalies et sous-types :	12
1.3.2. Génétique des LAL-T :	13
1.3.3. Génétique des rechutes :	13
1.4. Phénotype des LAL de l'enfant et cibles thérapeutiques actuelles :	13
1.4.1. Phénotype des LAL pédiatriques :	13
1.4.2. Antigènes membranaires et cibles thérapeutiques actuelles dans les LAL-B	15
1.5. Facteurs pronostiques :	16
1.6. Traitements actuels :	18
1.6.1. Chimiothérapie :	18
1.6.1.1. L'induction :	19
1.6.1.2. La consolidation :	20
1.6.1.3. L'intensification retardée :	20
1.6.1.4. Traitement d'entretien :	21
1.6.1.5. Traitement du système nerveux central (SNC) :	21
1.6.2. Traitement et pronostic des rechutes :	22
1.6.3. Place des principales des immunothérapies dans les LAL-B:	23
1.6.4. Les anticorps :	24
1.6.4.1. Rituximab (anti-CD20)	24
1.6.4.2. Blinatumomab (anti-CD3-anti-CD19)	25
1.6.4.3. L'Inotuzumab (anti-CD22)	27
1.6.5. Les cellules CAR-T :	30
1.6.5.1. Définition et développement pré-clinique	30
1.6.5.2. Développement clinique :	32

1.6.5.3.	Résultats à long terme :	34
1.7.	Questions soulevées et limites actuelles des cellules CAR-T anti-CD19 :	38
1.7.1.	Défaut de persistance des cellules CAR-T :	38
1.7.2.	Persistance des cellules CAR-T anti-CD19 et aplasie B :	39
1.7.3.	Risque de cancers secondaires (lymphomes T) :	42
1.7.4.	Rechutes de LAL-B CD19 négatives :	43
1.7.4.1.	Mécanismes à l'origine des rechutes CD19 ^{négatives}	43
1.7.4.2.	Double ciblage des LAL-B avec des cellules CAR-T	45
1.7.4.3.	Multiciblage avec des Ac bispécifiques ou tri-spécifiques	47
1.7.4.4.	CAR « Universels » ou CAR modulables et récepteurs universels :	49
2.	La cytotoxicité cellulaire dépendante des Ac (ADCC) médiée par le FcγRIIIa	57
2.1.	Acteurs et mécanismes	57
2.2.	Amplification de la réponse ADCC chez les patients traités par Ac monoclonaux	58
2.2.1.	Modification des Ac monoclonaux :	58
2.2.2.	Utilisation des cytokines :	59
2.2.3.	Transfert adoptif de cellules NK:	60
2.2.4.	Développement de cellules T capable d'ADCC :	61
2.3.	Choisir la cible antigénique pour l'ADCC	63
2.3.1.	Impact du choix de l'antigène sur l'ADCC et contraintes géométriques	63
2.3.2.	Screening et intérêt des Ac murins	65
3.	Introduction aux travaux de recherche :	67
TRAVAUX DE RECHERCHE - AXE 1		69
Article 1 : Évaluation de stratégies de ciblage multiple en ADCC dans les LAL-B pédiatriques .		70
Article 2 : Efficacité <i>in vitro</i> de CAR T-cells anti-HER2 en traitement de LAL B		95
Article 3 : Deux stratégies de ciblage d'une rechute CD19 positive de LAL-B survenant après thérapie CAR-T anti-CD19.		110
TRAVAUX DE RECHERCHE - AXE 2		121
Article 4 : Analyse de la réponse vaccinale cellulaire T et humorale chez les patients traités par cellules CAR-T anti-CD19		122
4.	Discussion :	146
4.1.	Résumé des principaux résultats :	146
4.2.	Identification de cibles d'intérêt :	147
4.2.1.	CD24 :	147
4.2.2.	Her2 :	149
4.2.3.	CD156c / ADAM10	152
4.3.	Recherche de combinaisons de cibles efficaces :	154

5. Conclusion :	156
REFERENCES :	157
ANNEXE : Liste des publications réalisées pendant le doctorat	178

REMERCIEMENTS :

LISTE DES ABBREVIATIONS

LAL	Leucémie aigües lymphoblastique
MRD	Maladie résiduelle
LAM	Leucémie aigüe myeloblastique
CMF	Cytométrie de Flux
RT-PCR	Reverse-transcriptase Polymerase Chain reaction
NGS	Séquençage nouvelle génération
RC	Rémission cytologique
TCR	Récepteur des cellules T
Ig	Immunoglobuline
OS	Survie Globale (Overall Survival)
Peg Aspa	Asparaginase pegylée
EFS	Survie sans évènement (Event free survival)
TRM	Mortalité liée au traitement (Treatment related mortality)
6-TGN	6-Thioguanine
SNC	Système nerveux central
CSH	Cellules souches hématopoïétiques
Ac	Anticorps
LAL R/R	LAL R/R
ADCC	Cytotoxicité dépendante des anticorps
CDC	Cytotoxicité médiée par le complément
BiTE	Ac bispécifiques engageant les LT (Bispecific antibodies T-cells engagers)
LT	Lymphocytes T
FDA	Food and drug agency
MHC	Complexe majeur d'histocompatibilité
CAR	Récepteur chimérique à l'antigène
SRC	Syndrome de relargage cytokinique
ICAN	Évènement neurologique associé aux cellules immunitaires
EMA	Agence Européenne du médicament
BCMA	Antigène de Maturation des Cellules B
BiKE	Ac bispécifiques engageant les cellules NK (Bispecific killer cell engagers)
ADCP	Phagocytose à médiation cellulaire dépendante des Ac
Fc	Fragment cristallisable des immunoglobulines
NK	Natural killers
ITAM	Récepteur immuns dépendant des tyrosines (immunoreceptor tyrosin-based activation)

LISTE DES FIGURES :

Liste des tableaux :

Tableau 1 : Expression membranaires de certains sous-types de LAL-B

Tableau 2 : Tableau 2 : Facteurs pronostiques au diagnostic de LAL

Tableau 3 : Expérience clinique avec les technologies CAR « Universels »

Liste des figures :

Figure 1 : Probabilité de survie globale à 5 ans des patients traités selon les cohortes du St Jude (de 1962 à 2017).

Figure 2 : Survie sans évènement à 2 ans, selon le nombre de ligne de traitement de rattrapage (nombre de rechutes) reçues en traitement d'une LAL-B évaluée dans une étude rétrospective ayant inclus 325 patients de moins de 21 ans

Figure 3 : Immunothérapies actuellement disponibles en clinique ou en cours d'investigation dans le cadre du traitement des LAL

Figure 4 : Structure de l'Ac bi-spécifique Blinatumomab

Figure 5 : Composition et structure de l'Inotuzumab.

Figure 6 : Constructions des récepteurs chimériques à l'antigène (CAR)

Figure 7 : Rechutes de LAL-B après traitement par cellules CAR-T anti-CD19.

Figure 8: Structure du CD19 sauvage (wildtype), et structures prédites des différents isoformes issus du gène CD19 muté

Figure 9 : Les différentes stratégies de double ciblage utilisant des cellules T équipées de CAR.

Figure 10 : Ac bispécifiques développés dans les tumeurs solides et les hémopathies malignes

Figure 11 : Représentation de 8 molécules adaptatrices capables de reconnaître un ou deux antigènes à la surface de la cellule tumorale

Figure 12 : Trois stratégies CAR « Universel »

Figure 13 : les 3 acteurs de l'ADCC médiée via le CD16a

Figure 14 : Contraintes géométriques relatives à la fixation de l'Ac sur l'antigène impactant l'activité ADCC induite

Figure 15 : Représentation schématique de la molécule chimérique comprenant le segment extracellulaire FcγRIIIa murin et les segments transmembranaires et intracellulaire du FcεRIγ humain

INTRODUCTION

1. La leucémie aigüe lymphoblastique

1.1. Physiopathologie et épidémiologie :

La leucémie Aigüe Lymphoblastique (LAL) est une prolifération maligne de cellules lymphoïdes, dont la différenciation est bloquée à un stade précoce, et qui envahit la moelle osseuse mais également les organes lymphoïdes (foie, rate, ganglions lymphatiques) et d'autre sites extra-médullaire (méninges, ovaires/testicules, ...). Cette prolifération lymphoïde entraîne un syndrome tumoral clinique qui peut comprendre des adénopathies disséminées, un élargissement du médiastin, une hépatosplénomégalie, une atteinte des amygdales, une infiltration testiculaire. L'infiltration neuroméningée peut se caractériser par une atteinte des nerfs crâniens, une anesthésie de la houppe du menton, un syndrome méningé, une hypertension intracrânienne. L'envahissement médullaire se manifeste cliniquement par la triade associant un syndrome anémique (dyspnée, pâleur, asthénie, souffle systolique), un syndrome hémorragique cutané ou muqueux, une neutropénie prolongée (aphtose, fièvre trainante, infection sévère) (1).

L'incidence de la LAL est estimée à environ 6000 nouveaux cas /an aux Etats-Unis et en Europe. L'incidence des nouveaux cas était estimée à 810 en France en 2012, et 6660 aux Etats-Unis en 2022. Le sexe ratio homme/femme est d'environ 1.6 (2–4). Il s'agit d'une maladie majoritairement pédiatrique, puisque le pic d'incidence est entre 1 et 4 ans. L'incidence chute ensuite pour atteindre son seuil le plus bas entre 25 et 45 ans, l'augmentation de l'incidence est ensuite relativement faible. Ainsi près de 60% des cas de LAL sont diagnostiqués chez des patients de moins de 20 ans (5).

1.2. Prédispositions :

Certains syndromes génétiques constitutionnels (Syndrome de Down, Syndrome Ataxie-Télangiectasies), ou certains syndromes associés à des cancers familiaux (syndrome de Li Fraumeni, ou anomalie des systèmes de réparation de l'ADN (mismatch repair deficiency MMRD)) sont associés à un risque accru de survenue de LAL. Par ailleurs, les analyses génomiques étendues ont permis d'identifié des variants non silencieux de gènes, associés à un risque accru de survenue d'une LAL (cas sporadique), comme des variants de TP53, ETV6, PAX5 ou IKZF1 (4,6–9). Des variants non

codants ont également été identifiés comme étant associés à une incidence plus élevée de risque de LAL (*ARID5B, BAK1, CDKN2A/CDKN2B, BMI1-PIP4K2A, CEBPE, ELK3, ERG, GATA3, IGF2BP1, IKZF1, IKZF3, USP7, and LHPP*)(9–11). Enfin, plusieurs explorations ont également permis d'identifier que de rares cas de LAL de l'enfant débutent *in utero*. En effet, les analyses génomiques conduites chez des enfants jumeaux homozygotes, tous deux atteints de LAL, ont pu identifier des anomalies génétiques initiatrices communes (translocation ETV6-RUNX1), puis des anomalies génétiques secondaires différentes. L'hypothèse de l'initiation d'une leucémogénèse *in utero* est importante dans les LAL avec un réarrangement KMT2A ou avec une translocation ETV6-RUNX1 (9,12) .

Enfin, des facteurs environnementaux comme l'expositions aux radiations ou à certains pesticides sont également associés à un risque accru de LAL. Cependant, tant les prédispositions génétiques que les facteurs environnementaux, ne sont incriminés que dans une très faible proportion des cas de LAL (4).

1.3. Génétique des LAL de l'enfant et leucémogénèse :

1.3.1. Génétique des LAL-B :

La leucémogénèse des LAL-B de l'enfant est induite par la présence de trois types d'anomalies génétiques initiatrices : Les anomalies de la ploïdie, les anomalies de structures avec réarrangements chromosomiques aboutissant à la présence de transcrits de fusion, ou à la dérégulation de certains oncogènes, et les mutations ponctuelles. Chacune de ces anomalies étant associée à d'autres anomalies spécifiques.

1.3.1.1. Anomalie de la ploïdie :

L'hyperdiploïdie (plus de 50 chromosomes) est identifiée dans plus de 30% des LAL-B de l'enfant, et est fréquemment associée à des mutations de la voie RAS ou des anomalies dans les gènes codant pour des activateurs de la transcription (CREBBP). Elle est associée à un pronostic favorable (13), même si au sein des LAL-B avec hyperdiploïdie certains sous-types ont pu être associé à un pronostic un peu moins favorable, rejoignant les maladies de risque intermédiaire (14).

L'hypodiploïdie (31-39 chromosomes) est identifiée dans 1% des LAL-B de l'enfant, et est souvent associée à des délétions d'IKZF1 ou de TP53. Un caryotype near-haploïde (24-30 chromosome) est retrouvé dans 2% des LAL-B pédiatriques, et est fréquemment associé à des anomalies de la voie Ras et des délétions d'IKZF3. L'hypodiploïdie et la near-haploïdie sont toutes deux associées à un pronostic défavorable (15).

Enfin, les amplifications intrachromosomiques du 21 (iAmp21) sont plus fréquemment identifiées dans les LAL-B de l'adolescent et sont également associées à un pronostic péjoratif (16).

1.3.1.2. Anomalies de structures :

La translocation t(12 ;21)(p13 ;q22) aboutissant au transcrit ETV6-RUNX1 est identifiée dans près de 25% des cas de LAL-B chez l'enfant et est associée à un pronostic favorable (17).

La translocation t(1 ;19)(q23 ;p13) et le transcrit TCF3-PBX1 est plus fréquemment identifiée chez les patients d'origine Africaine ou Américaine, et était associée à une atteinte méningée plus fréquente et un pronostic défavorable avant l'intensification thérapeutique actuelle (18). Les réarrangement de KMT2A (en 11q23) avec différents partenaires, dont le principal est AF1 (t(4 ;11)(q21 ;q23)), est plus fréquemment identifiée dans les LAL-B du nourrisson (70%) que dans celle de l'enfant (5 à 6% des cas) et est elle aussi associée à un pronostic péjoratif (19).

Enfin, la translocation (9 ;22)(q22 ;p13) aboutissant à la fusion BCR-ABL1 caractérise les LAL-B à chromosomes Philadelphie, et est identifiée dans 2 à 5 % des LAL-B pédiatriques (20). La fusion BCR-ABL1 est associée à d'autres altérations de facteurs de transcription lymphoïdes B parmi lesquels IKZF1, CDKN2A/2B, PAX5, PAR1 et des réarrangements de CRLF2. Ces anomalies sont détectées la plupart du temps par une technique de PCR multiplexe (*Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification* ou MLPA), et sont associées à un pronostic péjoratif (21). Cependant, la chimiorésistance des LAL-B Phi+, a été contrebalancée, au cours des 20 dernières années, par l'adjonction d'inhibiteurs de tyrosine kinase au traitement par chimiothérapie de première ligne (22,23).

Les LAL-B dites Phi-like ou BCR-ABL1 like, ont des profils transcriptionnels similaires (réarrangement de CRLF2, réarrangement des gènes de la classe ABL, activation voie JAK-STAT) mais sans présenter la translocation initiale BCR-ABL1. Les LAL-B Phi-like sont associées à une chimiorésistance et un pronostic défavorable (24,25). Les patients atteints de LAL-B BCR-ABL1 like associées à des remaniements des gènes ABL bénéficient de l'adjonction d'inhibiteurs de tyrosine kinase (26). Des études de phase II actuellement en cours proposent par ailleurs, l'adjonction d'inhibiteurs de mTOR chez les patients présentant des anomalies de la voie JAK/STAT (9).

1.3.1.3. Autres anomalies et sous-types :

D'autres anomalies génétiques cryptiques ont pu être identifiées par les techniques plus récentes de séquençage du génome, définissant de nouveaux sous-types de LAL-B. Ainsi les ETV6-RUNX1 like caractérisée par des anomalies des gènes de la famille des facteurs de transcription ETS (ETV6, ERG ou FLI1), ou de IKZF1 ou TCF3 sont identifiées dans environ 3% des LAL-B pédiatriques (27). La translocation de DUX4 aboutissant à une dérégulation de l'expression du facteur de transcription ERG est également associée à un pronostic favorable dans la majorité des cas (28). Les réarrangements de NUTM1 sont identifiés dans 4% des LAL-B pédiatriques, et associée à une expression aberrante de NUTM1. Ces LAL sont associées à un excellent pronostic (29).

Les réarrangements de ZNF384 sont identifiés dans 6% des LAL-B pédiatriques, et plus fréquemment dans les leucémies de phénotype mixte (B/Myeloïde). Les réarrangements de ZNF384 sont souvent associés à une hyperexpression de FLT3. Des modifications de lignée ou une perte d'expression du CD19 sont décrites dans les LAL-B avec un réarrangement de ZNF384 (30,31).

Quatre pourcents des LAL-B pédiatriques sont associées à un réarrangement MEF2D. Ces LAL surviennent plutôt chez les adolescents et sont associées à un pronostic péjoratif (32). Les altérations du gène codant pour le facteur de transcription lymphoïde PAX5 sont identifiées dans 10% des LAL-B pédiatrique, et la fusion PAX5 P80R dans 2% des cas. Enfin, une mutation hétérozygote de IKZF1 (N159Y) entraînant une délocalisation du facteur de transcription et favorisant l'expression d'oncogènes (YAP1, voie JAK-STAT) est identifiée dans 1% des cas (9).

1.3.2. Génétique des LAL-T :

La leucémogénèse des LAL-T implique en majorité la dérégulation de trois voies de signalisation : la synthèse de facteurs de transcription lymphoïdes T, la voie NOTCH1/MYC et les voies régulatrices du cycle cellulaire. Ainsi, les réarrangements des gènes codant pour des facteurs de transcription (TAL1, TAL2, TLX1, TLX, HOXA, LMO1/LMO2, LMO2/LYL1, ou NKX2-1) ont été décrits. Des mutations activatrices de NOTCH1 sont également décrites dans près de 75% des LAL-T. Enfin, la délétion de gènes suppresseurs de tumeurs (ou intervenant dans la régulation du cycle cellulaire) comme CDKN2A/CDKN2B est identifiée dans 80% des cas (9,33).

1.3.3. Génétique des rechutes :

De multiples sous-clones sont présents dès le diagnostic de LAL-B, rendant extrêmement complexe le paysage transcriptionnel. Certaines anomalies initiatrices, comme les transcrits de fusions chimériques sont souvent présents de façon clonale et conservés tout au long de l'évolution de la maladie et notamment à travers les rechutes. Tandis que les altérations d'autres voies de signalisations, résultent d'anomalies additionnelles, souvent à l'échelle sous-clonale, et sont donc souvent acquises lors des rechutes, et de la sélection de clones résistants (34).

1.4. Phénotype des LAL de l'enfant et cibles thérapeutiques actuelles :

1.4.1. Phénotype des LAL pédiatriques :

L'analyse de l'expression membranaire des cellules leucémique par cytométrie de flux (CMF) est un outil essentiel au diagnostic de LAL. Cela permet en effet de déterminer le stade de maturation, et donc la classification de la LAL (35). Cela permet également d'identifier l'expression de phénotypes aberrants associés à la leucémie (Leukemia Associated Immuno Phenotype – LAIP) qui pourront servir au suivi de la maladie résiduelle (MRD), ou encore d'identifier l'expression de cibles thérapeutiques potentielles (36).

L'expression phénotypique des LAL-B en particulier, est complexe et hétérogène. En 2012, le consortium Euroflow a proposé des panels d'Acs couplés à des fluorochromes, permettant une

orientation diagnostic rapide, et également de distinguer une LAL-B ou T d'une leucémie aigüe myeloblastique (LAM) dans un contexte de blastose circulante. Ont ainsi été retenus : CD45, MPO intra-cytoplasmique (cyMPO), CD34, CD19, CD79a cytoplasmique (cyCD79a), CD3 de surface (smCD3) et intracytoplasmique (cyCD3), et CD7. Les cellules blastiques sont en effet identifiées en morphologie dans la population lymphocytaire en taille et granulosité (Side scatter (SSC) / Forward scatter (FSC)). Les cellules blastiques se distinguent ensuite des cellules souches par une expression faible du CD45 (CD45^{low}) et sont CD34 positives (CD34⁺). Le MPO intracytoplasmique est ensuite exclusivement exprimé par les LAM, alors que les LAL-T seront CD3 cytoplasmique⁺ et CD3 de surface ^{-/low}. Enfin, le CD19 est exprimé par la très nette majorité des LAL-B, mais également par certaines LAM. L'orientation vers une LAL-B s'effectue donc en croisant avec l'expression du CD79a intracytoplasmique, présent dans la majorité des LAL-B mais également dans certaines LAM (avec translocation t(8 ;21)) ou certaines LAL-T immatures. Enfin le CD7 est exprimé par la majorité des LAL-T, et par les LAM MPO négatives. Le CD22 n'a pas été inclus dans ce panel d'orientation, car il est également exprimé par d'autres lignées cellulaires (polynucléaires basophiles, mastocytes, et cellules dendritiques) (37).

Certains profils d'expression ont pu être associés avec des anomalies génétiques spécifiques. Ainsi les LAL-B avec réarrangement KMT2A sont souvent CD9⁺, CD34⁺, TdT⁺ et CD10⁻ CD20⁻ CD22^{low} et NG2⁺. Les LAL-B avec t(12 ;21) (TEL-AML1) sont CD19⁺, CD34⁺, TdT⁺, CD10^{+/high}, CD13⁺, CD33⁺, CD22⁺, CD24⁺, CD20⁻ tandis que les LAL-B avec hyperdiploïdies sont CD19⁺, TdT⁺ and CD10^{+/high}, CD22⁺, CD24⁺, CD20⁻, CD33⁻, CD45⁻, CD65⁻, et CD66c⁺ (38). Plus récemment, il a été souligné que les LAL-B à chromosome Philadelphie expriment plus faiblement CD9 et CD81 que les autres LAL-B. De même CD81 et CD58 sont fortement exprimés par les LAL-B avec t(1 ;19) (36). Le **tableau 1** récapitule ces différences phénotypiques.

Tableau 1 : Expression membranaires de certains sous-type de LAL-B (38)

Antigène	LAL-B KMT2A	LAL-B TEL-AML1	LAL-B hyperdiploïdes
CD9	+		
CD10	-	++	++
CD13		+	
CD19		+	+
CD20	-	-	-
CD22	low	+	+
CD24		+	+
CD33		+	-
CD34	+	+	
CD45			-
CD65			-
CD66c			+
TdT	+	+	+
NG2	+		

Les LAL-T ont ainsi une génomique, et une expression phénotypique très différentes des LAL-B. Elles représentent ainsi un sous-type de LAL à part entière. De ce fait, dans un souci d'homogénéité, mes travaux de recherche ont été orientés sur les LAL-B de l'enfant et la suite de ce manuscrit est centrée sur ces leucémies.

1.4.2. Antigènes membranaires et cibles thérapeutiques actuelles dans les LAL-B

Les antigènes membranaires ciblés par les immunothérapies actuellement utilisées dans le cadre du traitement des LAL-B sont le CD19, le CD22 et plus accessoirement le CD20 (voir paragraphe 3.6.8 et suivants).

Le CD19 est une protéine de signalisation membranaire exprimée par l'ensemble des cellules lymphoïdes B dès les premiers stades de maturation, mais son expression est ensuite perdue lors de la différenciation en plasmocytes. Le CD19 agit comme un co-récepteur B et favorise la différenciation de cellules pro-B en cellules pré-B dans le compartiment médullaire mais il favorise également survie des cellules B naïves circulantes, ainsi que la différenciation des cellules B dans les ganglions lymphoïdes (39–41). La très nette majorité des LAL-B expriment le CD19 sans qu'il ne soit identifié de variation d'expression en fonction des sous-type de LAL-B (42).

Le CD22 est une glycoprotéine transmembranaire, membre de la superfamille des immunoglobulines. CD22 semble avoir un rôle dans la régulation de l'activité des cellules lymphoïdes B liée à l'activation du récepteur BCR, et également un rôle dans la prolifération et la survie des cellules lymphoïdes B (43,44). Il est exprimé par la majorité des LAL-B de l'enfant. Cependant, la densité d'expression du CD22 à la surface des cellules blastiques semble plus faible dans les LAL-B associées à un réarrangement KMT2A (42,44).

Le CD20, est une phosphoprotéine transmembranaire, non glycosylée, exprimée par l'ensemble des cellules de la ligne lymphoïde B à l'exception des cellules souches et des plasmocytes circulants. Les molécules de CD20 s'assemblent en tétramères pour former un canal calcique jouant ainsi un rôle dans la régulation du cycle cellulaire et la différenciation des cellules B (45). L'expression du CD20 est retrouvée dans environ 30 à 40% des LAL-B pédiatriques. Le niveau d'expression du CD20 étant plus faible dans les LAL-B communes que dans les LAL-pré-B ou B-matures (42).

1.5. Facteurs pronostiques :

Le pronostic initial de la LAL intègre les données de la présentation clinique (âge et leucocytose), de l'analyse cytologique ou morphologique du frottis sanguin ou médullaire, des données d'immunophénotypage en cytométrie de flux (CMF) (lignée et classification (46)), des caractéristiques cytogénétiques (cytogénétique classique, hybridation *in-situ*, Reverse-transcriptase Polymerase Chain reaction (RT-PCR)), ainsi que des données obtenues par des techniques de séquençage nouvelle génération (NGS). Un pronostic plus sévère est associé aux patients de moins d'un an ou de plus de 10 ans, en cas d'hyperleucocytose (leucocytes circulants > 50G/L), et en cas de phénotype T (47).

Ensuite, le facteur pronostic majeur est la réponse au traitement qui est évaluée par analyse cytologique du frottis médullaire, et surtout l'analyse de la MRD à différentes étapes du traitement, et notamment après l'induction et après la première phase de consolidation (5). La MRD est définie par la présence de cellules blastiques détectables chez des patients en rémission cytologique (RC), soit par CMF soit en biologie moléculaire. L'analyse de la MRD en biologie moléculaire est réalisée par détection de réarrangements des gènes des immunoglobulines (ou du récepteur T (TCR) pour les LAL-T) spécifiques des cellules leucémiques au diagnostic (réarrangement Ig/TCR), ou la

détection de transcrits spécifiques de la LAL (i.e. BCR-ABL) en PCR ou en NGS. La sensibilité de la technique en CMF permet la détection d'une cellule sur 10^3 à 10^4 , celle des techniques de biologie moléculaire permet la détection d'une cellule leucémique sur 10^4 à 10^5 cellules (48). Le risque de rechute de la LAL, associé à un niveau de MRD, diffère selon les caractéristiques cytogénétiques de la LAL au diagnostic. Ainsi, les patients atteints de LAL avec des anomalies cytogénétiques de pronostic favorable vont en général présenter une MRD indétectable très rapidement. A l'inverse, les patients atteints de LAL avec des anomalies de haut-risque présenteront une décroissance plus lente des niveaux de MRD (49). Par ailleurs, le pronostic péjoratif associé à une MRD faiblement positive en fin de consolidation, peut être corrigé par l'intensification de la suite du traitement (9). Le traitement des LAL de l'enfant est donc stratifié selon le risque établi en intégrant les données cliniques au diagnostic, les anomalies cytogénétiques identifiées, et le niveau moléculaire de réponse au traitement (9). Le **Tableau 2** résume les facteurs pronostics des LAL pédiatriques et leur signification.

Tableau 2 : Facteurs pronostics au diagnostic de LAL (9).

Factor	Better	Worse
Patient and clinical characteristics		
Age at diagnosis	1 to <10 years	<1 year or ≥ 10 years
Sex	Female	Male
Race	Caucasian, Asian	African American, Hispanic
Down syndrome	No	Yes
WBC counts at diagnosis	$<50 \times 10^9/L$	$\geq 50 \times 10^9/L$
CNS involvement at diagnosis	CNS 1	CNS 2 and CNS 3, traumatic tap with blasts
Testicular involvement	No	Yes
Immunophenotype	B-ALL	T-ALL
Cytogenetic and genetics	High hyperdiploidy (51-65 chromosomes) <i>ETV6-RUNX1</i> : t(12;21)(p13.2;q22.1) <i>NUMT1</i> rearrangement	Hypodiploidy (<44 chromosomes) <i>KMT2A</i> rearrangement: t(v;11q23.3) <i>BCR-ABL1</i> : t(9;22)(q34.1;q11.2) (Ph+) <i>BCR-ABL1</i> -like (Ph-like) <i>TCF3-HLF</i> : t(17;19)(q22;p13) <i>MEF2D</i> rearrangement Intrachromosomal amplification of chromosome 21 (iAMP21) <i>BCL2</i> or <i>MYC</i> rearrangements
Minimal residual disease	Negative Continuously decreasing and becoming negative	Positive Increasing and/or persistently positive while monitored

WBC: white blood cell; CNS: central nervous system; ALL: acute lymphoblastic leukemia; Ph: Philadelphia chromosome.

1.6. Traitements actuels :

1.6.1. Chimiothérapie :

Le traitement de première ligne des LAL reste à ce jour la chimiothérapie, combinant plusieurs molécules différentes. Le traitement par chimiothérapie comprend globalement 4 phases : l'induction, la consolidation, l'intensification retardée, et un traitement d'entretien prolongé sur environ 18 mois. Au cours de l'ensemble du traitement, l'administration de chimiothérapie intrathécale est un élément majeur de la prévention des rechutes neuroméningées. La majorité des molécules de chimiothérapies utilisées ont été développées avant les années 1970s, mais leur combinaison, et leur dosage ont été ajustés au cours des 50 dernières années selon la tolérance à court et long terme, et les réponses moléculaires obtenues. Au cours des 30 dernières années, l'amélioration de ce traitement intensif a permis d'améliorer le pronostic des LAL de l'enfant, et aujourd'hui la probabilité de survie globale (OS) à 5 ans est de plus de 90%. La **Figure 1** représente la probabilité d'OS à 5 ans des patients atteints de LAL pédiatriques, selon le protocole thérapeutique qu'ils ont reçu (protocoles thérapeutiques successifs du St Jude de 1962 à 2017). Plus récemment, l'utilisation précoce de thérapies ciblées, d'immunothérapies mais également une désescalade thérapeutique prudente pour les pathologies de pronostic très favorable, visent à réduire l'incidence des séquelles à long terme (atteintes musculosquelettiques, syndrome métaboliques, atteintes neurologiques, et impact sur la fertilité) (9).

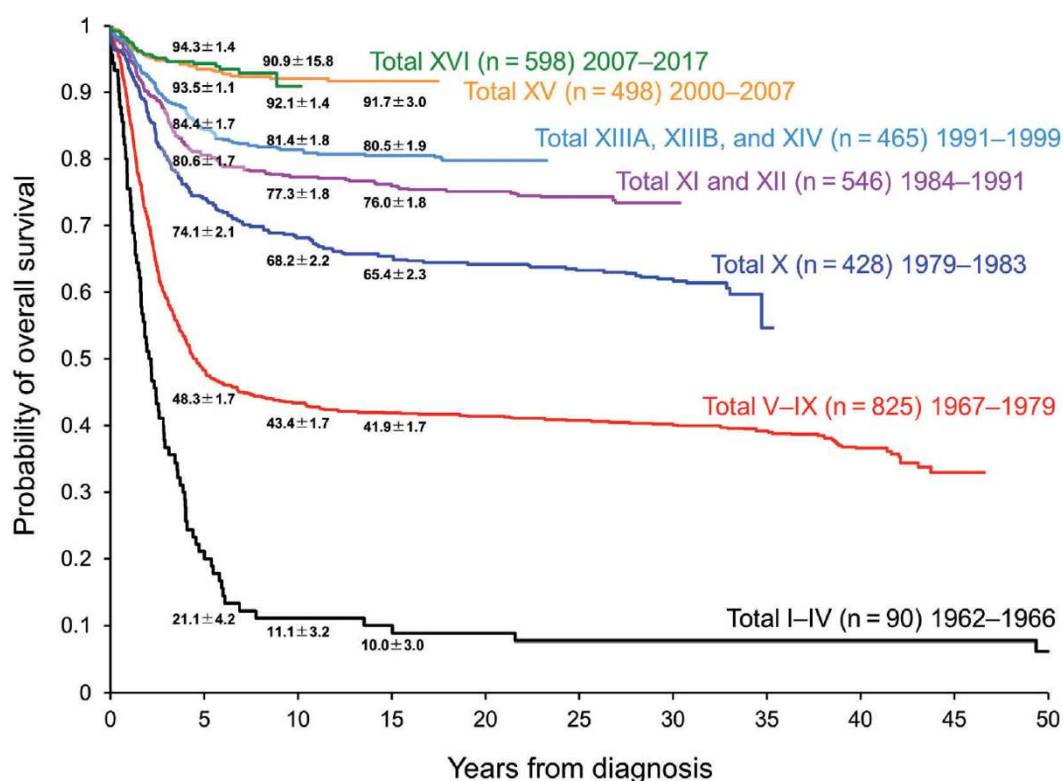


Figure 1 : Probabilité de survie globale à 5 ans des patients traités selon les cohortes du St Jude (de 1962 à 2017).

1.6.1.1. L'induction :

L'induction comprend 3 ou 4 drogues : les corticostéroïdes, la vincristine, l'asparaginase plus ou moins associés aux anthracyclines, pour une durée de 4 à 5 semaines. L'induction permet d'obtenir une rémission cytologique chez plus de 95% des patients. Le traitement par cortico-stéroïdes repose sur la Prednisone ou la Dexaméthasone. L'utilisation de la Dexaméthasone permet d'améliorer la survie sans rechute, en comparaison à la Prednisone, mais sans augmenter la survie globale, notamment parce que le risque de toxicité est accru (50). Le protocole européen actuellement ouvert, propose l'utilisation de la Dexaméthasone en cours d'induction (NCT04307576). Au cours des 10 dernières années, l'Asparaginase Pegylée (Peg Aspa) a progressivement remplacé l'Asparaginase native à libération immédiate. En effet, l'utilisation de la forme pegylée est associée à une réduction de l'incidence des réactions allergiques, et une meilleure tolérance. La forme pegylée est généralement administrée à la posologie de 1000 à 2500 UI/m²/dose (51). C'est la forme d'Asparaginase utilisée dans le protocole Européen actuel (N°EUDRACT 2018-001795-38).

1.6.1.2. La consolidation :

La phase de consolidation comprend une première phase (Consolidation 1) basée sur l'administration de Cyclophosphamide, Cytarabine et Mercaptopurine, puis une 2e phase comprenant du Methotrexate à haute dose, administré selon différents schémas (Doses intermédiaires escaladées sans antidote (Capizzi), ou hautes doses (2 à 5g/m²) avec rescue par acide folinique). L'utilisation du Méthotrexate à haute dose est primordiale dans la prévention, et le traitement, des atteintes neuroméningées ou testiculaires (52).

A l'issue de la consolidation 1, l'évaluation de la réponse moléculaire est un point d'évaluation important, et fortement corrélé au pronostic. En effet, dans les LAL-B, la survie globale est de 92,3% en cas de MRD négative en fin d'induction et en fin de consolidation 1, de 77,6% en cas de MRD détectable sur un des deux points mais inférieure à 10⁻³, et de 50,1% en cas de MRD > 10⁻³ en fin de consolidation 1 (53).

1.6.1.3. L'intensification retardée :

L'intensification retardée a été introduite au traitement des LAL dans les années 1970. Cette dernière phase du traitement intensif comprend les mêmes molécules que les phases d'induction et de consolidation 1 (54). Cependant, de nombreuses complications à court et long terme (infections, toxicité cardiaque) étaient attribuées à cette phase, et entre autres à l'association des anthracyclines et de la Dexaméthasone (55). Plusieurs consortiums, dont le groupe NOPHO, ont donc proposé de réduire l'intensité thérapeutique de cette intensification retardée pour les patients porteurs de LAL-B de risque standard (56,57). Le groupe britannique (UKALL) proposait ainsi de randomiser l'administration ou non d'une seconde intensification retardée chez les patients présentant une MRD indétectable en post-induction ou en post-consolidation. Aucune différence en termes de survie sans rechute (EFS) ou de mortalité liée au traitement (TRM) n'a été observée (58). Ces résultats ont été confortés par d'autres groupes coopératifs (59,60). Cependant, l'étude prospective du groupe BFM qui proposait également une désescalade chez les patients présentant une MRD indétectable en fin d'induction et en fin de consolidation a montré un excès de rechute et donc une moindre probabilité d'EFS dans le bras de traitement moins intensif, sans pour autant que cela n'entraîne de différence de probabilité d'OS (54). Il faut cependant noter qu'une plus grande proportion de patients était considérée en MRD indétectable dans l'étude BFM attestant sans doute d'une

sensibilité moindre de la technique de détection. Enfin, l'excès de rechute n'était pas observé dans le groupe des patients ayant reçu de la Dexaméthasone en cours d'induction (54). Le protocole européen actuel (Alltogether, N°EUDRACT 2018-001795-38) propose de randomiser l'omission des anthracyclines durant l'intensification retardée chez les patients présentant une MRD indétectable en fin d'induction (risque standard), ou pour les patients ayant une MRD très faible en fin d'induction et en fin de consolidation (patient de risque intermédiaire). Dans ce dernier groupe, les patients recevant une intensification retardée sans anthracyclines recevront des réinductions comprenant de la Vincristine et de la Dexaméthasone en cours de traitement d'entretien, alors que l'autre groupe ne recevra pas de ré-induction afin de limiter l'exposition aux stéroïdes et donc le risque de toxicité cumulée (neurologique, osseuse, métabolique) (UKALL2011)(61).

1.6.1.4. Traitement d'entretien :

L'administration prolongée, pendant plus d'un an du traitement d'entretien est primordiale dans la prévention des rechutes (62). Ce traitement d'entretien comprend de la 6-Mercaptopurine quotidienne, du Methotrexate administré de façon hebdomadaire, associés ou non à des ré-inductions comprenant de la Vincristine et des corticostéroïdes. Le groupe nordiste du NOPHO a pu montrer que l'efficacité du traitement d'entretien reposait sur l'accumulation intracellulaire de métabolites thioguanidiques (6-TGN) qui sont incorporés à l'ADN et cytotoxiques. Ainsi, la Mercaptopurine et le Methotrexate inhibent tous deux la synthèse de purines endogènes qui entrent en compétition avec les 6-TGN dans la synthèse de l'ADN. Dans l'étude du NOPHO, des taux faibles de 6-TGN étaient associés à un risque de rechute plus élevé (63). Le protocole européen actuel (AllTogether N°EUDRACT 2018-001795-38) inclut une sous-étude de phase III proposant une randomisation du traitement d'entretien, chez les patients de risque intermédiaire, entre traitement historique associant 6-Mercaptopurine et Methotrexate, et un traitement enrichi en Thiopurine (TEAM) ajoutant la 6-Thioguanine au traitement standard.

1.6.1.5. Traitement du le système nerveux central (SNC) :

Compte tenu des séquelles à long-terme qui lui sont associées (développement neurocognitif, endocrine, et risque de cancers secondaires), l'irradiation crânio-spinale a été progressivement remplacée par l'administration de chimiothérapie intrathécale. L'étude prospective du St Jude

menée entre 2007 et 2017 et proposant l'utilisation de la chimiothérapie intrathécale seule (sans irradiation), intensifiée en cas de facteurs de risques d'envahissement du SNC (4 injections au lieu de 2) avait, en effet, montré une nette réduction du risque de rechute méningée, en comparaison à la cohorte précédente qui n'avait pas bénéficié de cette intensification (64).

1.6.2. Traitement et pronostic des rechutes :

Malgré les excellents résultats obtenus avec les traitements de première ligne, près de 15% des enfants atteints de LAL-B vont rechuter. Les rechutes surviennent dans la moelle osseuse (50% des cas), dans le SNC (19%) ou en testiculaire (5%) (65). Le facteur pronostic majeur des rechutes des LAL-B reste le délai de rechute après le diagnostic initial. Ainsi une rechute survenant dans les 18 mois suivant le diagnostic, est associée à un pronostic plus défavorable qu'une rechute tardive. A titre d'exemple, pour les rechutes médullaires isolées, l'OS à 5 ans est de 12% en cas de rechute précoce, et de 43% pour une rechute tardive. De plus, les rechutes médullaires isolées ou combinée (médullaire et autre site) sont associées à un pronostic plus défavorable à 5 ans, que les rechutes neuroméningées, testiculaires ou extra-médullaire isolées (24% et 39%, versus 58%, 58% et 56% respectivement) (66,67). Les facteurs de risques initiaux identifiés au diagnostic (leucocytose initiale, âge, phénotype, atteinte SNC) impactent également le pronostic de la rechute. Ainsi les patients ayant une LAL-B de haut-risque au diagnostic, ont un pronostic plus défavorable à la rechute, alors que l'intensité du traitement reçu en première ligne ne semble pas impacter le pronostic à la rechute (66).

Le traitement de rattrapage par chimiothérapie intensive permet d'obtenir une réponse chez la majorité des patients (68–71). Ce traitement doit être consolidé par une allogreffe de cellules souches hématopoïétiques (CSH) chez les patients de haut risque, avec une OS à 2 ans estimée à 90% après allogreffe (72). Cependant 10 à 50% des patients traités pour une première rechute vont en présenter une seconde (69,71,72). Le pronostic des patients présentant plusieurs rechutes successives est alors très défavorable. Ainsi, dans une étude rétrospective incluant 325 patients de moins de 21 ans, ayant présenté une ou plusieurs rechutes de LAL-B entre 2005 et 2013, l'EFS à 2 ans était estimée à $41 \pm 6\%$, $13 \pm 7\%$, et $27 \pm 13\%$ dans les groupes ayant nécessité 2 ligne, 3 lignes ou 4 lignes ou plus de traitement (**Figure 2**) (73).

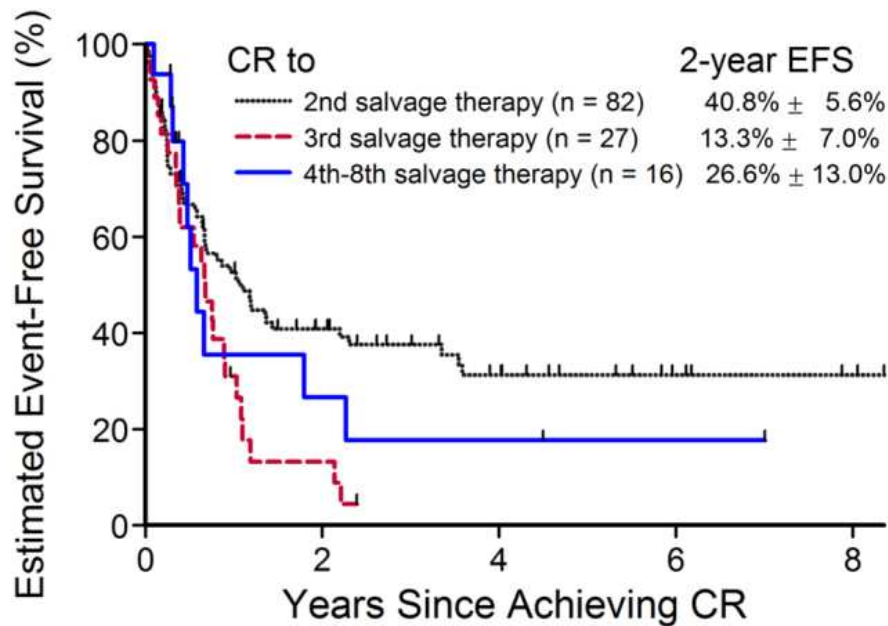


Figure 2 : Survie sans évènement à 2 ans, selon le nombre de ligne de traitement de rattrapage (nombre de rechutes) reçues en traitement d'une LAL-B évaluée dans une étude rétrospective ayant inclus 325 patients de moins de 21 ans (73).

C'est dans le contexte du pronostic défavorable des rechutes des LAL-B pédiatriques qu'ont été développées les immunothérapies.

1.6.3. Place des principales des immunothérapies dans les LAL-B:

Les immunothérapies regroupent les anticorps (Ac) monoclonaux et les cellules-T modifiées qui ont été initialement développées dans les LAL-B en rechute ou réfractaires (LAL R/R), et ont permis d'obtenir une réponse dans des maladies chimio-réfractaires en s'affranchissant de la toxicité cumulée associée aux fortes doses de chimiothérapies.

D'autres immunothérapies (Acs anti-CD38, ou cellules CAR-T anti-CD7 ou anti-CD5) sont également en cours d'investigation dans les LAL-T et ne seront pas développées ici (9,74). La **Figure 3** présente les immunothérapies actuellement disponibles en clinique avec une AMM pour le traitement des LAL et celles en cours de développement.

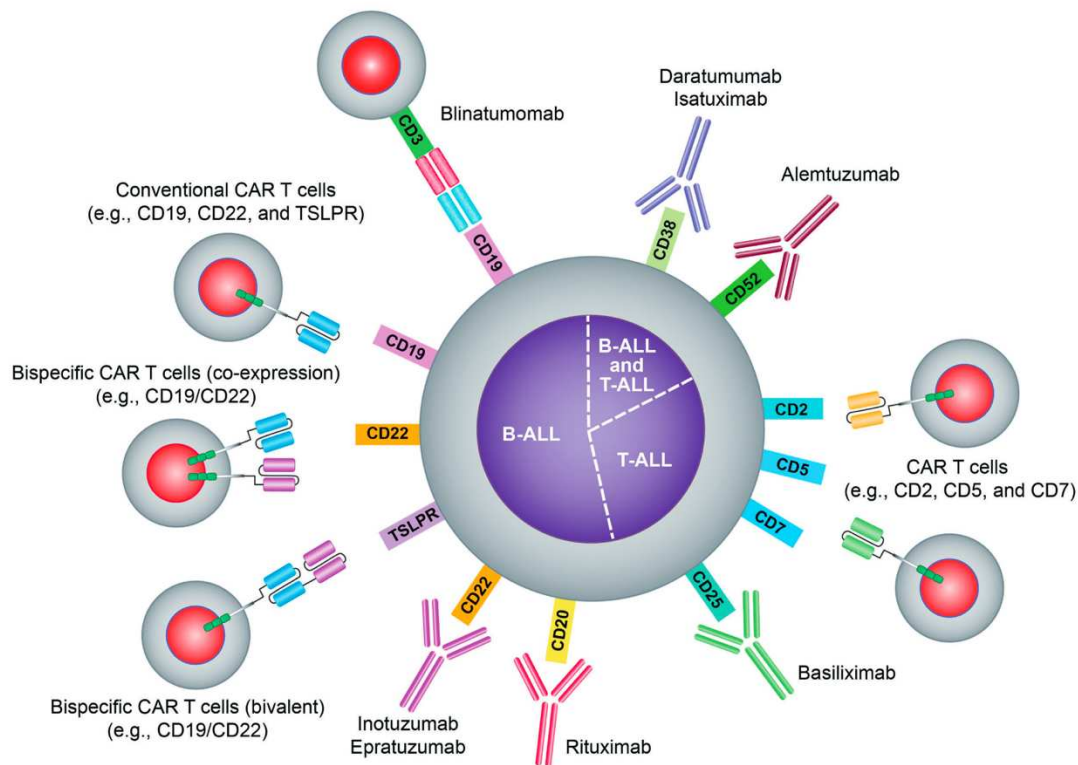


Figure 3 : Immunothérapies actuellement disponibles en clinique ou en cours d'investigation dans le cadre du traitement des LAL (9)

1.6.4. Les anticorps :

Les Acs monoclonaux utilisés dans les LAL-B de l'enfant ou de l'adulte comprennent un Ac chimérique anti-CD20 (Rituximab), un Ac anti-CD22 couplé à une molécule cytotoxique (Inotuzumab) et un Ac bi-spécifique (anti-CD19/CD3) (Blinatumomab). Chacune de ces trois molécules comportant les chaînes lourdes et légères de régions variables d'un Ac spécifiques d'un antigène présent à la surface des cellules leucémiques.

1.6.4.1. Rituximab (anti-CD20)

Le rituximab est une immunoglobuline glycosylée chimérique comprenant la région constante d'une IgG1 humaine (Fc) et les régions variables des chaînes lourdes et légères (Fab) d'un Ac monoclonal murin spécifique du CD20 humain (75). Le rituximab se lie par sa région Fab à la molécule CD20 et induit des modifications du cycle cellulaire et l'apoptose des lymphocytes B. Cet Acm se lie également par sa région Fc aux cellules immunitaires qui expriment des récepteurs au fragment Fc :

CD16, CD32, CD64. Cette fixation induit la lyse des lymphocytes B par cytotoxicité cellulaire dépendante des Ac (ADCC). Enfin, le Fc de cet Ac peut activer la voie classique du complément (CDC). Une expression hétérogène du CD20 (par plus de 20% des cellules blastiques) est détectable dans 30 à 50% des LAL-B de l'enfant de l'adulte (76,77). L'expression du CD20 était associée à un pronostic plus péjoratif dans la cohorte du POG en 1997. Cependant l'étude du St Jude plus récente (2006) ne retrouvait pas d'impact pronostic significatif associé à l'expression du CD20 dans les LAL-B pédiatriques (78,79). En 2010, le Groupe de Recherche dans les Leucémies Aigües Lymphoblastiques de l'Adulte (GRAALL), montrait que le CD20 était exprimé par 32% des LAL-B à chromosome Philadelphie de l'adulte, et que son expression était associée à un pronostic plus péjoratif en terme d'incidence de rechute, et ce indépendamment du groupe de risque (77). Dans ce contexte, plusieurs études ont proposé d'ajouter le Rituximab au traitement par chimiothérapie de type hyper-CVAD chez des adolescents et jeunes adultes porteurs de LAL-B. Ces études ont montré une nette amélioration de la durée de réponse et de la survie globale dans les groupes ayant reçu du Rituximab (80,81). Chez l'enfant, le Rituximab a principalement été utilisé dans les lymphomes-B non Hodgkinien de haut-risque, en combinaison avec la chimiothérapie intensive. Il a permis d'obtenir une nette amélioration de la survie sans rechute et de la survie globale chez ces jeunes patients atteints de lymphomes B matures de haut grade (82).

En raison de l'hétérogénéité d'expression de CD20 sur les cellules leucémiques et de la variabilité d'expression d'un patient à l'autre, le Rituximab est utilisé, à la marge chez l'enfant, dans des maladies réfractaires CD20⁺. Il est combiné à la chimiothérapie, et administré en intraveineux à la posologie de 375mg/m².

1.6.4.2. Blinatumomab (anti-CD3-anti-CD19)

Le Blinatumomab (bscCD19 × CD3 ou MT103) est un Ac bi-spécifique engageant les lymphocytes-T (ou *T-cells engager*) (BiTE), développé par une équipe Allemande (83). Il s'agit d'une protéine de fusion de faible poids moléculaire (55kDa) obtenue par technique de recombinaison de l'ADN. Il est constitué d'un fragment variable simple chaîne Fv (scFv) d'un Ac murin anti-CD19 (clone HD37) fusionné à un scFv murin anti-CD3 (clone L2K) via un court peptide de liaison (GGGGS) (84) (Figure 4) Un scFv est constitué uniquement des domaines variables des chaînes lourdes et légères VH et VL d'un Ac, reliés entre eux par un lien peptidique flexible (généralement quinze acides aminés). Le

Blinatumomab est produit sur des cellules ovariennes de hamster chinois (CHO), modifiées génétiquement, et ayant intégré de façon stable l'ADN codant pour la protéine de fusion (83). Les cellules CHO produisent le Blinatumomab sous forme monomérique ou dimérique, qui sont toutes deux actives. Cependant, seule la forme monomérique a été sélectionnée pour les applications cliniques, en raison de propriétés biologiques et pharmacologiques supérieures (84).

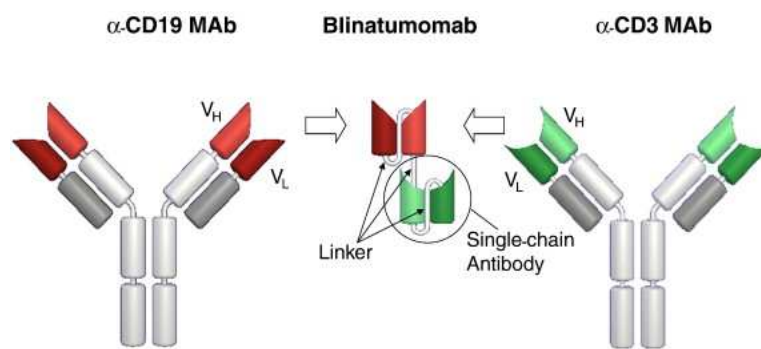


Figure 4 : Structure de l'Ac bi-spécifique Blinatumomab, obtenu par fusion recombinante et comprenant 4 domaines variables (chaînes lourdes et chaînes légères) dérivés des Ac murins anti-CD19 et anti-CD3, reliés un court peptide de liaison (GGGGS). L'ensemble formant une protéine de fusion de 55kDa (84).

In vitro, le Blinatumomab permet l'établissement d'une synapse immunologique étroite entre le lymphocyte T et la cellule tumorale ce qui induit leur l'activation des lymphocytes T (LT), la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (TNF α , interleukines 2, 6 et 10), et leur activité cytotoxique via le relargage du contenu des granules cytotoxiques (granzyme B et perforine) aboutissant à la lyse de la cellule cible (85). De façon intéressante, toutes les cellules T, CD4⁺ ou CD8⁺, à l'exception des cellules T naïves, sont capables de lyser les cellules cibles, sans nécessiter d'activation, d'expansion préalable, ou de signaux de co-stimulation. Toutefois, les cellules T effectrices mémoires (CD4⁺ ou CD8⁺) étaient associées à une plus grande activité cytotoxique (84,85).

Le CD19 est exprimé dans la grande majorité des LAL-B de l'enfant et de l'adulte (37,76). La première utilisation du Blinatumomab chez l'Homme a eu lieu en 2001, et 3 études de phase I ont été conduites dans les lymphomes non-Hodgkiniens réfractaires ou en rechutes (MT103 I/01-2001, MT103 I/01-2002, MT103 I/01-2003) (84).

Plusieurs études de phase II, menées ensuite par l'équipe Allemande, chez l'adulte, en unicentrique puis en multicentrique, entre 2011 et 201, ont montré l'efficacité de l'administration en continu du Blinatumomab dans le cadre de LAL-B réfractaires ou avec une MRD positive persistante. L'obtention d'une réponse dans 70% des cas, avait permis à plus de la moitié des patients de bénéficier d'une allogreffe de CSH. Dans ces études l'EFS à un an était estimée aux alentours de 60-70% 3 ans (86–89) . En 2016, une étude de phase I/II a évalué l'efficacité et la tolérance du Blinatumomab chez 93 patients pédiatriques présentant une LAL-B en rechute ou réfractaire (R/R). Une rémission cytologique avait été obtenue chez 27 (39%) des 70 patients ayant reçu la posologie optimale (90). Sur la base de ces études, le Blinatumomab a été approuvé par l'Agence Américaine de l'alimentation et des médicaments (Food and Drug Agency, FDA) dans le traitement des LAL-B R/R en 2017.

De larges études de phase III, ont ensuite été conduites chez l'adulte et chez l'enfant, comparant le traitement par chimiothérapie intensive, avec le Blinatumomab en monothérapie, dans des LAL-B en rechute. Ces études ont montré la supériorité en terme de survie sans rechute dans le bras Blinatumomab (31% versus 12% chez l'adulte à 6 mois, et 55% versus 39% chez l'enfant à 2 ans, respectivement) (91,92). De façon notable, alors même que l'antigène CD19 était décrit comme essentiel à la prolifération et à la survie des cellules B, parmi les rechutes survenant au décours du traitement par Blinatumomab, près de 50% des LAL-B étaient CD19 négatives (88,91).

Aujourd'hui, le Blinatumomab est administré en intraveineux continu pendant 28 jours, à la posologie maximale de 15µg/m²/j. C'est un élément clé du traitement des LAL-B en rechute, notamment en cas de MRD positive. Le protocole européen actuel (Alltogether, N°EUDRACT 2018-001795-38) propose par ailleurs son utilisation dès la première ligne dans les LAL-B de haut risque en cas de mauvaise réponse moléculaire à l'induction ou post-consolidation, ou encore chez les patients porteurs de syndrome de Down et donc ayant un risque de toxicité plus élevé.

1.6.4.3. L'Inotuzumab (anti-CD22)

L'Inotuzumab est un Ac humanisé anti-CD22, couplé à la calichéamycine développé par une équipe Américaine (93). L'inotuzumab est un Ac de la classe des immunoglobulines de type G sous-type 4 (IgG4) humanisé, dérivé d'un Ac murin anti-CD22, et produit par des cellules CHO. L'IgG4 anti-CD22 est liée de façon covalente à la Calichéamycine par un acide butanoïque (Figure 5) (93). La

calichéamycine est un composant cytotoxique produit par la souche *Micromonospora echinospora subsp. calichensis*, isolée pour la première fois en 1980. Cette molécule est capable d'induire des lésions doubles-brins de l'ADN qui aboutissent à la mort cellulaire par apoptose. Lors de la reconnaissance du CD22 par l'Inotuzumab, le complexe CD22-Inotuzumab est rapidement internalisé, le complexe Ac-Calicheamycine est clivé, libérant ainsi la forme inactive de Calichéamycine. Celle-ci est ensuite activée par les résidus Thiol intracytoplasmiques. Une fois dans le noyau, la forme active s'intercale dans l'ADN induisant les lésions doubles-brins (94,95).

Le CD22 est exprimé à la surface de près de 80% des LAL-B de l'adulte et dans la majorité des LAL-B de l'enfant (37,76). Aux Etats-Unis, l'Inotuzumab a montré une activité cytotoxique sur des lignées cellulaires de lymphomes B, et également une activité anti-tumorale sur des modèles pré-cliniques de xénogreffes de lymphomes B non- Hodgkiniens (93,95).

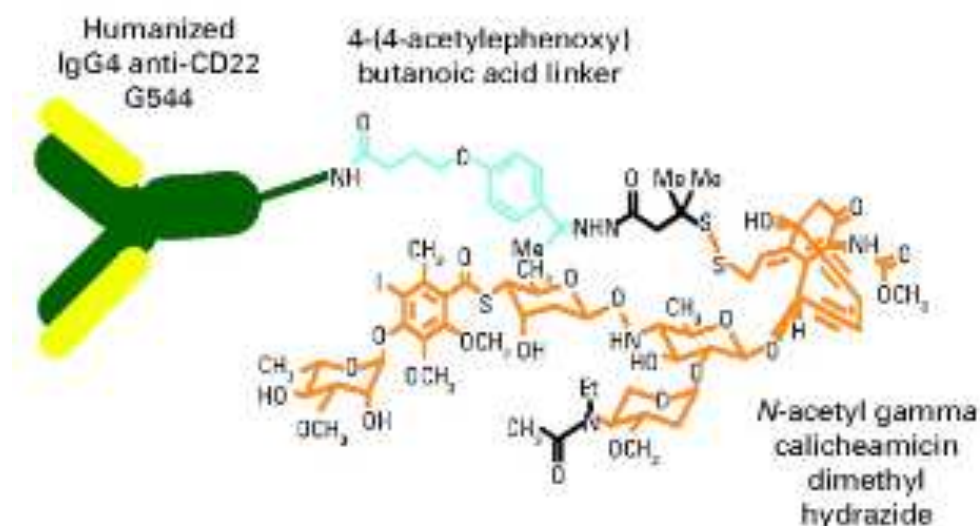


Figure 5 : Composition et structure de l'Inotuzumab. Il s'agit d'une IgG4 humanisée dérivée d'un Ac murin anti-CD22, reliée de façon covalente à la Calichéamycine via un acide butanoïque (93,96).

La première étude clinique a également été menée aux Etats-Unis et incluait 79 patients adultes (âge médian 60 ans) atteints de lymphomes-B non Hodgkiniens réfractaires à deux lignes de chimiothérapie. Cette première étude a pu déterminer la dose maximum tolérée, et a montré des taux de réponse encourageants (68% de réponse dans les lymphomes folliculaires et 15% de réponse dans les lymphomes-B diffus à grandes cellules) (96).

Une première étude de phase II menée au MD Anderson (Texas, Etats-Unis) a ensuite évalué la faisabilité et l'efficacité de l'Inotuzumab en traitement de LAL-B R/R de l'adulte et de l'enfant. Cette étude a inclus 49 patients âgés de 6 à 80 ans, qui ont reçu une injection d'Inotuzumab par mois. Le taux de réponse global était de 57% (95% CI 42–71), et l'effet indésirable majeur était la toxicité hépatique chez plus de la moitié des patients (97). La même équipe a pu déterminer, au cours d'une deuxième étude qui incluait 90 patients atteints de LAL-B R/R, que la tolérance était améliorée par un schéma en 3 injections sur 3 semaines (0,8mg/m² au 1^{er} jour, puis 0,5mg/m² au 8^e et 15^e jour). Notamment l'incidence de la maladie veino-occlusive en cours d'allogreffe ensuite était plus faible dans le groupe ayant reçu l'Inotuzumab au 1^{er}, 8^e et 15^e jour (98).

Cette même équipe a ensuite piloté une étude de phase III (INO-VATE) qui comparait, chez 326 patients adultes présentant une LAL-B R/R, l'utilisation de l'Inotuzumab avec un traitement standard par chimiothérapie. Cette étude a mis en évidence l'obtention plus fréquente d'une rémission après Inotuzumab (74% *versus* 30%, $p < 0,001$), et également un bénéfice en survie globale (22% *versus* 10%, $p = 0,01$, respectivement). Ce bénéfice en réponse, se faisait au prix d'une augmentation de l'incidence de maladie veino-occlusive hépatique notamment au cours de la procédure d'allogreffe de CSH ensuite (14% *versus* 2%) (99,100). Enfin, chez l'adulte, il a également été montré que l'Inotuzumab pouvait aussi être utilisé en combinaison avec une chimiothérapie de faible intensité, et permettait d'obtenir des taux de réponse encourageants avec une tolérance acceptable (101,102).

En pédiatrie, une étude rétrospective a confirmé les résultats obtenus chez les premiers enfants traités par Inotuzumab, en retrouvant un taux de réponse de 67% chez des enfants déjà lourdement traités et présentant une LAL-B R/R. Cette étude a également confirmé la bonne tolérance immédiate de l'Inotuzumab, mais aussi le risque de maladie veino-occlusive survenant en cours d'allogreffe de CSH (52% des patients allogreffés) (103). Ces résultats ont ensuite été confirmés dans une cohorte européenne, pilotée par l'équipe du Princesse Maxima à Utrecht, de 25 enfants traités pour une LAL-B R/R (104). Ce consortium a également évalué récemment la combinaison de l'Inotuzumab à une chimiothérapie comprenant de la Vincristine et de la Dexaméthasone. La combinaison Inotuzumab-chimiothérapie permettait d'obtenir des taux de réponse similaire à ceux obtenus avec Inotuzumab seul (105).

Il faut noter, que dans ces études, parmi les patients ayant rechuté au décours de l'Inotuzumab, et pour lesquels une analyse phénotypique de la LAL-B était disponible post-Inotuzumab, une diminution ou une perte d'expression du CD22 était parfois mise en évidence (n=3/13 rechutes, et 1/3 rechutes analysées respectivement) (104,106).

A ce jour, l'Inotuzumab est administré en intraveineux, à la posologie de 0,8mg/m² au premier jour, puis 0,5 mg/m² au 8^e et au 15^e jour du cycle. Le futur protocole européen de traitement des rechutes des LAL-B pédiatriques, proposera d'utiliser l'Inotuzumab à l'induction dans les rechutes de risque standard. Enfin, le protocole européen actuel de traitement des LAL-B en première ligne (Alltogether, N°EUDRACT 2018-001795-38) propose d'utiliser l'Inotuzumab en phase de consolidation chez les patients présentant un risque de rechute élevé (cytogénétique de haut-risque, MRD positive en fin de consolidation).

1.6.5. Les cellules CAR-T :

1.6.5.1. Définition et développement pré-clinique

Un autre type d'immunothérapie développé dans les pathologies cancéreuses depuis les années 80, est le transfert adoptif de LT cytotoxiques capables de reconnaître à la surface des cellules tumorales, via leur récepteur T (TCR), un complexe majeur d'histocompatibilité (MHC)-peptide (107,108).

En 1993, Zelig Eshhar, élabore des lignées T murines, modifiées par électroporation, avec des plasmides codant pour un récepteur chimérique combinant une simple chaîne issue de la région variable de reconnaissance d'une immunoglobuline (scFv), et la chaîne intracellulaire ζ ou γ , de transduction du signal, commune au TCR et au récepteur des immunoglobulines (CAR). Cette équipe Israélienne démontre que ces cellules T hybrides sont capables de s'activer et de sécréter des cytokines pro-inflammatoires après reconnaissance spécifique de la cellule cible (**Figure 6**)(109). En 2005, cette même équipe propose d'améliorer ces cellules T hybrides. En effet, la première génération de cellules-T générée, conservait une activation dépendante du signal de co-stimulation et donc de l'expression, par la cellule cible tumorale, des molécules de co-stimulation. La deuxième génération de cellules-T, modifiées par transduction rétrovirale, exprime donc un récepteur chimérique comprenant, en plus, la molécule de co-stimulation CD28 (**Figure 6**) (110,111). Au cours

des 20 années suivantes, la composition du récepteur chimérique a évolué, faisant appel à différents domaines de co-stimulation (CD28, 4-1BB ou CD137, OX40 ou CD134), afin d'améliorer les capacités de prolifération et de persistance des cellules T modifiées, donnant naissance à la deuxième puis troisième génération de cellules CAR-T (112).

Le CD19 est une protéine de signalisation membranaire exprimée par l'ensemble des cellules lymphoïdes B dès les premiers stades de maturation, mais son expression est ensuite perdue lors de la différenciation en plasmocytes. Le CD19 agit comme un co-récepteur B et favorise la différenciation de cellules pro-B en cellules pré-B dans le compartiment médullaire mais il favorise également la survie des cellules B naïves circulantes, ainsi que la différenciation des cellules B dans les ganglions lymphoïdes (39–41). Le CD19 est ainsi exclusivement exprimé par les cellules lymphoïdes B et de façon hautement conservée, ce qui en a fait une cible de choix pour la conception des cellules CAR-T (113–115).

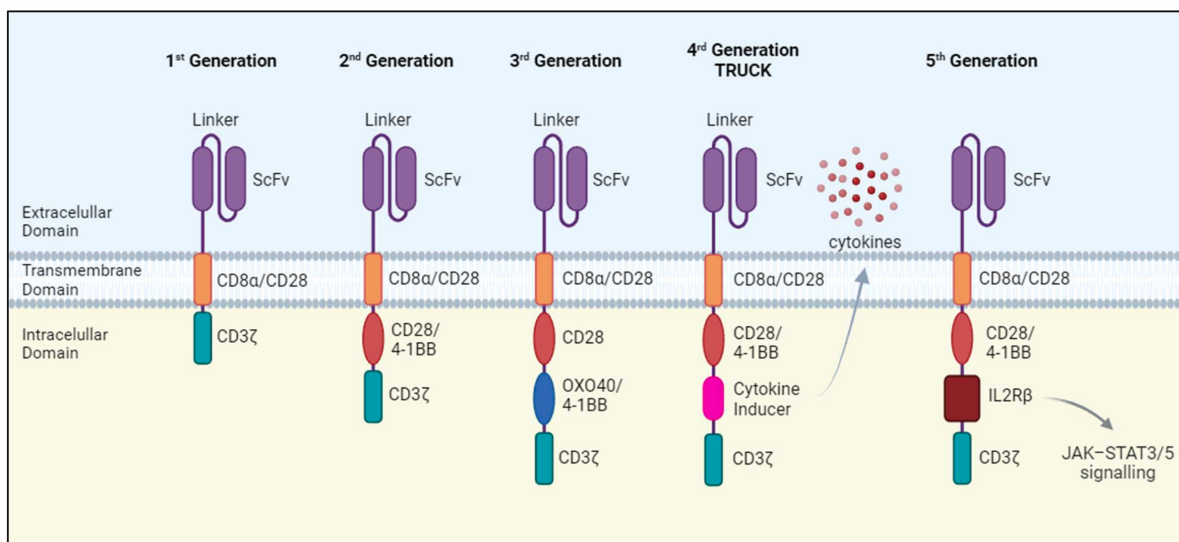


Figure 6 : Constructions des récepteurs chimériques à l'antigène (CAR) depuis la première génération associant le domaine de reconnaissance scFv d'une immunoglobuline à la chaîne ζ intra-cellulaire du TCR, jusqu'aux 4^e et 5^e générations incluant différents domaines de co-stimulation et également l'induction de production de cytokine (116)

L'efficacité anti-leucémique de cellules CAR-T anti-CD19 comprenant les domaines de co-stimulation 4-1BB (CD137) ou CD28 a été comparée. Dans des modèles précliniques de LAL, les cellules CAR-T anti-CD19 avec le domaine 4-1BB étaient associée à une efficacité plus importante et plus prolongée (117). En clinique, une large étude rétrospective, a inclus les patients issus du registre Français DESCART, traités par CAR-T cells anti-CD19 (Axi-cel, construit avec le domaine CD28 et Tisa-cel avec le domaine 4-1BB) pour un lymphome B non Hodgkinien réfractaire. Dans cette étude comparative, l'incidence de réponse était supérieure dans le groupe traité par Axi-cel (80% versus 66%, $p < 0,001$), au prix d'une toxicité neurologique également plus élevée (118).

Le choix de l'antigène ciblé par les cellules CAR-T est un élément clé. En effet, dans l'idéal, la cible antigénique doit pouvoir se lier avec une forte affinité au récepteur CAR, être fortement exprimée par la cellule tumorale, et peu ou pas par les tissus sains. Ceci afin de limiter les effets dits « on-target, off-tumor » liés à la destruction de cellules saines exprimant l'antigène, et pouvant être associés à une toxicité plus ou moins importante. Les cellules CAR-T reconnaissant des antigènes exprimés par les cellules lymphoïdes B ont été plus rapidement développées. En effet, les cellules B expriment de nombreux antigènes, pour lesquels des Ac étaient déjà disponibles, et le compartiment lymphoïde est également facilement accessible aux thérapies cellulaire adoptives (112). Le CD19 en particulier, est apparu comme une cible antigénique de choix. C'est un antigène exprimé quasiment exclusivement par les cellules issues de la lignée lymphoïde B. Il n'est pas présent sur les cellules souches hématopoïétiques, mais est largement exprimé dans les hémopathies malignes lymphoïdes B (113–115).

1.6.5.2. Développement clinique :

En 2009, l'équipe de l'université de Pennsylvanie (C. June) développe des cellules CAR-T anti-CD19, obtenues par transduction lentivirale, dont le récepteur chimérique comprend un domaine murin de reconnaissance scFv anti-CD19 relié aux domaines de co-stimulation 4-1BB ou CD28 et à la chaîne intracellulaire CD3 ζ . Dans des modèles murins de xénogreffe de LAL-B, cette équipe montre que les cellules CAR-T anti-CD19(4-1BB) ont une efficacité anti-leucémique plus importante que les cellules portant le domaine CD28, et permettent d'obtenir une survie prolongée des souris (> 6 mois) (117).

En 2010, cette même équipe inclue le premier patient adulte dans l'étude de phase I, proposant l'injection de cellules CAR-T anti-CD19 en traitement de leucémies lymphoïdes chroniques réfractaires. Chez ce premier patient, une expansion des cellules CAR-T anti-CD19 a été observée. Ces cellules étaient détectables dans la moelle osseuse et le sang circulant, 6 mois après injection. Elles ont permis d'obtenir une rémission complète sans autre toxicité qu'une lymphopénie profonde (119). Ces résultats ont ensuite été confirmés chez un deuxième patient (120). Enfin, en 2013, cette même équipe présente les résultats obtenus chez deux enfants, traités pour une LAL-B R/R, ayant reçu des cellules CAR-T anti-CD19. Une rémission complète durable > 11 mois a été obtenue chez le premier patient. La toxicité principale observée était un syndrome de relargage cytokinique (SRC). Le deuxième patient a quant à lui, présenté une rechute, 2 mois après injection des cellules. L'analyse du phénotype des cellules leucémique à la rechute avait alors mis en évidence une perte de l'expression du CD19 (121).

Ces résultats cliniques ont été confirmés, dans le même temps, par l'équipe du Memorial Sloan-Kettering Cancer Center (MSKCC), dans les LAL-B de l'adulte (122) ou encore dans d'autres pathologies lymphoïdes B par l'équipe du National Cancer Institute (123).

L'équipe de l'université de Pennsylvanie a publié en 2015 les résultats de l'étude pilote, monocentrique, de phase I/II incluant 25 enfants, et 5 adultes, traités pour une LAL-B R/R par CAR-T cells anti-CD19 (CTL019) (domaine de co-stimulation 4-1BB) qui montrait d'excellents résultats précoces avec 27/30 patients présentant une rémission complète à un mois de l'injection, dont 22 avec une MRD négative. Ces excellents taux de réponse, ont également été confirmés dans des études de phase I/II menées au Memorial Sloan-Kettering Cancer Center (MSKCC) et au National Cancer Institute (NCI), dans lesquelles 88% et 70% de rémissions complètes étaient obtenues, respectivement, chez des patients adultes et pédiatriques, traités pour une LAL R/R (124,125). Dans ces deux dernières études, les cellules CAR-T anti-CD19 utilisées comprenait le domaine de co-stimulation CD28. De façon intéressante, la persistance des cellules CAR-T anti-CD19, et de l'aplasie B induite, était significativement différente avec une durée de persistance de 1 à 3 mois avec le domaine de co-stimulation CD28, alors que la probabilité de persistance des CTL019 à 6 mois était de 68%, avec parfois une persistance au-delà de deux ans, avec le domaine de co-stimulation 4-1BB (126). La lymphopénie B profonde, ou aplasie B, secondaire à la destruction des lymphocytes B normaux, qui expriment également le CD19 persistait de la même façon.

L'université de Pennsylvanie a ensuite mené une étude multicentrique de phase II (ELIANA, NCT02435849), incluant 75 enfants traités pour une LAL-B R/R parmi lesquels 61% avaient déjà reçu une allogreffe de CSH. Ces patients pédiatriques recevaient une infusion de CTL019 après une chimiothérapie de lymphodéplétion (pour 96% d'entre eux). Le taux de réponse globale (rémission complète, et rémission avec reconstitution hématologique incomplète) à 3 mois était de 81% (IC95 71-89%). La probabilité d'EFS était de 80% à 6 mois (IC95 65-89%) et de 59% (IC95 45-73) à 12 mois. Vingt-deux patients ont rechuté, chez 15 d'entre eux, une perte d'expression du CD19 a été identifiée lors de l'immunophénotypage (127). Chez les patients répondeurs, l'expansion des cellules CAR-T était plus rapide et plus importante (pic d'expansion au 10^e jour, versus au 20^e jour chez les non répondeurs). La durée médiane de persistance dans le sang des CTL019 était de 168 jours (20 à 617), et 83% des patients avaient une aplasie B à 3 mois. La plupart des patients recevaient, dans ce contexte, une substitution en immunoglobuline polyvalentes (127). En termes de toxicité, 77% des patients ont présenté un SRC dont 47% un grade 3-4, caractérisé par de la fièvre et une défaillance hémodynamique, 37% ont reçu du tocilizumab (128). Quarante pourcent des patients ont présenté un évènement neurologique associé aux cellules immunitaires (ICAN), caractérisé par des céphalées, des convulsions, une somnolence ou des troubles de la vigilance (128,129). Les résultats de cette étude multicentrique ont conduit à l'approbation des CTL019 (Tisa-cel®) par la FDA aux USA en 2017, puis l'EMA (Agence Européenne du Médicament) en 2018.

1.6.5.3. Résultats à long terme :

En 2019, les résultats obtenus chez les patients Français traités par Tisa-cel® dans le cadre de l'étude ELIANA (NCT02435849) et ensuite dans le cadre d'un usage en vie réelle compassionnel ont été publiés. Parmi les 51 patients inclus, 63% avaient déjà bénéficié d'une allogreffe de CSH et 27% avaient reçu un traitement par Blinatumomab. Cette étude confirmait les excellents résultats précoces avec 95% des patients en rémission à 1 mois post-infusion et 92% avec une MRD négative. En revanche, avec un suivi médian de 7,2 mois la probabilité d'EFS à 18 mois était de 44% et l'incidence cumulée de rechute de 54% (130). Dix patients ont rechuté au sein de cette cohorte dont 5 avec une perte de l'expression du CD19 (4 de ces 5 patients avaient été exposés au Blinatumomab au préalable). En analyse univariée, l'exposition au Blinatumomab et une masse tumorale

importante avant lymphodéplétion semblaient associés à un risque accru de rechute. Vingt-deux patients (40%) avaient présenté un SRC de grade ≥ 3 , et 9 patients (16%) une toxicité neurologique. Ces derniers résultats étant superposables à ceux de la cohorte princeps (131).

En 2023, l'équipe de l'université de Pennsylvanie a actualisé les données de suivi à long terme (plus de 3 ans) des patients inclus dans l'étude ELIANA (NCT02435849). Au total 79 patients, âgés de 3 à 24 ans, avaient reçu une injection de Tisa-cel® dans le cadre du traitement d'une LAL-B R/R (74% d'infiltration médullaire blastique en moyenne). Le suivi médian était de 38,8 mois post-injection. L'estimation de l'EFS (en considérant la reprise d'un traitement anti-leucémique ou l'allogreffe de CSH comme des événements) était de 58% (IC95 43-70%) à 24 mois et de 52% (IC95 37-66%) à 36 mois. Dix-sept patients avaient reçu une allogreffe de CSH dont 11 en rémission post-cellules CAR-T. Aucun de ces patients allogreffés n'avait rechuté (132).

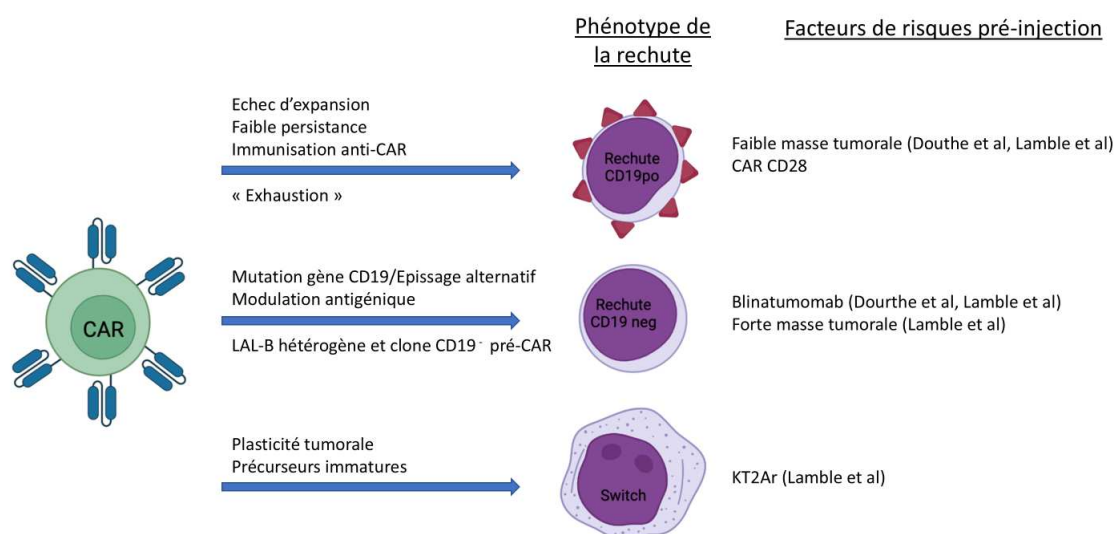
Ainsi, à plus long terme, près de la moitié des patients rechutent après un traitement par cellules CAR-T anti-CD19. Les rechutes pouvant ensuite être distinguées en deux groupes : celles ayant conservée l'expression du CD19, et celles qui ont perdu cette expression. Dans la cohorte française préalablement décrite, une forte masse tumorale ($MRD \geq 10^{-2}$) et une MRD détectable 28 jours après l'injection étaient associées à un risque accru de rechute CD19 négative. Une faible masse tumorale à l'injection et une perte d'aplasie B (témoin d'un défaut de persistance des CTL019) étaient associées à un risque accru de rechute CD19 positive (133). Enfin, il est intéressant de noter que la probabilité d'EFS obtenues dans les études menées en vie réelle (après obtention de l'AMM) (131,133) sont moins élevées que celle présentée dans l'étude princeps. Ceci pouvant être expliqué par le profil des patients traités (patients ayant été exposés au Blinatumomab, en moins bon état général ou ayant des co-morbidités). Enfin, un facteur important est le fait que la proportion de patients traités par cellules CAR-T anti-CD19 ayant déjà bénéficié d'une allogreffe de CSH auparavant est nettement inférieure dans les cohortes de vie réelle (37%) que dans la cohorte princeps (61%). Les cellules T modifiées sont donc profondément différentes, puisque dérivées soit de lymphocytes du patients ayant été fortement exposés à la chimiothérapie préalable, soit issues de lymphocytes du donneur respectivement (134,135).

Une étude rétrospective Américaine récente, a analysé les facteurs prédictifs de rechute post-traitement par cellules CAR-T anti-CD19 et leur pronostic. Au total, les résultats de 420 patients

pédiatriques (âge médian 7,6 ans (3,4-13,8)), ayant reçu un traitement par cellules CAR-T anti-CD19 entre 2012 et 2019, ont pu être analysés. Les patients avaient reçu des CTL019 soit dans le cadre de l'étude ELIANA, soit sous la forme commerciale (Tisa-cel®), ou des cellules CAR-T anti-CD19 construites avec le domaine de co-stimulation CD28 (13,1% des patients). Le suivi médian était de 30 mois, et 43,9% des patients avaient rechuté. Cette étude a tout d'abord confirmé qu'une forte masse tumorale, ou une blastose circulante, une mauvaise réponse au traitement préalable par Blinatumomab, ou l'utilisation de cellules CAR avec le domaine de co-stimulation CD28 étaient associés à un sur-risque de rechute (134). Au sein de cette cohorte, 50,9% des rechutes étaient CD19 positives et semblaient associées à un défaut de persistance des cellules CAR-T et donc de l'aplasie B. Le statut de la maladie, au moment de l'injection, de 2^e rémission ou plus, était également associé à un surrisque de rechute CD19⁺. Dans 41,7% des cas, la rechute était CD19 négative. Dans ce sous-groupe, l'aplasie B persistait au moment de la rechute dans 68,3% des cas, témoignant d'une bonne persistance des cellules-CAR-T. Un âge inférieur à 7 ans, l'utilisation de cellules CAR-T plus persistantes (domaine de costimulation 4-1BB), et une forte masse tumorale à l'injection étaient associés à un risque accru de rechute CD19 négative. Enfin, un changement de lignée était observé dans 7,4% des rechutes, majoritairement au profit d'une leucémie aigüe myéloblastique. Tous les patients de ce sous-groupe avaient des cellules CAR-T anti-CD19 persistantes (aplasie B) au moment de la rechute, et tous sont décédés d'une progression de la leucémie. La présence d'un réarrangement KMT2A était le seul facteur de risque identifié de rechute avec modification de lignée (134).

Les rechutes survenant au décours d'un traitement par cellules CAR-T anti-CD19 sont globalement de pronostic péjoratif, mais le pronostic des rechutes CD19 négatives, ou avec modification de lignée semble plus défavorable encore, avec une durée médiane de survie post-rechute de 18,9 mois (IC95 12,2-27), 9,7 mois (IC95 6,9-15,9) et 3,7 mois (IC95 1,2-7) pour les rechutes CD19⁺, CD19⁻ et avec modification de lignées, respectivement (134). La **Figure 7A** présente les 3 types de rechutes post-cellules CAR-T anti-CD19 et les facteurs de risques associés. La **Figure 7B** représente la probabilité d'OS au décours d'une rechute survenant après traitement par cellules CAR-T anti-CD19, selon le phénotype de la rechute (134).

A



B

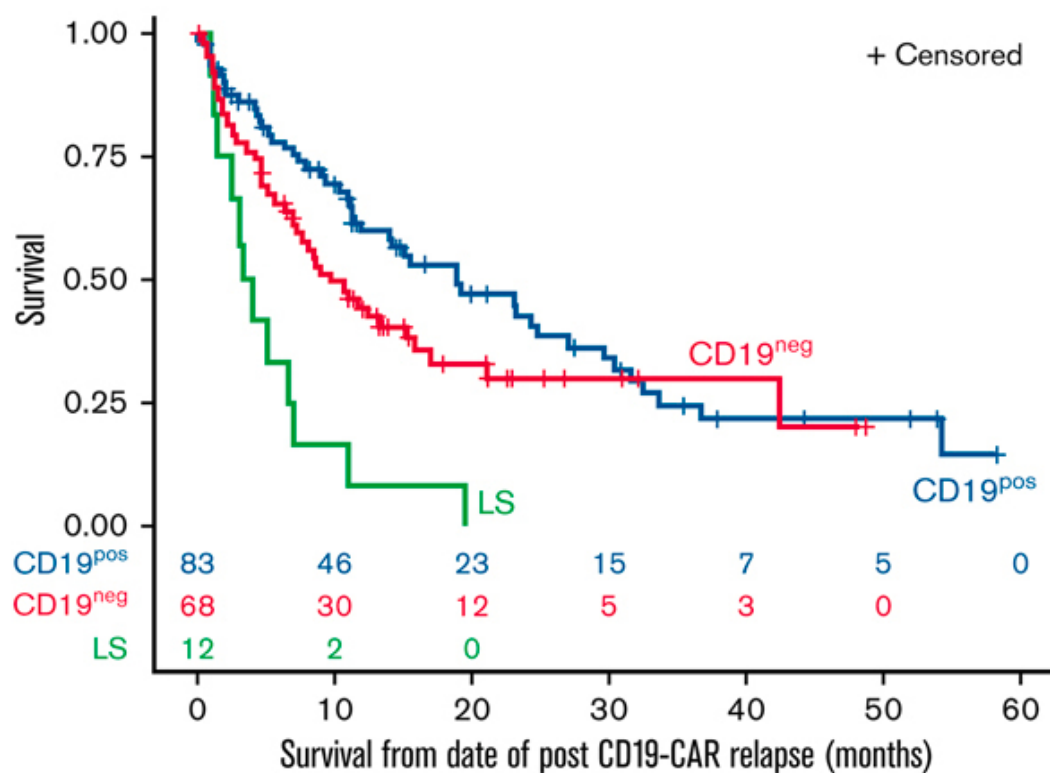


Figure 7 : Rechutes de LAL-B après traitement par cellules CAR-T anti-CD19. A : Phénotype des rechutes, mécanismes physiopathologiques et facteurs de risques identifiés. (Adapté de Lamble et al., 2023) (133,134). B : Probabilité de survie globale après rechute post-cellules CAR-T anti-CD19 selon le phénotype de la rechute (134).

1.7. Questions soulevées et limites actuelles des cellules CAR-T anti-CD19 :

1.7.1. Défaut de persistance des cellules CAR-T :

Ainsi, au décours d'un traitement par cellules CAR-T anti-CD19, près de la moitié des patients vont rechuter. Pour la majorité d'entre eux (50%), la rechute sera liée à un défaut de persistance des cellules CAR-T anti-CD19, et l'expression du CD19 sera alors le plus souvent conservée (133). La qualité du produit cellulaire injecté (phénotype des cellules T, état d'activation ou exhaustion, capacité d'expansion post-injection) impacte donc significativement la réponse au traitement (136). Ainsi une forte expression de marqueurs d'exhaustion par les cellules T injectées (LAG-3, TIM-3) est associée à un défaut d'amplification et de persistance, et une moindre efficacité anti-tumorale des cellules CAR-T chez le patient. Plusieurs stratégies sont actuellement explorées pour améliorer la qualité des cellules et leur capacité d'amplification et de persistance, parmi lesquelles le choix de la source de LT, l'amélioration de la structure du CAR en lui-même (amélioration des domaines de co-stimulation), la reprogrammation épigénétique des cellules CAR-T afin de limiter l'exhaustion et d'améliorer leur persistance, ou encore l'association avec des inhibiteurs de points de contrôle (*checkpoint*) immunitaires (Ac ciblant des co-sigaux inhibiteurs entre cellules tumorales, ou cellules présentatrices d'antigènes, et LT, réactivant ainsi une immunité cellulaire T anti-tumorale (137,138).

Je suis impliquée en tant que coordinatrice clinique, dans la conduite de l'essai CAPTiRALL EUDRACTN°: 2021-003035-28, étude de phase I, visant à évaluer l'utilisation d'un anticorps anti-PD1 combiné à une deuxième injection de Tisa-cel® chez des patients pédiatriques, traités pour une LAL-B, et présentant une perte précoce de la persistance des cellules CAR-T. Cette étude financée dans le cadre du PHRC 2019 est en cours.

Je conduis également le projet d'une étude pilote visant à analyser la corrélation entre l'expansion des cellules CAR-T anti-CD19 *in vitro* et leur expansion et efficacité chez le patient. Ce projet a fait l'objet d'une candidature aux appels d'offre internes du CHU de Nantes, et à l'appel à projet Recherche Greffe de l'Agence de Biomédecine.

1.7.2. Persistance des cellules CAR-T anti-CD19 et aplasie B :

Comme décrit précédemment, la disparition des lymphocytes B normaux circulants après traitement par cellules CAR-T anti-CD19 est expliqué par un effet « on-target, off-tumor » des cellules CAR-T anti-CD19. Les lymphocytes B normaux expriment en effet le CD19 et sont donc également lysés par les cellules CAR-T. L'existence d'une « aplasie B » est donc le témoin indirect de la persistance des cellules CAR-T anti-CD19, même lorsque celles-ci ne sont plus détectables dans le sang circulant (en biologie moléculaire ou en CMF) (126).

Les patients éligibles à une injection de cellules CAR-T ont, la plupart du temps, déjà été lourdement traités : une hypogammaglobulinémie (< 4g/L) est observée chez 26 % d'entre eux avant même la chimiothérapie de lymphodéplétion (139). Après traitement, 43 % des enfants et 57 % des adultes traités par Tisa-cel® pour une LAL-B présentent une hypogammaglobulinémie, qui peut persister plusieurs années (140). L'immunodépression observée chez les patients traités est donc secondaire aux cellules CAR-T mais le rôle des chimiothérapies antérieures, et notamment de la lymphodéplétion, ne doit pas être négligé (141). De plus, les infections représentent le principal déterminant de la mortalité sans rechute après traitement par cellules CAR-T anti-CD19. L'incidence est particulièrement élevée au cours du premier mois après infusion, notamment des infections bactériennes, puis diminue progressivement (142). Cependant, les infections restent relativement fréquentes même un an après le traitement. Wudhikarn et al. rapportent dans une revue publiée en 2020, 101 épisodes infectieux au cours de l'année post-injection, chez 60 patients traités par cellules CAR-T anti-CD19 pour un lymphome B diffus à grandes cellules ; dont 23 infections sévères, une infection mettant en jeu le pronostic vital et une infection mortelle. Les incidences cumulées à un an des infections au global, bactériennes, bactériennes graves, virales et fongiques étaient respectivement de 63,3 %, 57,2 %, 29,6 %, 44,7 % et 4 % (143).

A ce jour, il n'existe pas de consensus sur la gestion de l'aplasie B prolongée. Les prophylaxies anti-infectieuses à mettre en place et la substitution en immunoglobulines polyvalentes sont laissées à la discrétion du clinicien (144,145). Ainsi, en pédiatrie, la majorité des patients traités par cellules CAR-T anti-CD19 reçoivent une supplémentation en immunoglobulines polyvalentes (127) alors que celle-ci n'est pas systématique chez les patients adultes. Il n'existe pas non plus de recommandations précises et validées sur la reprise du calendrier vaccinal (140,146,147).

Un premier élément de réponse, à la question du niveau d'immunité résiduel chez les patients traités par cellules CAR-T anti-CD19, serait d'évaluer leur réponse à une stimulation antigénique vaccinale. En 2021, l'équipe de Walti du Fred Hutchinson Cancer Center à Washington, publie une étude prospective Américaine analysant les taux d'IgG spécifiques de 12 antigènes vaccinaux, chez des patients ayant reçus des cellules CAR-T anti-CD19 ou CAR-T anti-BCMA (Antigène de Maturation des Cellules B), utilisées dans le traitement du myelome chez l'adulte. Les prélèvements étaient effectués à distance de toute supplémentation en immunoglobulines polyvalentes. Parmi les 65 patients (adultes et pédiatriques) inclus, le pourcentage médian de cellules B circulantes était de 0,09 (entre 0 et 13,9%), et 40% des adultes traités par cellules CAR-T anti-CD19 (n=17), 6/10 adultes traités par cellules CAR-T anti-BCMA et 0 enfant, avaient perdu leur aplasie B. Dans le sous-groupe des adultes n'ayant pas reçu de supplémentation en immunoglobulines, la proportion de patients avec un taux séroprotecteur pour un antigène donné était similaire à celle observé dans la cohorte de donneurs sains. Un taux séroprotecteur d'immunoglobulines de type IgG était détecté pour 67 % des antigènes testés alors que 90 % des patients présentaient un taux d'IgG inférieur à la norme et 47 % un taux inférieur à 4 g/L (148). Cette persistance d'une séroprotection vaccinale pourrait être expliquée par la pérennité de plasmocytes à longue durée de vie dans la moelle osseuse, même en cas d'aplasie B (149). Des études antérieures montrent que chez les patients traités par Rituximab (Ac anti-CD20 entraînant également une déplétion en lymphocytes B circulants), des plasmocytes à longue durée de vie persistent dans la rate (150,151). Une étude de 2013 montre même que la déplétion lymphocytaire B par le Rituximab dans le purpura thrombopénique induirait une différenciation des lymphocytes B en plasmocytes à longue durée de vie (152).

Les résultats les plus récents sur la réponse humorale des patients traités par cellules CAR-T anti-CD19 sont issus de la vaccination contre le SARS-CoV-2. La réponse humorale et/ou cellulaire post-vaccination contre le Sars-Cov2 est obtenue chez une proportion variable de patients selon les études (entre 21 et 57%) (144,153–156). L'utilisation du vaccin mRNA-1273 (Moderna Biotech), un taux sérique élevé d'IgG, et un traitement par cellules CAR-T anti-BCMA semblent associés à une meilleure réponse humorale post-vaccinale (157).

A notre connaissance, seules 2 études ont analysé la persistance d'Ac spécifiques d'autres antigènes vaccinaux que ceux du SARS-CoV-2 chez les patients traités par cellules CAR-T anti-CD19. En 2023,

une équipe de Floride, a mené une étude rétrospective, analysant l'évolution de la réponse vaccinale humorale anti-pneumocoque après traitement par cellules CAR-T anti-CD19, et après revaccination par le vaccin antipneumococcique à 13 valences. L'analyse révèle que les taux d'IgG spécifiques du pneumocoque diminuent après traitement par cellules CAR-T anti-CD19, et que la vaccination entre 90 jours et 180 jours post-CAR ne permet pas d'obtenir une séroprotection plus importante (158). Enfin, l'équipe de Washington a mené au cours de l'hivers 2019-2020 une étude observationnelle prospective analysant la réponse vaccinale antigrippale chez des patients traités par cellules CAR-T anti-CD19 ou anti-BCMA. Chez les 18 patients inclus, seuls 6 présentaient une aplasie B au moment de l'analyse. Cinq ont été vaccinés avant l'injection des cellules CAR-T et 13 entre 13 et 57 mois après le traitement. Un taux séroprotecteur d'IgG anti-influenzae était obtenu chez 2/5 patients vaccinés avant traitement et 4/13 patients vaccinés après traitement (159).

En termes de réponse immunitaire cellulaire T, chez les patients traités par cellules CAR-T anti-CD19, les seules données publiées concernent celle contre le SARS-CoV-2. En 2021, l'étude de Ram et al. rapporte 50 % de réponse cellulaire T (test ELISpot positif) après administration de 2 doses du vaccin à ARN messenger BNT162b2 (Pfizer–BioNTech) (160). Après une 3^{ème} dose, la réponse est estimée à 83 % avec un meilleur taux de réponse à distance de l'infusion (161). Il semble, que bien qu'ayant une réponse humorale atténuée aux vaccins à ARN, les patients traités par cellules CAR-T anti-CD19 présentent une réponse cellulaire T normale ou accrue, en comparaison aux témoins sains vaccinés ou infectés par le SARS-CoV-2 (162–164).

Ainsi, quelques études hétérogènes, menées sur des petites séries de patients semblent montré l'existence possible d'une réponse cellulaire T à la vaccination, et une réponse humorale insuffisante chez les patients traités par cellules CAR-T anti-CD19. Ces études sont également limitées à quelques antigènes vaccinaux pour la plupart (Sars-Cov-2 et influenzae).

Nous avons analysé de façon prospective, et au sein d'une population plus homogène, la réponse vaccinale humorale et cellulaire T à plusieurs antigènes vaccinaux chez les patients traités par cellules CAR-T anti-CD19.

Ce travail a fait l'objet de l'axe 2 de mes travaux de recherche, et également du travail de recherche de master 2 d'Ana Llorens que j'ai co-encadré avec Béatrice Clémenceau.

1.7.3. Risque de cancers secondaires (lymphomes T) :

La modification des LT par transduction lentivirale (ou rétrovirale) entraîne l'insertion du transgène dans le génome cellulaire de façon stable (cf partie 1.8.2). Il existe donc un risque théorique de mutagenèse insertionnelle lié à l'insertion du transgène à proximité d'un gène suppresseur de tumeur ou d'un oncogène. A titre d'exemple, en 2018, une équipe de Philadelphie présentait le cas d'un patient traité par cellules CAR-T anti-CD19 pour une leucémie lymphoïde chronique, ayant présenté une excellente réponse clinique. Au pic d'expansion chez le patient, la majorité des cellules CAR-T circulantes provenaient en fait d'un seul et même clone, au sein duquel le transgène s'était inséré dans le gène TET2. Le patient étant par ailleurs porteur d'une mutation sur l'autre allèle de TET2. Cette équipe a ensuite confirmé *in vitro* que la dysfonction TET2 conférait un avantage de prolifération et de persistance à ce clone de cellules CAR-T (165).

Depuis 2023, plusieurs cas de lymphomes T survenus au décours d'un traitement par cellules CAR-T ont été rapportés et analysés par la FDA.

Au total, à la date d'avril 2024, 38 cas survenus dans les deux ans suivant l'injection des cellules CAR-T ont été décrits sur environ 42 500 patients traités dans le monde (166). L'expression du CAR a parfois été identifiée au sein de ces hémopathies secondaires, sans que le mécanisme de cancérogénèse, secondaire au traitement par cellules CAR-T ou lié à une prédisposition chez des patients lourdement traités, ne soit clairement établi (167–169). La FDA a préconisé un niveau de vigilance élevé notamment dans le contexte des traitements à un âge pédiatrique. Un consortium international d'experts a pu analyser l'incidence d'hémopathie malignes T survenues après traitement cellules CAR-T commerciales ou expérimentales chez les patients âgés de moins de 30 ans entre Avril 2012 et Décembre 2023. Sur 3038 injections pour des hémopathies lymphoïdes B, aucun cas d'hémopathie maligne T n'a été recensé, et sur 490 injections réalisées hors contexte d'hémopathies B, 1 seul patient traité pour un glioblastome de haut grade a présenté un lymphome T. Il s'agissait d'un patient atteint d'un syndrome de prédisposition constitutionnel (Mismatch Repair Deficiency, cMMRD). La survenue du lymphome T, au sein duquel l'expression du transgène n'a pas été identifiée, a donc été définie comme un deuxième cancer lié au syndrome de prédisposition (170).

Bien qu'extrêmement rare, le risque de malignité lié à la transduction de cellules T doit continuer d'être analysé. L'analyse des produits cellulaires reçus par les patients aura un intérêt majeur dans un contexte de veille sanitaire et de suivi de médicaments vivants de thérapies innovantes.

1.7.4. Rechutes de LAL-B CD19 négatives :

La persistance des cellules CAR-T anti-CD19 est associée à un risque de rechute de LAL-B ayant perdu l'expression de l'antigène cible CD19 (130,134).

1.7.4.1. Mécanismes à l'origine des rechutes CD19^{négatives}

Dès 2013, l'équipe de l'université de Pennsylvanie identifie le risque de rechute CD19 négatives au décours du traitement par cellules CAR-T anti-CD19. En effet, l'évolution clinique des deux premiers patients pédiatriques ayant reçus des CTL019 dans le cadre du traitement d'une LAL-B a été très différente. Le premier patient a présenté une expansion importante des cellules CAR-T ainsi qu'un SRC sévère, et une rémission persistante. Le deuxième patient inclus a quant à lui présenté un SRC moins sévère, et une rechute très précoce (2 mois après injection) de la LAL-B. L'analyse du phénotype membranaire lors de la rechute ne retrouvait pas d'expression du CD19 (CD45^{dim}, CD34⁺, CD19⁻), tandis que la LAL-B initiale était CD45^{dim}, CD34⁺, CD19⁺. Le séquençage des réarrangements IGH a révélé que ce sous-clone CD19 négatif partageait des séquences de remaniement IGH commune avec le clone dominant CD19⁺ présent au diagnostic. La pression du traitement par cellules CAR-T anti-CD19 avait ainsi sélectionné ce sous-clone CD19⁻ (121).

En 2015, au sein de cette même équipe, E. Sotillo a pu réaliser des analyses génomiques approfondies (PCR, RT-PCR, whole genome sequencing) d'échantillons de LAL-B primaires en comparant la maladie au diagnostic et lors de la rechute après traitement par cellules CAR-T anti-CD19. Ces analyses ont révélé l'existence de mutations non-sens ou faux sens induisant un décalage du cadre de lecture, ou encore d'épissage alternatif entraînant la production d'isoformes tronqués du CD19 : délétion de l'exon 2 (Δ ex2-isoforme) aboutissant à une perte de l'épitope FMC63 reconnu par les CTL019, et une diminution de l'expression membranaire du CD19, ou délétion des exons 5 et 6 (Δ ex5-6-isoforme) aboutissant à la perte des domaines transmembranaires et cytosoliques du CD19, et à une séquestration du CD19 dans le compartiment cytoplasmique (171). Une équipe

Allemande a ensuite confirmé en 2017 l'existence de ces isoformes du CD19 (Δ ex2 et Δ ex5-6-isoformes) dans des échantillons de LAL-B primaires issues de 11 enfants et 6 adultes. L'isoforme Δ ex2 aboutissant à la diminution de l'expression de CD19 associée à la perte de l'épitope FMC63 (171) était également identifié dans des échantillons médullaires issus de donneurs sains (39). En effet l'isoforme Δ ex2 abouti à une protéine CD19 fonctionnelle, permettant la signalisation cellulaire et la maturation B, tandis que les isoformes tronqués (Δ ex5-6-isoformes) étaient exclusivement identifiés dans les échantillons de LAL-B (39). Il semble donc que des mutations et/ou délétions, ou des mécanismes d'épissage alternatifs, aboutissent à l'existence de plusieurs isoformes du CD19, dont certains confèrent une résistance aux CTL019 (par perte de l'épitope, ou par défaut d'expression membranaire) (Figure 8). Certains de ces isoformes aboutissant à un CD19 fonctionnels sont donc présents chez des individus indemnes de toute pathologie lymphoïde. Théoriquement, la sélection d'un clone leucémique exprimant le CD19 Δ ex2, et donc la résistance aux cellules CAR-T anti-CD19, est donc possible chez tous les patients (172).

Une étude menée par la firme industrielle commercialisant les cellules CAR-T anti-CD19 Tisa-cel® (Novartis) a également ensuite identifié des mutations génétiques acquises sur les exons 2 à 5 du gène codant pour le CD19, à l'origine de rechutes CD19⁻ (173).

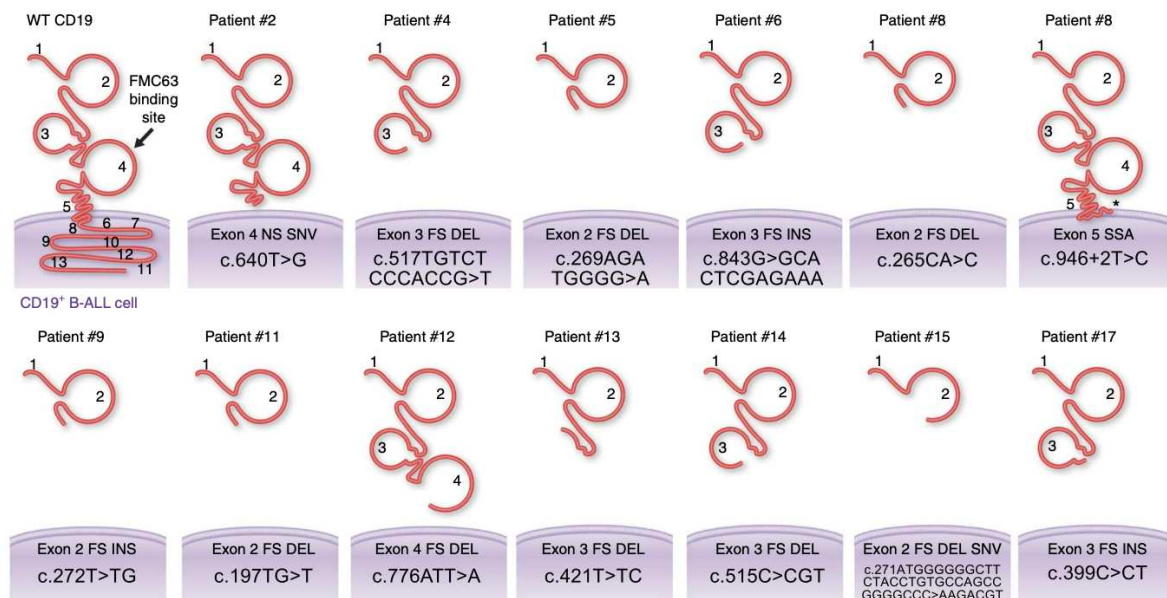


Figure 8: Structure du CD19 sauvage (wildtype), et structures prédites des différents isoformes issus du gène CD19 muté identifiés chez des patients ayant présenté une rechute de LAL-B CD19 négative (173).

De façon plus rare, des rechutes associées à un changement de lignée, au profit d'une leucémie aigüe myéloblastique, ont été décrit chez des patients pédiatriques traités pour une LAL-B par cellules CAR-T anti-CD19. Le réarrangement du gène KMT2A identifié au diagnostic de LAL-B était également identifié lors de la rechute myéloblastique (174,175).

Ainsi, l'échappement tumoral par modulation antigénique et sélection d'un sous-clone ayant perdu l'expression membranaire de la cible antigénique ou son épitope, est un mécanisme fréquent de résistance au traitement par cellules CAR-T anti-CD19. L'utilisation de thérapies ciblées capables de reconnaître plusieurs épitopes d'un antigène ou bien plusieurs antigènes simultanément est donc apparue, dès 2013, comme nécessaire pour limiter ce mécanisme d'échappement tumoral (171,173,176).

1.7.4.2. Double ciblage des LAL-B avec des cellules CAR-T

Dès 2013, plusieurs équipes s'attachent donc à développer des cellules CAR-T dirigées contre d'autres cibles antigéniques que le CD19. Ainsi, l'équipe du National Cancer Institute (NCI) conçoit dès 2013 des cellules T, équipées de CAR comportant un scFv de 3 Ac humain anti-CD22, un reconnaissant un épitope proche de la membrane (clone m971) et les deux autres un épitope plus éloigné (clone BL22 et HA22) (épitope de l'inotuzumab). Ces 3 scFv étaient reliés à plusieurs domaines de co-stimulation intra-cellulaires (CD28-CD3 ζ , CD28-4-1BB (2^e génération) ou CD28-4-1BB-CD3 ζ (3^e génération)). Dans cette étude préclinique, les cellules CAR-T anti-CD22 reconnaissant l'épitope proche de la membrane cellulaire étaient associées à une efficacité anti-leucémique *in vitro* sur des lignées cellulaires ou des LAL-B primaires CD19 positives ou négative et également dans des modèle murins (177). Cette même équipe publie en 2018 les résultats d'une étude de phase I, incluant 21 patients (âge médian 19 ans (7-30 ans)), et proposant l'utilisation de ces cellules CAR-T anti-CD22 en traitement de LAL-B en rechute post-allogreffe. Parmi les 21 patients inclus, 17 avaient déjà reçu une immunothérapie anti-CD19 dont 15 avec des cellules CAR-T anti-CD19. L'expression du CD19 sur les cellules blastiques était négative ou faible chez 10 d'entre-eux. Ces cellules CAR-T anti-CD22 étaient associées à une bonne tolérance clinique, et permettait l'obtention d'une réponse chez près de la moitié des patients. Cependant 8 des 12 patients ayant présenté une réponse ont

rechuté, dont 7 avec une diminution de l'expression du CD22 (178). Ces résultats préliminaires d'utilisation séquentielle de deux thérapies ciblées (anti-CD19 puis anti-CD22) ont ensuite justifié le développement de stratégie de ciblage multiple simultané.

Ainsi, à partir de 2016, des stratégies de ciblage double ou triple, simultanés, se sont développées de façon exponentielle avec soit des cellules T équipés de 2 récepteurs CAR différents (dual-CAR) (179,180), soit un CAR comportant 2 scFv différents (CAR-bispécifiques) (181,182), ou un mélange de deux populations T exprimant chacune un CAR différent (pooled-CAR). La **Figure 9** présente ces différentes modalités de ciblage multiple utilisant des cellules T équipées de CAR (183).

L'équipe de l'université de Pennsylvanie a ainsi mis en évidence une efficacité sur des modèles murins de xénogreffes de LAL-B de dual-CAR anti-CD19 et anti-CD123 (180), et l'équipe de Seattle (Etats-Unis) a montré une efficacité des CAR-bispécifiques anti-CD19/CD20 également dans des modèles murins de xénogreffes (182).

L'équipe du NCI a mis en évidence une activité anti-tumorale de CAR-bispécifiques anti-CD19/CD22 sur des modèles de xénogreffe de LAL-B dérivées de patients, notamment à partir de rechutes survenues au décours d'un traitement par CTL019 (184). L'étude de phase I utilisant ces cellules CAR-T bispécifiques CD19/22 (CD19-22.BB.z-CAR) incluait 17 adultes atteints de LAL-B (âge médian 47 ans (26-68 ans)), une réponse a été obtenue chez tous les patients, mais 10 ont rechuté dont 5 avec une perte d'expression du CD19, sans perte d'expression du CD22 (185).

A Londres, l'équipe d'Amrolia a mené une étude de phase I, incluant 12 patients pédiatriques atteints de LAL-B R/R dont un tiers avaient déjà reçu des cellules CAR-T anti-CD19 commerciales (étude CARPALL, NCT02443831). Ces patients recevaient un traitement par cellules CAR-T co-transduites pour exprimées un CAR anti-CD19 et un CAR anti-CD22 (dual-CAR) (179). Parmi les 10/12 patients répondeurs, 5 ont rechuté (à un niveau moléculaire (n=2 ou cytologique (n=3)), mais il n'a pas été identifié de perte d'expression des antigènes ciblés (186).

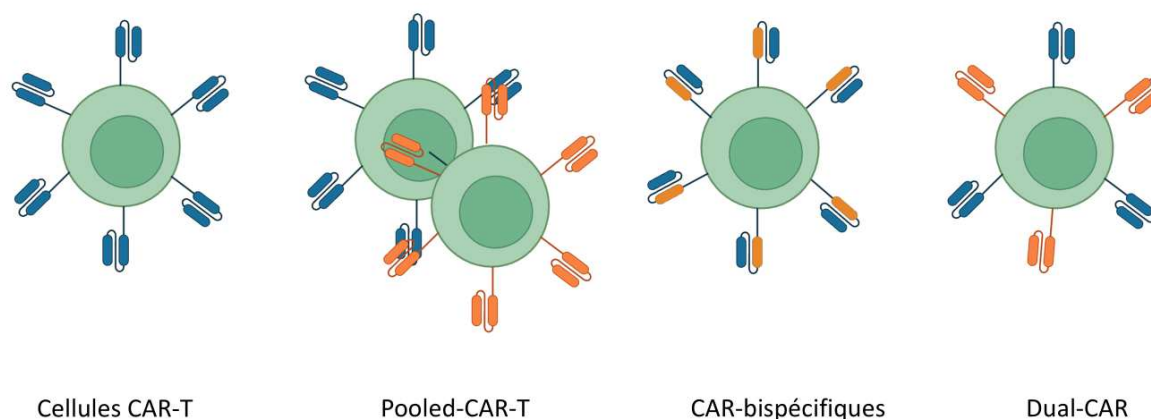


Figure 9 : Les différentes stratégies de double ciblage utilisant des cellules T équipées de CAR.
Adaptée de Ruella et al, Computational and Structural Biotechnology Journal, 2016 (183)

1.7.4.3. Multiciblage avec des Ac bispécifiques ou tri-spécifiques

Les Ac bi ou multi-spécifiques sont des protéines synthétiques dérivant des Ac capables de reconnaître soit des épitopes différents sur un même antigène, deux antigènes sur une même cellule (cis) ou deux antigènes sur deux cellules différentes (trans). Dans ce dernier cas, les Ac développés possèdent une spécificité contre un antigène présent sur les cellules tumorales et une soit contre les LT (anti-CD3 : BiTES) ou les cellules NK (anti-CD16, Bispecific Killer Cell Engagers (BiKes)). Ces Ac bi-spécifiques permettant ainsi de recruter et d'activer des cellules immunitaires du patient directement au contact des cellules tumorales.

De nombreux formats d'Ac bi-spécifiques (BsAb) ou multi-spécifiques ont été développés et sont présentés dans la figure 10 ci-dessous. Les différents formats d'Ac bi ou multi-spécifiques ont des modes d'actions différents selon notamment la présence ou non d'une région Fc qui est indispensable pour le déclenchement de 3 activités :

- L'activation de la voie classique du complément après fixation du C1q (CDC),
- Le recrutement et l'activation d'effecteurs cellulaires (NK, monocytes, macrophages, granulocytes neutrophiles...) exprimant des récepteurs au fragment Fc des immunoglobulines et capables d'exercer une cytotoxicité cellulaire dépendante des Ac (ADCC),
- Phagocytose à médiation cellulaire dépendante des Ac (ADCP)

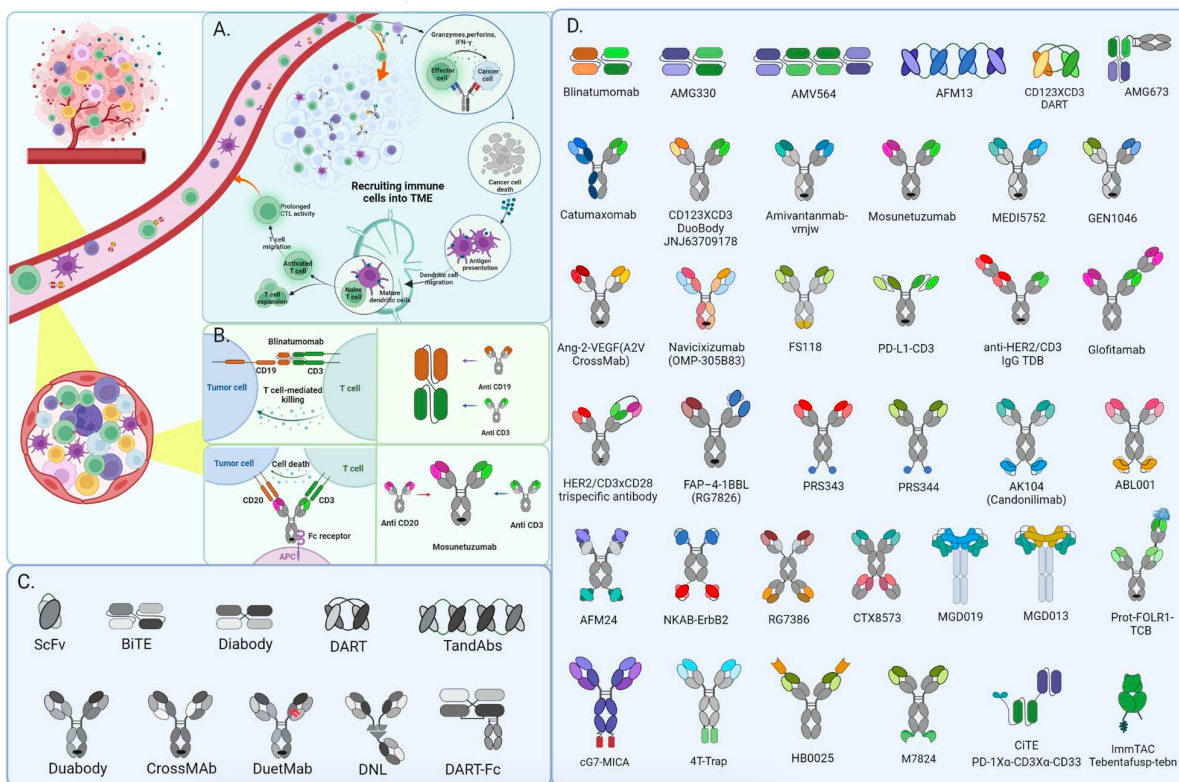


Figure 10: mécanisme d'action des BsAbs dans les tumeurs solides (A) et les hémopathies malignes (B). Différents formats d'Ac bi-spécifiques (C) architectures de BsAbs en développement ou en clinique (D) (187)

Des Ac tri-spécifiques ciblant deux antigènes de la tumeur et soit les LT ou NK ont également été développés tels que anti-CD19-CD22-CD3 (188), anti-CD16-CD33-CD19 (189), anti-CD16-CD123-CD33 (190) et ont montré une efficacité anti-leucémique sur des modèles de xénogreffe de LAL-B issues de patients, ou *in vitro* sur des lignées humaines ou des cellules primaires issues de leucémies aigües myéloblastiques (LAM).

L'immunothérapie reposant sur les Ac présente plusieurs avantages par rapport au transfert adoptif de cellules immunitaires. En effet, même si la conception et la production de ces Ac est complexe, elle reste cependant moins lourde que la sélection et modification génétique de cellules issues de patients. Les lots d'Ac sont produits pour plusieurs patients et donc directement disponibles contrairement aux cellules qui nécessitent un délai de fabrication. Par ailleurs, les coûts de traitement avec les Ac sont et seront aussi de ce fait toujours moins importants. Cependant, contrairement à l'injection de lymphocytes directement cytotoxiques chez le patient, l'activité anti-

tumorale des Ac qui repose sur les activités CDC, ADCC ou ADCP ou l'activation de LT-CD3 ou NK du patient peut être limitée en raison d'un affaiblissement de ces fonctions en raison de la maladie ou des lignes de traitements reçues précédemment.

Ainsi, les thérapies ciblées (Ac monoclonaux, ou cellules CAR-T) ont révolutionné la prise en charge des LAL-B réfractaires. Cependant, la pression thérapeutique reposant sur la reconnaissance d'un seul antigène, induit la sélection de clones, initialement minoritaires, n'exprimant pas la cible antigénique, et abouti à l'émergence de rechutes de pronostic très défavorable. La reconnaissance de plusieurs antigènes tumoraux simultanément pourrait permettre de limiter cet échappement tumoral. Les stratégies de ciblage multiple reposant sur des cellules T équipées de récepteurs CAR ont montré une efficacité dans quelques études cliniques de phase I, cependant, le nombre d'antigènes ciblés reste limité, et le risque d'échappement tumoral par modulation antigénique persiste.

1.7.4.4. CAR « Universels » ou CAR modulables et récepteurs universels :

Les CAR qualifiés d'« universels » ou modulables (modCAR) sont des récepteurs chimériques qui ne reconnaissent pas directement l'antigène cible, mais peuvent fixer des molécules adaptatrices (adaptateurs), capables de lier spécifiquement à l'antigène. Ainsi, l'activité des lymphocytes CAR universels est strictement dépendante de la présence des adaptateurs, indispensables à la formation d'une synapse immunologique. Par conséquent, la formation de la synapse dépend des caractéristiques de l'adaptateur : son affinité pour l'antigène, son affinité pour la partie extracellulaire du CAR, sa demi-vie, ainsi que sa biodistribution. En choisissant des adaptateurs appropriés en fonction de leur demi-vie, de leur biodistribution et de leur antigène cible, il est possible de réguler et d'adapter étroitement l'activité des cellules T-CAR universel. En clinique, la possibilité de titrer les adaptateurs pourrait ainsi permettre d'activer ou de désactiver individuellement l'activité des cellules CAR-T sans qu'il soit nécessaire de les éliminer. Ainsi, les effets secondaires de ces cellules-T CAR « universels » pourraient être atténués plus rapidement que sur les cellules CAR-T conventionnels et la thérapie pourrait être poursuivie avec un nouveau dosage de l'adaptateur ou un adaptateur de spécificité antigénique différent.

Les molécules adaptatrices qui ont été développées sont des Ac monoclonaux, des fragments d'Ac, des petites molécules ou des structures capables de cibler au moins un antigène et comportant un élément (naturel ou ajouté) pouvant être reconnu par les cellules T exprimant le CAR « universel » (Figure 11).

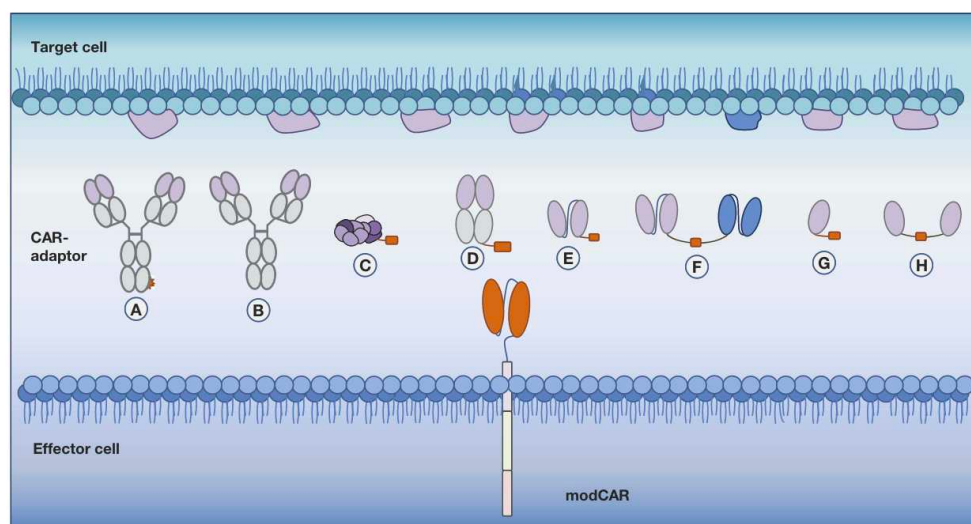


Figure 11 : Représentation de 8 molécules adaptatrices capables de reconnaître un ou deux antigènes à la surface de la cellule tumorale et comportant un élément ou tag (naturel ou ajouté par génie génétique, en orange sur le schéma) pouvant être reconnu par les cellules T exprimant le CAR « universel » ou CAR modulable (modCAR) : (a) mAbs-tag, (b) mAb, (c) petite molécule-tag (d) Fab-tag | (e) scFv-tag | (f) bispecific-scFv-tag | (g) nanobody-tag | (h) bivalent nanobody-based tag (191).

Le développement de CAR « Universels » a débuté à partir de 2012 en utilisant des adaptateurs complexes. Cependant, en tirant partie des Ac monoclonaux qui étaient utilisés en clinique (le rituximab et le trastuzumab (anti-HER-2)) et des données démontrant le rôle important de l'ADCC médiée par les cellules NK CD16+ dans l'efficacité antitumorale, les Ac monoclonaux ont pu être utilisés bien plus tôt comme les premiers adaptateurs.

1.7.4.4.1. Utilisation du récepteur de faible affinité pour le Fc des Ig (CD16) :

Ainsi dès 2006, mon équipe décrivait, pour la première fois, une stratégie de transfert adoptif de LT génétiquement modifiés pour leur conférer une activité ADCC en les équipant de la partie extracellulaire du récepteur de faible affinité pour le fragment cristallisable (Fc) des immunoglobulines G (CD16a/FcγRIIIa) relié à la chaîne transductrice FcεR1γ (192). Cette approche qui visait initialement à amplifier l'ADCC chez les patients traités par Ac monoclonaux, mais qui permet également de cibler

plusieurs antigènes simultanément sera développée dans la deuxième partie de cette introduction (**voir partie 2**).

1.7.4.4.2. Utilisation de récepteurs spécifiques et d'Ac tagués :

Dès 2012, à l'université de Pennsylvanie, une équipe développait un récepteur à la biotin (BBIR) comprenant un scFv anti-avidine, ainsi que les domaines intracellulaires CD3 ζ seul ou CD28 et CD3 ζ . Après transduction lentivirale de LT, les LT-BBIR ainsi produits s'activaient *in vitro* en présence de cellules cibles (lignées cellulaires de cancer ovarien et de mésothéliome) et d'Ac biotinylés spécifiques des antigènes ciblés. Les LT-BBIR couplés à l'utilisation d'un Ac biotinylé anti-EpCam1 limitait également la croissance tumorale dans un modèle préclinique de cancer ovarien (193).

En 2020, sur le même principe, une équipe Allemande présente la construction d'un « adapter CAR » ou AdCAR comprenant un domaine de reconnaissance d'un néo-épitope de la biotin endogène (dérivé de l'Ac mBio3), associé à un domaine hinge, un domaine transmembranaire (CD8) et des domaines de co-stimulation CD28 et CD3 ζ . Après transduction lentivirale de la lignée NK-92, la lignée NK-92-AdCAR⁺ a été obtenue et des Ac biotinylés ont également produits pour servir de molécules adaptatrices (LLE-Ac). Ces cellules combinées avec des Ac biotinylés spécifiques d'antigène, permettaient d'induire une lyse de lignées cellulaires tumorales, ou issues d'hémopathie lymphoïdes B primaires (194).

Cette technologie AdCAR a ensuite été transférée sur des LT. Ces adaptater CAR-T (AdCAR-T), combinés avec des Ac biotinylés induisaient une lyse tumorale spécifique de lignées cellulaires de leucémie, lymphome B, neuroblastomes et de cancer du sein. La combinaison AdCAR-T et LLE-rituximab montrait également une efficacité sur un modèle préclinique de lymphome de Burkitt (195). Cette même équipe a ensuite exploré des stratégies de ciblage multiple sur des lignées cellulaire de LAL ou lymphomes B avec des Ac LLE anti-CD19, CD20, 79B, ROR1, CD10 et CD276. La combinaison LLE-anti-CD19 et LLE-anti-CD20 associée aux ad-CAR-T permettait d'obtenir une lyse des cellules cibles même lorsque celles-ci n'exprimaient pas le CD19. Sur des cellules cibles CD19⁺, la lyse cellulaire observée était semblable à celle obtenue avec des cellules CAR-T anti-CD19, et il n'y avait pas d'effet synergique en ciblant les deux antigènes CD19 et CD20 simultanément. Par ailleurs, la technologie AdCAR-T permettait de cibler une grande variabilité d'antigènes puisqu'une lyse significative était observée en utilisant des Ac LLE-anti-CD19, CD20, 79B, ROR1, CD10 et CD276 (lyse

observée entre 70 et 100% sur une lignée Jeko-1, et entre 10 et 70% sur une lignée Raji). Cependant, de nouveau, aucun effet synergique n'était mis en évidence lors de l'utilisation des Acs en combinaison (196).

En 2016, M. Cartellieri développait des LT exprimant un récepteur chimérique comprenant le scFv anti-La5B9 reconnaissant une séquence de 10 acides-aminés (le tag 5B9). Ces LT-UniCAR ont montré une activité cytotoxique *in vitro*, en combinaison avec des Ac anti-CD33 ou anti-CD123 tagués, sur des lignées cellulaires de leucémies aiguës myéloblastiques et sur des modèles précliniques de leucémies aiguës myéloblastiques. Dans cette étude, le ciblage des deux antigènes CD33 et CD123 simultanément, aboutissait à une lyse plus importante, que leur ciblage séquentiel (197).

D'autres équipes ont également conçus des LT-CAR modulables (switch-CAR), ou des LT-FITC capables de reconnaître le néo épitope d'un Ac modifiés, ou d'Ac thérapeutiques couplés à la molécule FITC, et ayant une efficacité anti-tumorale sur des modèles préclinique d'hémopathies lymphoïdes B, de cancers coliques ou de cancer du pancréas (198,199).

1.7.4.4.3. Technologie Leucine zipper (SUPRA CAR ou ZipCAR) :

En 2018, à Boston, un récepteur CAR dit « universel » reposant sur le système leucine-zipper a été développé. Le récepteur chimérique construit était une protéine de fusion comprenant un domaine extra-cellulaire de type leucine-zipper, un hinge (CD8) et des domaines de signalisation intra-cellulaire CD28, 4-1BB et CD3 ζ . Ce ZipCAR était capable de reconnaître une molécule zipFv comprenant un scFv anti-mésothéline, ou anti-Her2, ou anti-Axl, relié à un domaine leucine-zipper par un linker de 35 acides-aminés de type serine/glycine. Les LT étaient ensuite modifiés par transduction lentivirale pour exprimer le récepteur ZipCAR, et utilisés, ensuite, en combinaison avec des concentrations variable de ZipFv. Ces LT-ZipCAR ont montré une efficacité *in vitro* sur des lignées de leucémies aiguës myéloblastiques exprimant la mésothéline, Her2 ou Axl, ainsi que sur des modèles pré-clinique de cancers mammaires ou ovariens (200). Ce système permet à la fois de cibler plusieurs antigènes tumoraux, simultanément, ou de façon séquentielle, mais également de moduler finement l'activation des LT-ZipCAR selon la configuration du domaine leucine-zipper ou en utilisant des molécules ZipFv compétitrices, sans spécificité de reconnaissance (201).

La Figure 12 présente 3 différentes constructions de CAR « Universels »

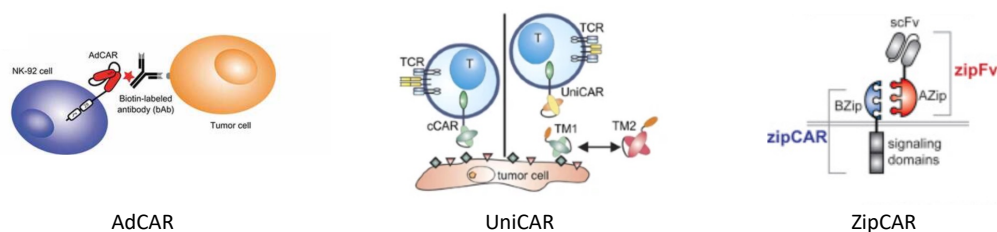


Figure 12 : Trois stratégies CAR « Universel » : AdCAR (194), Uni-CAR (197) et ZipCAR (ou SuppraCAR) (200).

Le tableau 3 ci-dessous présentent les différentes technologies de CAR modulaires ou « Universels » développés actuellement. Les différents types de CAR « universel » exprimés à la surface des LT sont listé ainsi que les molécules adaptatrices qui leur sont associées.

Différents formats de CAR « universels » ont été ou sont évalués dans le cadre d'essais cliniques pour leur efficacité et leur sécurité dans le traitement de différents types de cancers. Les adaptateurs utilisés sont différents (cf tableau 3) et présentent des tailles, des propriétés pharmacocinétiques et pharmacodynamiques différentes. De ce fait, leur dosage peut être nettement inférieur (10 à 1 000 fois) au dosage des Ac monoclonaux IgG1 thérapeutiques comme le rituximab et le cétuximab.

Dans l'essai clinique ATTCK-20-03 (NCT03189836), les LT CD16-4-1BB-CD3zeta (ACTR707) ont été utilisés en conjonction avec le rituximab à 375 mg/m² pour le traitement du lymphome à cellules B CD20+ récidivant ou réfractaire. Les patients ont obtenu un taux de rémission complète de 50 % (3/6) avec un profil de toxicité acceptable (213). Au cours du suivi, 56% (14/25) des patients ont répondu au traitement et 40% (10/25) ont obtenu une rémission complète. Bien que l'essai ait été interrompu en raison d'un événement indésirable (neutropénie) il sert de preuve de concept pour la thérapie CAR basée sur l'ACTR (214)

Tableau 3 : Expérience clinique avec les technologies CAR « Universels » (192,193,195,197–200,202–212)

Type de CAR « universel ou modulables »	Types de molécules adaptatrices	Références
	Ac IgG	
CD16 CD32 CD64	Fc d'IgG	Clemenceau, B et al 2006 Kudo, K et al, 2014 Ochi et al 2014
scFv anti-LALAPG	Fc LALAPG (P329G substitution)	Stock S, et al (2022)
scFv anti-La (5B9)	Ac avec La/SS-B (protéine nucléaire)	Cartellieri M, et al 2015 Wermke M, et al 2023
(UniCAR)		
	Conjugué chimique	
scFv anti-FITC	molécule ou Ac-FITC	Tamada K, et al 2012
monomeric streptavidin 2 (mSA2)	EZ-link NHS biotin	Lohmueller JJ et al 2017
dimeric avidin	EZ-link NHS biotin	Urbanska et al 2012
scFv anti-LLE	EZ-link NHS-LC-LCbiotin (LLE)	Seitz CM, et al 2021
(AdCAR)		
	Peptide tagué (tag)	
scFv anti-GNC4	GNC4 transcription factor	Rodgers DT, et al 2016
d-domain	neo-peptide	Edwards JP, et al 2024
	Protéine-tag	
scFv anti-CD19	CD19-ECD-scFv anti-CD20	Rennert P, et al 2019
	Dimerizing domains	
B-ZIP	leucin zipper- ScFv anti-X	Cho JH et al 2018
(SUPRA ou ZIP CAR)		
	Covalent binding	
SpyCatcher	SpyTag	Minutolo NG, et al 2020
DNA methyltransferase (MGMT)	O6-benzylguanine (BG)	Ruffo E, et al 2023
	Bispecific antibody	
folate receptor alpha (FR α)	bispecific antibody (FR α x target antigen)	Urbanska K, et al 2014
EGFRvIII	bispecific antibody (EGFRvIII x target antigen)	Karches CH, et al 2019
scFv-anti-X with(GGGGS) _n or (G ₄ S) _n linker	bispecific antibody (scFv anti-G4S x target antigen)	Borrok MJ, et al. 2022

Le système sCAR à base de peptides (dérivé du facteur de transcription GCN4 de la levure) est actuellement évalué chez des patients atteints de tumeurs malignes à cellules B récurrentes/réfractaires (NCT04450069). Les premières données chez l'homme concernant deux patients atteints de lymphome folliculaire et un patient atteint de lymphome à cellules du manteau, qui ont reçu 140×10^6 cellules CAR+ en conjonction avec 10 µg/kg/jour de SWI019, un fragment Fab monomérique ciblant le CD19 utilisé comme molécule adaptatrice. Deux patients ont obtenu une réponse complète selon les critères de Lugano. La toxicité neurologique aiguë (ICANS), a été contrôlée avec succès avec de la dexaméthasone et en réduisant la dose de SWI019 à 5 µg/kg (215).

Un autre système CAR adaptateur basé sur un peptide (UniCAR, dérivé de l'autoantigène nucléaire La/SS-B) est en cours d'essai clinique chez des patients atteints d'hémopathies malignes (NCT04230265). Les premiers patients traités pour une LAM récurrente/réfractaire ont reçu 100 ou 250×10^6 cellules CAR+ avec 0,5 ou 1 mg/jour de TM123, une molécule adaptatrice à base de scFv ciblant le CD123 (216). Le rapport de suivi incluant les 19 premiers patients traités, rapportait un taux d'obtention de rémission chez 8 des 15 patients traités pour une LAM réfractaire (maladie cytologique) (53%) et chez 3 des 4 patients inclus avec une rechute moléculaire (75%) (3/4) (211).

La technologie CAR IBI345, qui utilise des Ac dont le Fc a une substitution P329G, est utilisée pour le traitement des tumeurs positives à la claudine 18.2 (CLDN18.2), y compris les cancers de la jonction œsophago-gastrique, de l'estomac et du pancréas (NCT05199519). Les patients incluent recevaient $50\text{-}250 \times 10^6$ cellules CAR+ plus 1 mg/kg/jour d'IgG1. L'efficacité clinique était cependant limitée (217).

Une autre technologie prometteuse en cours d'évaluation clinique est le système CAR adaptateur basé sur les domaines (SparX) pour le traitement du myélome multiple (NCT04155749) et de la LAM (NCT05457010). Les molécules adaptatrices sont basées sur le domaine d et ciblent le BCMA dans le myélome multiple et le CD123 dans la LAM (205).

Ces CAR « universels » avaient été initialement développés dans le but diminuer la toxicité des CAR conventionnels. Les essais cliniques semblent en effet démontrer une réduction de toxicité après arrêt de l'administration des molécules adaptatrices. Cependant, ces CAR « universels » n'ont pas

encore été évalués pour leur capacité de muticiblage dans l'objectif de diminuer les rechutes par modulation antigénique.

Quel que soit la stratégie de ciblage multiple envisagée, l'identification de nouveaux antigènes d'intérêt à la surface des LAL-B est nécessaire. En utilisant des Ac spécifiques d'antigènes d'intérêt préalablement sélectionnés, et l'activité ADCC, notre l'objectif était de déterminer si le ciblage de ces antigènes permettait ou non une lyse des LAL-B. L'utilisation d'Ac et de LT équipés d'un CAR universel naturel : le CD16, permet une l'analyse large et flexible de nombreux antigènes. Elle est plus facile et moins coûteuse puisqu'elle ne nécessite pas la construction d'un CAR conventionnel pour chaque antigène à tester.

Dans ce manuscrit, nous avons fait le choix de nous concentrer sur l'activité ADCC et de présenter les dernières données de compréhension moléculaires et cellulaires décrites sur cette activité.

L'identification de cibles antigéniques d'intérêt dans les LAL-B pédiatriques et l'analyse de leur sensibilité à la lyse cellulaire a donc fait l'objet de l'Axe 1 de mes travaux de recherche, à travers :

- **Le projet LAL-TAL : identification de nouvelles cibles antigéniques d'intérêt dans les LAL-B pédiatriques**
- **L'analyse de l'intérêt de la cible Her2 dans les LAL-B (lyse cellulaire induite via un récepteur CAR ou par ADCC) – Travail de recherche de Master 2 de Baptiste Le Calvez que j'ai co-encadré avec Béatrice Clémenceau**
- **L'analyse du phénotype et de la sensibilité à la lyse cellulaire, induite par différentes modalités de reconnaissance (TCR, CAR, ADCC) de rechutes successives d'une même LAL-B**

2. La cytotoxicité cellulaire dépendante des Ac (ADCC) médiée par le FcγRIIIa

2.1. Acteurs et mécanismes

L'ADCC, décrite initialement chez les lymphocytes natural killers (NK) est déclenchée par la formation d'une synapse immunologique entre une cellule cible, opsonisée par des IgG, et la cellule NK, via la reconnaissance du récepteur au fragment Fc des immunoglobulines par le FcγRIIIa (CD16a). L'ADCC aboutit à la libération de granules cytotoxiques contenant du Granzyme B et des perforines par la cellule effectrice, puis à la lyse de la cellule cible (218–220). Cette reconnaissance est indépendante du système HLA.

Le récepteur FcγRIIIa/CD16a est un récepteur de faible affinité pour les Ig, avec une affinité toutefois plus importante pour les IgG1 et les IgG3 (221). Il est codé par le gène *FCGR3A* localisé sur le bras long du chromosome 1 (1q23). Le gène *FCGR3A* codant ce récepteur présente un polymorphisme bi-allélique aboutissant à la présence d'une phénylalanine (F) ou d'une valine (V) en position 158 de la protéine (222,223). Ce polymorphisme définit donc 3 groupes d'individus de phénotype homozygotes FcγRIIIa-158F/F ou V/V et hétérozygote V/F, dont la répartition dans la population caucasienne est respectivement de 35 %, 15 % et 55 %. La cristallographie a montré que l'acide aminé en 158 est situé dans le site de liaison de l'IgG au FcγRIIIa. Les cellules NK n'exprimant que le FcγRIIIa-158V fixent davantage les IgG1 et IgG3 que les cellules n'exprimant que le FcγRIIIa-158F et les premières exercent une meilleure activité ADCC.

Le CD16a est un récepteur transmembranaire qui comprend une terminaison C-ter intracytoplasmique et deux domaines de reconnaissance extra-cellulaires (IgG-like). Le CD16a interagit avec la partie Fc des IgG, et notamment via des chaînes glycanes liées au NH₂, mais également avec la partie variable (Fab) des IgG (224,225). La proximité et la combinaison avec le CD38, ainsi que la reconnaissance des β-intégrines, présentes sur les cellules NK, par ICAM1 exprimé par les cellules cibles, agissent comme co-signal et favorisent l'ADCC (226,227). En l'absence d'expression d'ICAM1, les αv intégrines présentes à la surface de la cellule cible peuvent également être reconnues par les IgG (227).

Le CD16a ne possède pas de domaine de signalisation intra-cellulaire et fait donc appel à deux chaînes intracellulaires possédant des domaines ITAM (immunoreceptor tyrosin-based activation) pour la transduction du signal : CD3 ζ et Fc ϵ R1 γ (228–230). L'engagement du CD16a induit la phosphorylation des domaines ITAMs de CD3 ζ et/ou de Fc ϵ R1 γ , puis le recrutement de kinases parmi lesquelles Syk et ZAP-70. Le recrutement et l'activation des kinases intracellulaires est favorisé par l'existence d'une « plateforme » composée de récepteurs Fc γ R11a dimérisés (231). L'activation des voies de signalisation impliquant PI3K, aboutit à la libération de DAG et IP3. DAG active ensuite la famille des PKC et déclenche la dégranulation. IP3 induit un influx de calcium depuis le réticulum endoplasmique qui active également l'ADCC (232,233). Cette activation entraîne des modifications du cytosquelette, et notamment une polarisation des microtubules, permettant ainsi la libération des granules à un point précis. L'ouverture des granules à la surface cellulaire expose le CD107a à la surface (231). Le CD16 est ensuite rapidement internalisé ou clivé par ADAM17 et inactivé (234,235).

2.2. Amplification de la réponse ADCC chez les patients traités par Ac monoclonaux

Les Ac monoclonaux thérapeutiques et notamment le rituximab ont montré une grande efficacité dans le traitement des hémopathies lymphoïdes malignes *in vitro*, *in vivo* puis en clinique, permettant ainsi de réduire le recours aux chimiothérapies intensives, et donc de réduire la toxicité cumulée chez des patients présentant des maladies réfractaires (voir partie 1.6.4) (80,236). Le développement exponentiel des Ac monoclonaux, a fait appel à l'amélioration de cette approche thérapeutique : augmentation de la spécificité, réduction des effets secondaires et réduction du coût. Plusieurs stratégies pour augmenter l'activité ADCC ont été développées. Ces stratégies reposent sur la modification du Fc des Ac pour augmenter leur affinité pour les récepteurs Fc, ou l'activation ou bien le transfert adoptif de lymphocytes FcR+ en particulier cellules NK CD16⁺.

2.2.1. Modification des Ac monoclonaux :

La séquence d'acides aminés du fragment Fc des IgG a ainsi pu être modifiée afin d'augmenter leur affinité pour le CD16a et donc l'ADCC induite en pré-clinique (237,238). Une autre approche consiste à modifier le profil de glycosylation des chaînes glycanes liées au NH₂, et notamment le profil de glycosylation de l'acide aminé N297 situé dans le CH₂ du fragment Fc qui joue un rôle majeur dans l'interaction entre le Fc et les Fc γ R (239). L'afuscosylation de la chaîne N-glycane est également

associée à une augmentation de l'affinité de l'IgG pour le CD16a et à une augmentation de l'activité ADCC (240). La technologie GlymaxX®, entre autres, permet ainsi la production d'Ac afucosylés (241). Des Ac ainsi modifiés sont aujourd'hui utilisés en clinique (obinutuzumab, benralizumab, mogamulizumab) (241).

2.2.2. Utilisation des cytokines :

L'adjonction de cytokines telles que l'IL18 ou l'IL15 permettent d'amplifier la réponse ADCC *in vitro* ou *in vivo*. L'IL-18 est, en effet, associée à une activation plus importante des cellules NK, via le CD16a, *in vitro*. L'IL-18 augmente l'activité ADCC du rituximab contre une lignée cellulaire-B (Raji) CD20+ *in vitro* et *in vivo*.

Par ailleurs, l'utilisation de super-agonistes de l'IL-15 (protéine de fusion combinant l'IL-15 et son récepteur de forte affinité IL-15R α) est également associée à une augmentation du nombre de cellules NK en clinique, et une activité ADCC augmentée *in vitro* (242). D'autres études de phase I/II ont également utilisé ce superagoniste de l'IL15 et mis en évidence une augmentation de l'activation et de la dégranulation des cellules NK chez des patients atteints de pathologies malignes avancées (243,244). L'utilisation de cette protéine de fusion était également proposée dans une étude de phase I/II récente en association au daratumumab (Ac anti CD38) ou au rituximab dans le cadre du traitement de Lymphome non Hodgkinien ou de myelome multiple réfractaires (NCT04136756).

La **Figure 13** présente les 3 acteurs de l'ADCC médiée via le CD16a : lymphocytes (NK ou T) CD16⁺, le ou les Ac et la cellule opsonisée par l'Ac, les différents paramètres influençant son activité et les différentes stratégies développées pour amplifier cette activité ADCC.

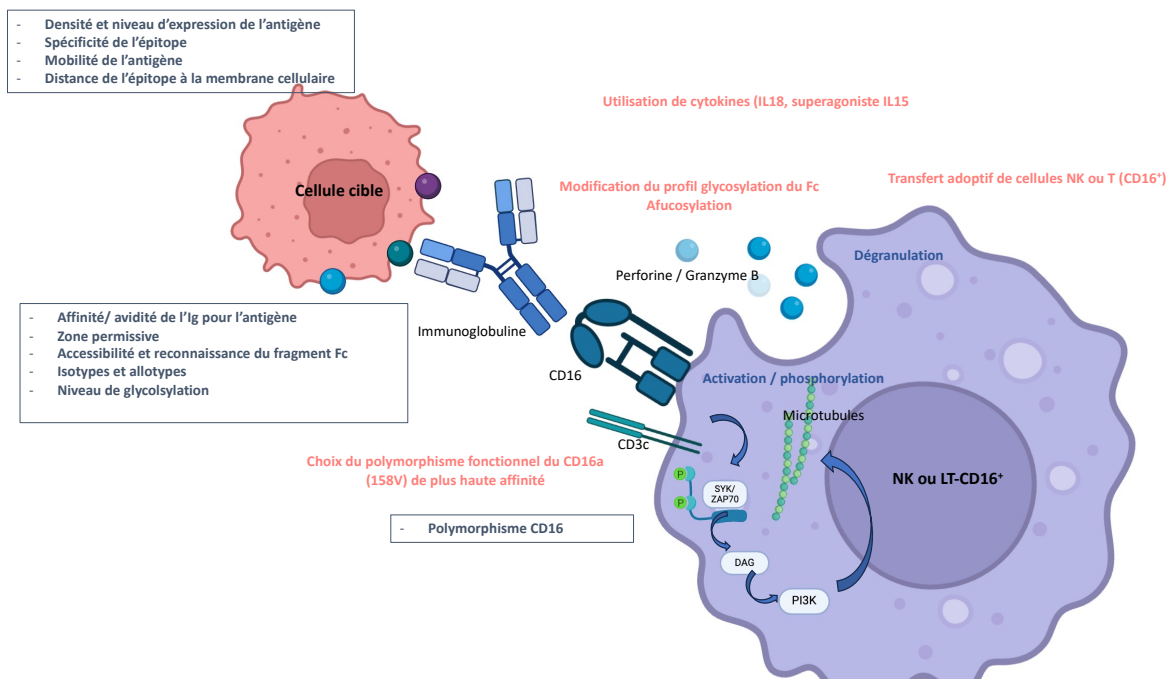


Figure 13 : les 3 acteurs de l'ADCC médiée via le CD16a : lymphocytes (NK ou T) CD16+, le ou les Ac et la cellule opsonisée par l'Ac, les différents paramètres influençant son activité sont listés dans les encadrés noirs et les différentes stratégies développées pour amplifier cette activité ADCC sont notifiées en rouge (218–220,222,229,239–241,243,245).

2.2.3. Transfert adoptif de cellules NK:

Plusieurs types cellulaires des systèmes immunitaires inné ou adaptatif expriment le CD16 à leur surface (monocytes, neutrophiles, NK, et quelques rares LT). Cependant, la majeure partie de l'ADCC observée *in vitro* lors de l'utilisation d'Ac thérapeutiques (comme le rituximab) est attribuée aux lymphocytes NK (246). Les cellules NK sont ainsi apparues comme des éléments clés permettant d'agir sur le potentiel d'ADCC des patients traités par Ac monoclonaux pour des pathologies malignes (247).

Afin d'amplifier la réponse ADCC anti-tumorale chez les patients, certaines équipes ont exploré les possibilités d'amplification ou de sélection de cellules NK avant ré-injection au patient, avec ou sans traitement par Ac concomitant. Il a notamment été montré *in vitro* que la capacité d'ADCC des cellules NK, issues de patientes atteintes de cancer du sein, était conservée même après stimulation et mise en culture pendant plus d'un mois (248). L'amplification de NK primaires avant injection au patient a pu être développée dans de multiples indications tumorales, en situation allogénique (NK issues d'un donneur), ou autologue. Plusieurs stratégies d'édition du génome, ou de pré-activation

in vitro ont permis d'amplifier l'activité anti-tumorale naturelle des cellules NK. Par exemple, l'amplification *in vitro* de cellules NK memory-like, par l'utilisation de cytokines IL-12, IL-15, IL-18 et leur injection, dans des modèles pré-clinique ou lors d'études de phase I/II, a montré une efficacité anti-tumorale dans les LAM (249,250). L'équipe de D. Campana, a également mené une étude de phase II, incluant 22 patients, et proposant l'injection de cellules NK autologues (après amplification *in vitro*), couplée au Trastuzumab avec ou sans Bevacizumab, dans le cadre du traitement de cancer du sein Her2⁺. L'injection des cellules NK était bien tolérée. Six des 19 patients ayant reçu une dose cellulaire significative ont montré une stabilité de la maladie (251). Cette activité antitumorale efficace associée à l'absence d'effet allogénique, et une bonne tolérance clinique, font des cellules NK d'excellentes candidates pour des stratégie de thérapie cellulaire allogénique et donc disponible immédiatement (« off the shelf ») (252). Cependant, les difficultés de culture, le faible rendement après décongélation, et leur lenteur d'amplification *in vitro* (en comparaison aux LT), restent des défis à résoudre pour permettre une utilisation large de ces cellules NK en clinique (252,253).

2.2.4. Développement de cellules T capable d'ADCC :

Durant la même décennie, les thérapies cellulaires faisant appel au transfert adoptif de LT se sont développées de façon exponentielle. Par leur capacité d'amplification plus rapide, et le rendement plus important après modifications géniques (plus grande maniabilité), les LT sont encore aujourd'hui, plus largement utilisés que les cellules NK, en thérapie cellulaire.

L'expression du CD16 a été décrite chez les LT $\alpha\beta^+$ ou $\gamma\delta^+$ (228,254,255), et certain LT CD4⁺ exprimant le FC γ RI, et capable d'ADCC ont été identifiés parmi les LT infiltrant les tumeurs solides (256). Cependant, ces LT capables d'ADCC représentent une trop faible proportion des LT circulant pour permettre leur sélection et leur amplification à des fins thérapeutiques. Compte tenu de la meilleure expérience clinique d'utilisation des LT, du développement concomitant des Ac monoclonaux dont l'efficacité clinique repose sur l'ADCC ; mon équipe de recherche a développé dès 2004, des LT modifiés génétiquement pour exprimer le CD16, leur conférant ainsi des capacité d'ADCC (247).

Pour cela, un transgène chimérique codant pour la portion extracellulaire du Fc γ RIIIa (allotype V158) (Dr M. Ohresser and Dr H. Watier (EA 3853 Laboratoire d'Immunologie, Centre hospitalier Régional et Universitaire, Tours, France) et pour les portions extracellulaire, transmembranaire et

intracellulaire du Fc ϵ R1 γ (nucleotides 83 to 283, GenBank Accession No. BC033872) a été généré puis cloné dans un vecteur lentiviral LNT-sffv. Plusieurs clones cellulaires T : LT cytotoxiques (CTL) polyclonaux CD4⁺ anti-EBV, CTL monoclonaux CD4⁺ anti-HLA*DPB 04 :01 et CTL oligoclonaux CD8⁺ anti-pp65^{N9V} (anti-CMV) ont ainsi été transduits. Cinq jours après stimulation par de la Leuco-agglutinine (PHA-L) et de l'IL-2, les CTL sont remis en suspension dans le surnageant lentiviral, en l'absence de polybrene. Après infection les CTL CD16⁺ sont marquées puis triées en cytométrie de flux. L'efficacité de la transduction était de 1.4 à 22.4% avant sélection. Les CTL CD16⁺ sélectionnés exprimaient ensuite de façon stable le CD16. Ces CTL CD16⁺ montraient une activité ADCC (jusqu'à 60% de lyse spécifique), contre une lignée cellulaire B-EBV, lorsqu'ils étaient utilisés en combinaison avec des IgG humaines thérapeutique (Ab) anti-CD20 (rituximab) ou anti-Her2 (trastuzumab) (247).

Depuis, plusieurs autres équipes ont développés des LT capables d'ADCC. Une équipe Américaine, a ainsi conçu un récepteur chimérique comprenant : la partie extracellulaire du CD16a (phenotype 158 V/V), associée en intracellulaire au CD3 ζ . Les LT, modifiés par transduction lentivirale pour exprimer ce récepteur chimérique pouvaient être amplifiés *in vitro*. Ces LT-CD16⁺, avaient une activité anti-tumorale, lorsqu'ils étaient utilisés en combinaison avec un Ac anti-CD20 (rituximab), *in vitro* sur des cellules primaires de lymphome B, et *in vivo* dans des modèles précliniques de xénogreffe d'hémopathie lymphoïde B (204).

La même année, l'équipe de D. Campana a également développé des LT armés du Fc γ RIIIa. Les lymphocytes T issus de donneurs sains étaient modifiés par transduction rétrovirale, pour exprimer un récepteur chimérique comprenant le Fc γ RIIIa, le hinge CD8, puis un domaine transmembranaire et intracellulaire avec le CD3 ζ et le 4-1BB. Ces LT-CD16 ont montré une activité ADCC (activation, dégranulation) *in vitro* sur des lignées cellulaires de lymphome B (Daudi), des cellules primaires de leucémie lymphoïdes chronique, des cellules de cancer du sein ou gastrique Her2⁺, ou des cellules issues de neuroblastomes ou ostéosarcome GD2⁺, lorsqu'ils étaient combinés au rituximab (anti-CD20), au trastuzumab (anti-Her2) ou à un Ac anti-GD2, respectivement. *In vivo*, une activité anti-tumorale était également observée lorsque les LT-CD16⁺ étaient associés à un Ac thérapeutique, dans des modèles pré-clinique de neuroblastome et de lymphome B (203).

En 2018, une équipe Allemande, a développé des LT CD16-CAR, exprimant un récepteur chimérique comprenant le domaine extracellulaire du CD16 humain, dont 2 phénotypes différents ont été

utilisés : 48H/L et 158 V/F), associé au CD28 et au CD3 ζ en intra-cellulaire. Ces LT CD16-CAR⁺ ont montré une activité cytotoxique contre des cellules tumorales lorsqu'ils étaient utilisés en association avec des Ac humain anti-CD20 (rituximab), anti-EGFR (cetuximab), ou anti-GD2 (panitumumab). Cette activité cytotoxique était majorée lorsqu'ils étaient combinés à l'obinutuzumab (Ac anti-CD20 afucosylé) (257).

Enfin, plus récemment, une équipe Israélienne a modifié des LT murins et humains par transduction lentivirale afin qu'ils expriment des récepteurs chimériques comprenant le domaine extracellulaire Fc γ RI qui est un autre récepteur de faible affinité au fragment Fc des Ig (220,258). Plusieurs constructions ont été développées, selon les domaines intracellulaires utilisés (4-1BB, CD28, OX40, ou le domaine intracellulaire du Fc γ RI). Ces LT- Fc γ RI ont montré une activité cytotoxique antitumorale lorsqu'ils étaient utilisés en combinaison avec les Ac appropriés (258).

Ainsi, il est possible d'obtenir une réponse anti-tumorale, voire d'optimiser une réponse anti-tumorale en augmentant l'activité ADCC obtenue spontanément ou lors du traitement par Ac monoclonal. La conception de cellules T (plus maniables, et facilement amplifiables) exprimant le CD16, est une stratégie de thérapie cellulaire pouvant permettre la reconnaissance d'antigène tumoraux multiples et variables selon les Ac avec lesquels ces cellules sont combinées.

2.3. Choisir la cible antigénique pour l'ADCC

2.3.1. Impact du choix de l'antigène sur l'ADCC et contraintes géométriques

Plusieurs facteurs liés à l'antigène ciblé semblent impacter l'activité de lyse cellulaire induite par sa reconnaissance. Ainsi, la taille de l'antigène ciblé, sa mobilité, ou sa densité à la surface de la cellule cible semblent avoir un impact sur l'activité cytolytique induite.

Tout d'abord, le niveau d'expression de certains antigènes (CD20, Her2) a ainsi été positivement corrélée à l'activité cytotoxique médiée par le complément (CDC) dans des études pré-cliniques (259–261). De même, l'ADCC semble également impactée par le degré d'affinité des Ac et également la densité d'expression de l'antigène ciblé (262).

Par ailleurs, l'épitope reconnu par l'Ac à la surface d'une cellule cible semble également impacter la lyse cellulaire des cellules infectées, ou cancéreuses. Ainsi, différents niveaux d'ADCC ont été observés en utilisant des Ac anti-influenza dont les degrés de spécificité de l'épitope sur la protéine hémagglutinine étaient différents (263). De même, le trastuzumab et le pertuzumab, tous deux dirigés contre la cible Her2, mais ayant des épitopes différents, induisent une lyse tumorale médiée par CDC d'intensité différente (264,265).

Par ailleurs, l'ADCC nécessite la fixation de l'Ac sur l'épitope cible, mais également la reconnaissance du fragment Fc par le FcγRIIIa. Toutes ces liaisons doivent souscrire à certaines contraintes géométriques. Ainsi, l'existence d'une zone permissive entre la cellule cible et la cellule effectrice impacte l'ADCC obtenue en permettant ou non la fixation de l'Ac. La distance entre l'épitope reconnu et la membrane de la cellule cible, apparaît également comme un facteur impactant l'activité cytolytique induite. Ainsi, la fixation de l'Ac anti-CD20 (rituximab) induit une activité CDC et une ADCC plus importante, lorsque son site de fixation est à proximité de la membrane cellulaire de la cellule cible (266). Une activité cytotoxique plus importante, liée à la reconnaissance d'un épitope proche de la membrane de la cellule cible a également été mise en évidence dans les maladies infectieuses (Ebola, Virus d'Immunodéficience Humaine VIH) (267,268) ou en comparant différentes constructions de CAR anti-CD22 (177). La densité de l'antigène à la surface de la cellule cible doit également être suffisante pour permettre la dimérisation des fragments FcγRIIIa (231). Il est intéressant de noter que la plupart des antigènes ciblés par les immunothérapies anti-cancéreuses utilisées en cliniques à ce jour, sont des antigènes fortement exprimés par les cellules cibles, de petite taille ou ayant un domaine extra-cellulaire court (CD20, CD52), ou bien un site de fixation proche de la membrane (Her2) (266).

Enfin la liaison du FcγRIIIa au fragment Fc de l'Ac impacte également l'activité ADCC induite. Ainsi, en fonction de l'épitope reconnu, et de l'accessibilité secondaire au fragment Fc, l'activité ADCC induite pourrait être plus faible, comme cela a pu être montré dans la réponse au VIH (231,269). La Figure 14 schématise les contraintes géométriques relatives à la fixation de l'Ac sur l'antigène ayant un impact sur l'activité ADCC induite.

Ainsi, la sélection d'une cible d'intérêt pourrait être divisée en deux étapes : la sélection d'un antigène tumoral relevant, puis la sélection du meilleur épitope sur cet antigène spécifique.

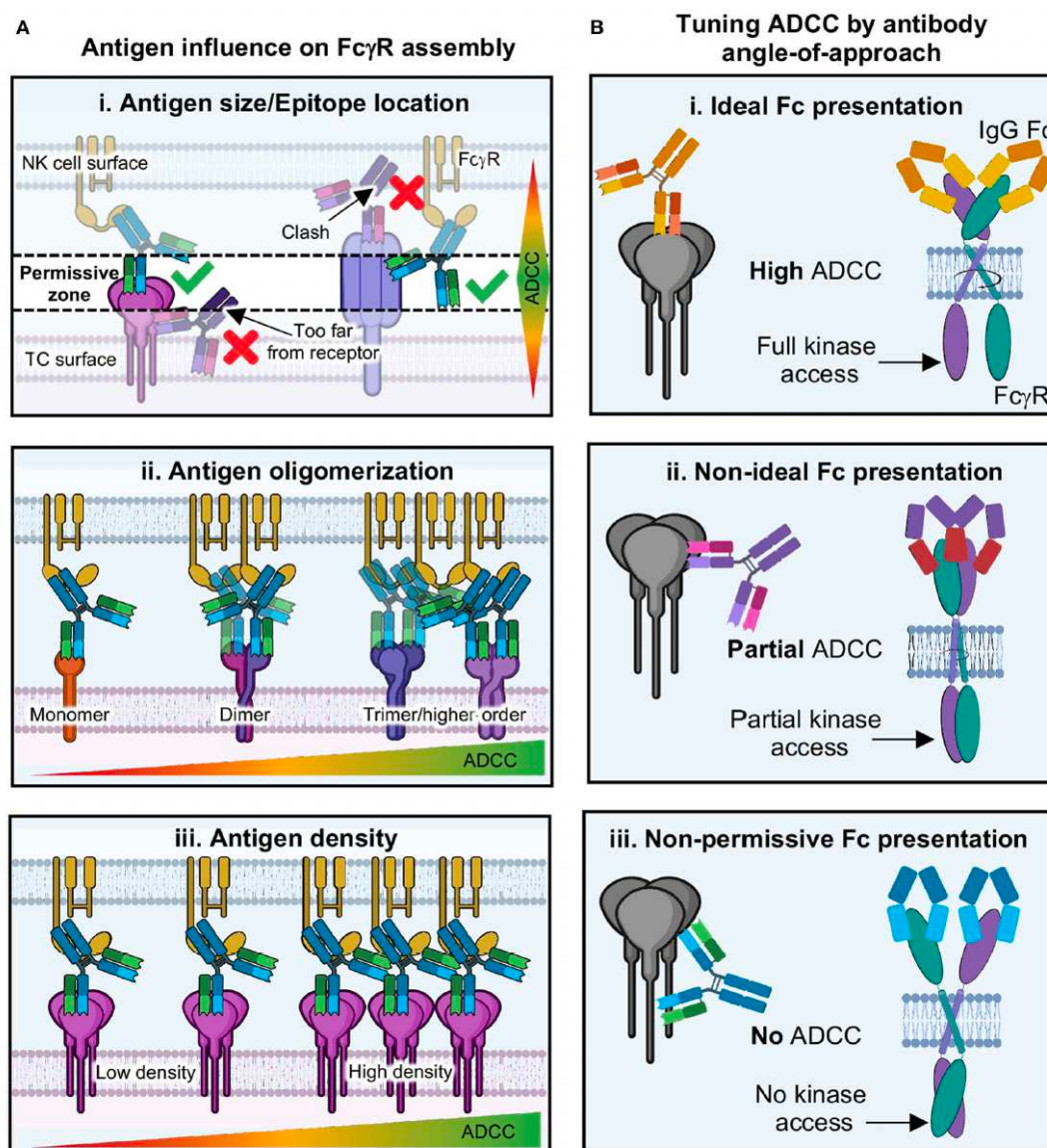


Figure 14 : Contraintes géométriques relatives à la fixation de l'Ac sur l'antigène impactant l'activité ADCC induite (231).

2.3.2. Screening et intérêt des Ac murins

Dans une démarche d'identification de nouvelle cible antigénique, il paraissait intéressant de pouvoir analyser l'activité ADCC obtenue ciblant de multiples antigènes, et plus ou moins, de multiples épitopes au sein d'un même antigène. L'utilisation d'Ac monoclonaux murins (mAc) qui sont largement et facilement accessibles, permet d'analyser facilement l'ADCC obtenue en ciblant de multiples antigènes différents. La conception de LT cytotoxiques humains capables de reconnaître des mAc via le récepteur FcγRIIIa murin, et induisant une activité ADCC via le FcεRIγ apparaissait donc ici comme un outil essentiel.

En 2013, mon équipe de recherche a ainsi construit des LT-mCD16 par transduction rétro-virale. L'ADN codant pour le FcγRIII murin (domaine extra-cellulaire) lié au FcεRIγ humain (nucléotides 83 to 283) a été synthétisé, puis transfecté dans des lignées cellulaires Phoenix (Figure 15). Les particules rétrovirales ainsi produites ont été initialement utilisées pour la transfection de cellules NK-92 humaines (NK-92^{mCD16}). Ces cellules NK-92^{mCD16} étaient ainsi capables d'ADCC sur une lignée cellulaire B-EBV humaine en présence d'Ac anti-CD20 murin ou sur des lignées cellulaires de carcinome de Merkel en présence d'Ac murins spécifiques (270). Cette lignée cellulaire NK92-mCD16 a ensuite été largement utilisée dans des analyses d'activité ADCC visant à identifier de nouvelles cibles antigéniques ou de nouveau Ac à visée thérapeutique (271,272). Des LT-CD8+ oligoclonaux et des LT-CD8+ anti-HLA A2pp65^{N9V} sélectionnés puis amplifiés à partir de cellules sanguines mononuclées issues de donneurs sains séropositifs pour le CMV, ont été ensuite transfectés de façon similaire, afin d'exprimer ce même récepteur chimérique FcγRIII murin- FcεRIγ humain.

Ces outils cellulaires (LT-mCD16), ont été utilisés dans le cadre de mes travaux de recherche (Axe 1) pour identifier sur des LAL-B des antigènes membranaires ou combinaisons d'antigènes dont le ciblage par des Ac et des LT mCD16 induirait la lyse des LAL-B par ADCC.

Cependant, puisque l'ADCC dépend également de l'épitope ciblé au sein d'une même molécule, et afin d'identifier de potentiel antigènes d'intérêt, il pourrait être intéressant d'utiliser des Ac murins polyclonaux. En effet, en se liant à différents épitopes sur un même antigène, les Ac polyclonaux pourraient permettre une analyse plus large des cibles potentielles, qu'en utilisant des Ac monoclonaux.

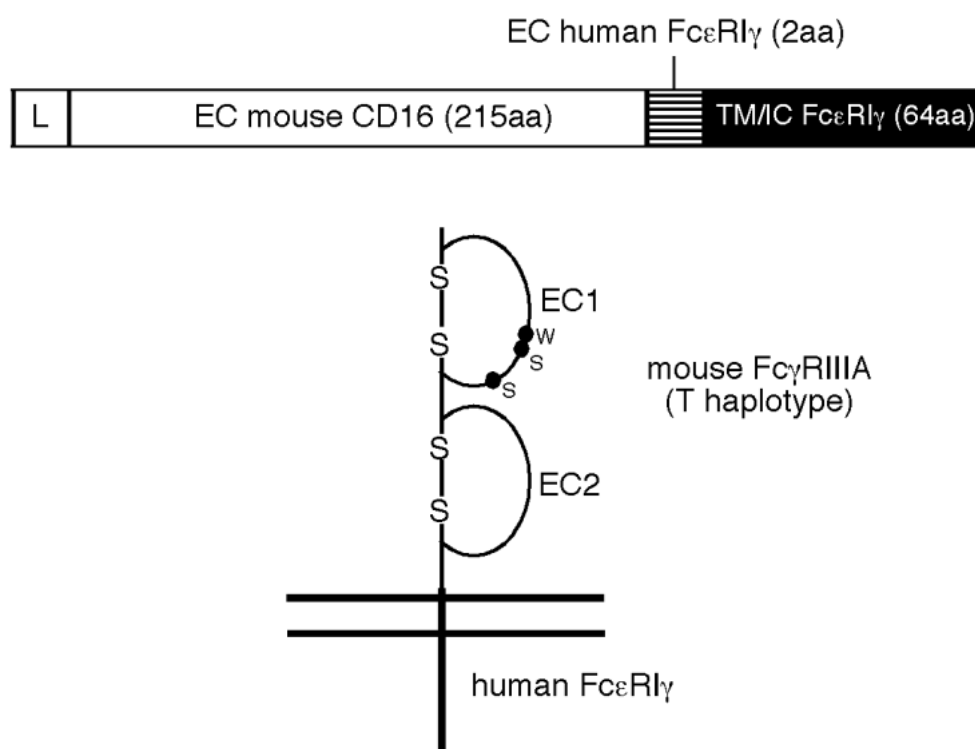


Figure 15 : Représentation schématique de la molécule chimérique comprenant le segment extracellulaire FcγRIIIa murin et les segments transmembranaires et intracellulaire du FcεRIγ humain (270).

3. Introduction aux travaux de recherche :

Les LAL-B pédiatriques en rechute ou réfractaires sont donc associées à un pronostic très péjoratif. Les immunothérapies actuellement utilisées, et notamment les cellules CAR-T anti-CD19 - Tisacel® ont révolutionné la prise en charge de ces LAL-B de haut-risque. Cependant, plusieurs questions émergent après près de 10 ans de leur utilisation en clinique :

- 1) Malgré l'obtention d'excellents taux de réponse précoces, des rechutes de LAL-B apparaissent, et ce malgré la persistance de cellules CAR-T anti-CD19 chez le patient. La pression thérapeutique sur une seule cible antigénique induit en effet la sélection de sous-clones n'exprimant pas l'antigène ciblé. Il apparaît donc nécessaire de cibler plusieurs antigènes simultanément afin de limiter cet échappement tumoral. Pour cela il est urgent d'identifier de nouvelles cibles antigéniques d'intérêt, et de définir des stratégies de ciblage multiple, idéalement modulables en fonction du phénotype de chaque LAL-B.

Le premier axe de mes travaux de recherche a ainsi porté sur l'identification de nouvelles cibles antigéniques d'intérêt dans les LAL-B pédiatriques, à travers :

- Une analyse du phénotype étendu de LAL-B primaires
- L'analyse de la sensibilité à la lyse cellulaire induite par la reconnaissance des antigènes sélectionnés, par des Acs monoclonaux et *via* l'ADCC. Pour cela des LT-CD16⁺ développés dans l'équipe, capables d'ADCC, ont été utilisés.
- Mais également l'analyse de la lyse induite *via* différentes modalités de reconnaissance d'un même antigène (exemple de la cible Her2)
- Et enfin l'analyse de la sensibilité la lyse induite selon différentes modalités de reconnaissance sur des rechutes successives d'une même LAL-B primaire (issues d'un même patient), dont une rechute CD19⁺ post-traitement par cellules CAR-T anti-CD19

- 2) La persistance des cellules CAR-T anti-CD19 au long court chez les patients induit par ailleurs, une aplasie B (lymphopénie B profonde) prolongée. A ce jour, peu d'études ont pu analyser l'impact de cette aplasie B prolongée en termes d'immunité résiduelle humorale ou cellulaire. Et aucun consensus n'existe quant à la conduite à tenir en termes de prophylaxie vaccinale ou anti-infectieuse.

Le deuxième axe de mes travaux de recherche a donc porté sur l'analyse de la réponse vaccinale résiduelle chez les patients traités par cellules CAR-T anti-CD19 (Etude ReVacCT).

TRAVAUX DE RECHERCHE - AXE 1

Article 1 : Évaluation de stratégies de ciblage multiple en ADCC dans les LAL-B pédiatriques

Evaluation of multitargeting ADCC strategies in pediatric BCP-ALL

En cours de relecture par interprète anglophone

Sera soumis à Leukemia

A. Grain ; J.Ollier ; B. Le Calvez ; Elodie Guiet ; Caroline Thomas ; M. Eveillard ; Emmanuel Scotet ; B.Clémenceau

Contexte : L'utilisation des Acs monoclonaux ou des cellules CAR-T anti-CD19 autologues a révolutionné la prise en charge des leucémies aiguës lymphoblastiques B en rechute ou réfractaires (LAL-B R/R). Cependant, au décours de ces thérapies ciblées, près de 50% des patients vont rechuter. Pour 40% d'entre eux l'échappement tumoral est lié à la perte d'expression de l'antigène cible. Le développement de stratégie de ciblage multiple et donc l'identification de nouveaux antigènes d'intérêt dans les LAL-B est donc nécessaire.

Méthode : L'expression membranaire de 360 antigènes, a été analysées, en utilisant le kit Human Cell Surface Marker Screening Kit (Biolegend®), dans 13 LAL-B primaires issues de patients pédiatriques. Des tests de cytotoxicité ont été conduits sur 24 heures, afin d'évaluer la lyse cellulaire médiée par les Acs (ADCC) induite suite à la reconnaissance des antigènes sélectionnés, en utilisant des lymphocytes T (LT) humains équipés du CD16 murin, capables d'ADCC après reconnaissance du fragment Fc des Acs murins.

Résultats : 13 antigènes fortement exprimés par la majorité des LAL-B ont été sélectionnés, parmi lesquels seuls quelques-uns étaient associés à une activité ADCC significative après reconnaissance par une IgG murine et les LT-CD16. Une activité ADCC importante était notamment obtenue en ciblant le CD24. Cette lyse spécifique semblait corrélée au niveau d'expression de l'antigène par les cellules blastiques. La double reconnaissance CD24-CD123 était associée à une activité ADCC un peu plus élevée (n=1). Enfin, les combinaisons de triple reconnaissance testées étaient associées à une diminution de l'ADCC observée.

Conclusion : CD24 apparaît comme une cible d'intérêt dans les LAL-B pédiatriques, et la combinaison CD24-CD123 comme une potentielle stratégie de double reconnaissance efficace. La combinaison de plusieurs modalités de reconnaissance (récepteur chimérique et CD16) doit être explorée, pour rechercher un éventuel effet synergique ou additif.

Ce travail a fait l'objet :

- **D'une communication orale à la journée plénière du groupe Grand ouest Cancers de l'Enfant (GOCE) le 20 juin 2024**
- **D'une communication affichée à la journée annuelle du canceropôle Grand Ouest le 1^{er} et le 2 juillet 2024**

Title: Evaluation of multitargeting ADCC strategies in pediatric BCP-ALL

Short running title: Multitargeting ADCC strategies in pediatric BCP-ALL

Authors: A. Grain^{1,2} ; J.Ollier²; B. Le Calvez^{1,2} ; Elodie Guiet² ; Caroline Thomas¹ ; Marie-Laure Couec¹ ; Margaux Camuset¹; Fanny Rialland¹ ; M. Eveillard³ ; Emmanuel Scotet²; B.Clémenceau²

Affiliations:

¹: Pediatric oncology and hematology department, University hospital of Nantes, Nantes, France

²: Nantes Université, Inserm UMR 1307, CNRS UMR 6075, CRCI2NA, Team 12, Nantes, France

³ : Hematology Biology, Nantes University Hospital, Nantes, France

INTRODUCTION:

Acute lymphoblastic leukemia (ALL) is the most common cancer in children, accounting for around 25% of cancers diagnosed before 15 years of age. Current first line approach is based on chemotherapy, leading to an overall survival upper than 90% (1,2). However, 10-15% of patients relapse after a first line of treatment, and prognosis is getting worse with the number of relapses. Indeed, after having obtained a second complete remission (CR), the 2-years event free survival (EFS) probability is about 40+/-5% in patients which require a second salvage therapy, and falls to 13+/-7% when a third salvage therapy is necessary (2). Antibodies-based immunotherapy have dramatically improved the treatment of B Cell Precursor-ALL (BCP-ALL) relapses. As a first instance, the anti-CD19-CD3 bispecific T-cell engager antibody (blinatumomab), allowed overall survival (OS) improvement, in a phase III study including 214 children and young adults treated for a relapse BCP-ALL (71.3% versus 58.4% in the chemotherapy arm) (3). The calicheamicin-coupled anti-CD22 antibody (inotuzumab) also led to high response rates (67%) in heavily pretreated pediatric patients with relapse or refractory (R/R) BCP-ALL (4). In the last decade, the anti-CD19 chimeric antigen receptor (CAR)-T cells (tisagenlecleucel) cells revolutionized the therapeutic approaches of R/R BCP-ALL, as the early response rate raised up to 80% in the pivotal pediatric study (5).

Nevertheless, after 10 years of “real life” experience, relapses occurred, and the 3 years-EFS of patients included in the pivotal study fell to 44.4% (6). The main driver of post CAR-T cells relapse of BCP-ALL is the loss of CD19 expression (41% of cases), secondary to alternative splicing, mutation, or deletion. A high disease burden at infusion, a prior poor response to blinatumomab and a 4-1BB co-stimulatory domain in the CAR construct, are associated with

higher risk of CD19 negative BCP-ALL relapse, which are associated with a very poor prognosis (7,8).

Targeting several antigens simultaneously or sequentially may provide greater tumor coverage and potentially circumvent antigen escape. Dual or multitargeting strategies were therefore explored in preclinical studies, by using either Tandem, Dual, Switchable, SUPRA or synNotch CAR-T cells constructions (9–13). In a clinical setting, some studies reported encouraging early results of dual targeting in BCP-ALL, unfortunately followed by a significant rate of relapses (14–16).

An alternative strategy is based on universal immune receptors (UIR). These UIR provide an adaptable specificity, through the use of an extracellular adaptor moiety (antibodies, ScFvs, bi-specific scFvs, Fab fragments, nanobodies, and small molecules) targeting an antigen, and bridging a receptor on T-cells (17–24). We reported one of the first UIR-T-cells, based on the principle of antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) using genetically modified T-cells expressing CD16. Firstly developed to increase the ADCC activity in patient receiving monoclonal antibodies, the CD16-T lymphocytes could allow flexible multitargeting strategies, when combined with several monoclonal antibodies (25). The flexible targeting of CD16-T lymphocytes was then explored by several teams (26–29). A growing body of clinical evidence shows the importance of ADCC in anti-tumoral effect of mAbs. Adoptive transfer of CD16-T lymphocytes coupled with the injection of two or three different monoclonal antibodies or polyclonal antibodies could be evaluated as a simple and scalable multi-targeting strategy. To this aim, it is necessary to directly identify antigens whose targeting by an antibody effectively induces ADCC. Indeed, in this study we have firstly performed a wide immunophenotype of BCP-ALL from pediatric patients and have selected 13 antigens widely expressed. Then, we have conducted ADCC assays, by using the cellular tool, human T-cells expressing murine CD16 (mCD16 T cells) previously described (30), that could be used with purified murine antibodies. We have determined whether the previously selected antigens enable lysis of leukemic cells by ADCC. We also have evaluated antibody-based multi-targeting strategies.

MATERIAL AND METHODS

Cells

Leukemic samples

Residual bone marrow aspiration samples were collected from patients aged less than 18 years old, who presented with a BCP-ALL, in the pediatric hematology unit of Nantes hospital. All samples contained more than 60% of blasts. Mononuclear cells were isolated by using density

gradient centrifugation on a FICOLL-Paque solution (Eurobio®, Les Ullis, France). Cells are then used fresh or after thawing. The preclinical study providing this biocollection was approved by the local ethic committee (Groupe Nantais d’Ethique dans le Domaine de la Santé). Patient and their guardians/parents provided an informed signed non-opposition form for the biocollection. Investigations were therefore conducted in accordance with the principles of the Declaration of Helsinki.

B-cell line

An Epstein-Barr B-lymphoblastoid cell line (EBV-LCL) derived from donor peripheral-blood mononuclear cells (PBMCs) infected with using B95-8 marmoset-derived EBV in the presence of 1 µg/mL of cyclosporin-A (sandimmun) was used as control for phenotyping and ADCC assays.

ADCC Effector T cells : Anti-CMV-mCD16 T cells

A Cytomegalovirus (CMV)-specific CD8⁺T-cell population genetically modified to express the murine FcγRIII (CD16) linked to the human FcεRIγ chain was obtained as previously described (25,31). Briefly, anti-HLA-A2 CMVpp65-T cells from *HLA-A2* CMV-seropositive healthy donor (HD) were selected and amplified using recombinant pMHC HLA-A2 CMVpp65^{N9V} tetramer. Selected anti-CMV-CD8⁺ T-cell population were stimulated (Day 0) and transduced (Day 2) with retroviral vector expressing the murine CD16-human γ receptor. At Day 14, mCD16-T cells were immunoselected, amplified and frozen at day 16 after the stimulation. The anti-CMV-mCD16-T cells were thawed and kept overnight or several days at 37°C in X-Vivo-15 medium (Lonza) supplemented with 4% human serum and IL-2 (300 UI/ml), before ADCC assays. The ADCC activity of these anti-CMV-mCD16-T cells (nicknamed mCD16-T cells for the rest of this paper) was controlled against EBV-LCL preincubated with anti-CD20 mAb (murine IgG1, AT80 clone).

Antibodies

Monoclonal murine antibodies (mAb) specific for human selected antigens CD10, CD19, CD22, CD24, CD47, CD74, CD123, CD135, CD137, CD156c, D205, CD229, CD268, were provided by Biolegend® (Biolegend Europe B.V, Amsterdam, The Netherlands). The specific anti-human CD20 mAb was purchased from Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg

Germany), and mAb anti-CD71 was purchased from ABD Serotec BioRad® (Marne La Coquette, France). For ADCC assays, mAb were used at a final concentration of 1 µg/mL. The complete list of mAbs is provided in the **supplemental Table S1**.

Immunophenotyping

Extended immunophenotyping of leukemic cells was performed using the Human Cell Surface Marker Screening Kit from Biolegend® (Biolegend® Europe B.V, Amsterdam, The Netherlands; LEGENDscreen) containing 371 PE-conjugated, lyophilized and pre-titrated antibodies to cell surface markers as well as 10 Ig isotypes control in convenient, ready to use, 96-well plates. Leukemic samples were first incubated with an anti-CD19-APC coupled antibody (Biolegend®, clone HIB19) in order to select the leukemic blasts by gating CD19⁺ cells and then $(1-5) \times 10^5$ cells per well were plated on the four 96-wells plates. Staining was performed at 4°C in the dark for 20-30 min, followed by washing with cell staining Buffer before the fixation and the analysis. For data analysis, at least 10 000 CD19⁺ cells were acquired per sample using the CANTO II cytometer (Cytocell - Flow Cytometry and FACS core facility SFR Bonamy, BioCore, Inserm UMS 016, CNRS UAR 3556, Nantes, France). Data were proceeded using FlowJo v10.8.1 software (BD LifeSciences®). For each, PE-mAbs, Relative Fluorescence Intensity (RFI in log) was calculated as median fluorescence intensity of the targeted-antigen coupled antibody/median fluorescence intensity of the unspecific control isotype. An EBV-LCL was used as control.

Long term ADCC killing assays

Analysis of leukemic cell lysis was performed by using long term ADCC assays over 24 hours, as it better reflects the response observed *in vivo* (32). Medullary BCP-ALL samples were thawed and kept overnight at +4°C. Target cells (80,000 cells/well) were sensitized during 15 min with murine mAb at a final concentration of 1 µg/mL, as previously determined, and plated with ADCC effector T-cells, in X-Vivo-15 media (Lonza®, Basel, Switzerland), at the E:T ratio 3:1, in a flat-bottom, 96 wells plate, and incubated at 37 °C. At different time points: 0 hour (H0), and 24 hour (H24) after co-culture, cell suspension was collected and wells were rinsed in order to collect all residual cells. Cells were then washed once with PBS-EDTA (0.02%) and then with PBS before being labelled with a Fixable Viability Stain 780 (BD Biosciences®, Le Pont de Claix, France) over 10 min at room temperature (RT). Cells were then washed in PBS and labeled with a PE-coupled anti-CD22 antibody (Dako® product provided by Technologies

Agilent France, Les Ulis, France) and a FITC-coupled anti-CD3 antibody (Beckman Coulter® France SAS, Roissy, France) for 15 min at RT, in order to gate leukemic residual viable cells and effector mCD16-T-cells respectively. After two more washing with PBS-0.1% human albumin, cells were fixed and were acquired on BD FACSCanto II (Cytocell - Flow Cytometry and FACS core facility, SFR Bonamy, BioCore, Inserm UMS 016, CNRS UAR 3556, Nantes, France). For data analysis, a first logical gate was based on FCS/SSC, then singlets were isolated. Secondly, viable (VS780^{low}) cells were selected and two last gates on CD22⁺, and CD3⁺ cells allowed to identify leukemic cells and T-cells respectively. Representative plots with gating strategy and controls are shown in **Supplementary Figure S2**. A total of 10 000 events in the viable CD3⁺ gate was acquired. For each condition, the total viable leukemic cells (VS780^{low}/CD22⁺) at H0 was reported as 100%. At H24, the percentage of residual viable leukemic cells was calculated as follows: = (count of viable CD22⁺ cells at H24/ count of viable CD22⁺ cells at H0) × 100.

Statistical analysis

Correlation between level of expression of each antigen tested (RFI) and specific ADCC-mediated lysis was determined by using a simple linear regression test (GraphPrism 9.5.1, GraphPad software, Boston, USA).

RESULTS

Wide immunophenotype and antigenic target selection on BCP-ALL

Wide immunophenotype was performed for 13 BCP-ALL (11 de novo and 2 relapses) from pediatric patients, treated from December 2020 and October 2021 in Nantes hospital. Among the 361 antigens tested, unexpressed antigens (n=129) have been first excluded. Secondly, the antigens highly expressed by the majority of samples, among those belonging to B-cell markers family (n= 33) and/or and those for which a targeted therapy has been developed (n=48) were selected. In addition, molecules implicated in leukemic resistance mechanisms to T-cell lysis have been also explored (33). Finally, 15 antigens were selected and their level of expression on the BCP-ALL samples were presented in **Figure 1**. These antigens had very different molecular weights and functions (**Figure 2A**). Levels of expression of each antigen in healthy tissues were collected in database (protein <https://www.proteinatlas.org/> <https://www.uniprot.org/>) (34,35) and are represented in the **Figure 2B**. CD20 which is expressed by several BCP-ALL and highly

by the EBV-LCL was used as positive control and the CD137, not expressed on BCP-ALL cells was used as a negative control.

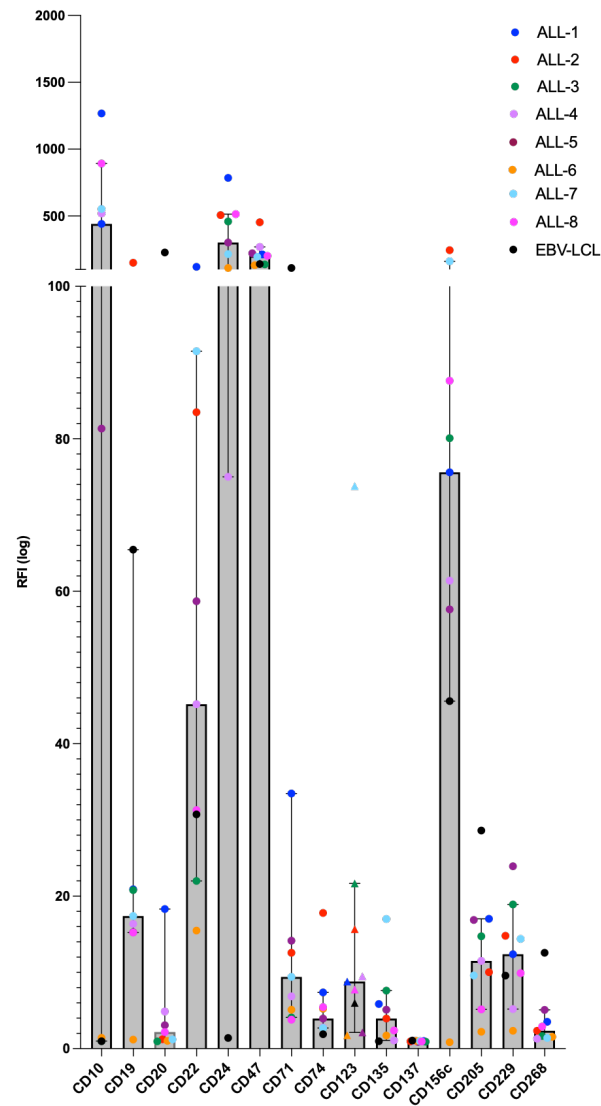


Figure 1: Expression levels of the 15 selected antigens on primary BCP-ALL sample. The wide immunophenotyping was performed with PE-coupled antibodies provided in the Human Cell Surface Marker Screening Kit (Biolegend® Europe B.V, Amsterdam, The Netherlands). Relative Fluorescence Intensity (RFI in log) were calculated as the median fluorescence intensity (MFI) with the PE-specific antigen antibody divided by the MFI of the isotype control

mAb. Results are presented as median and 95%CI interval. Each point symbolizes one ALL sample.

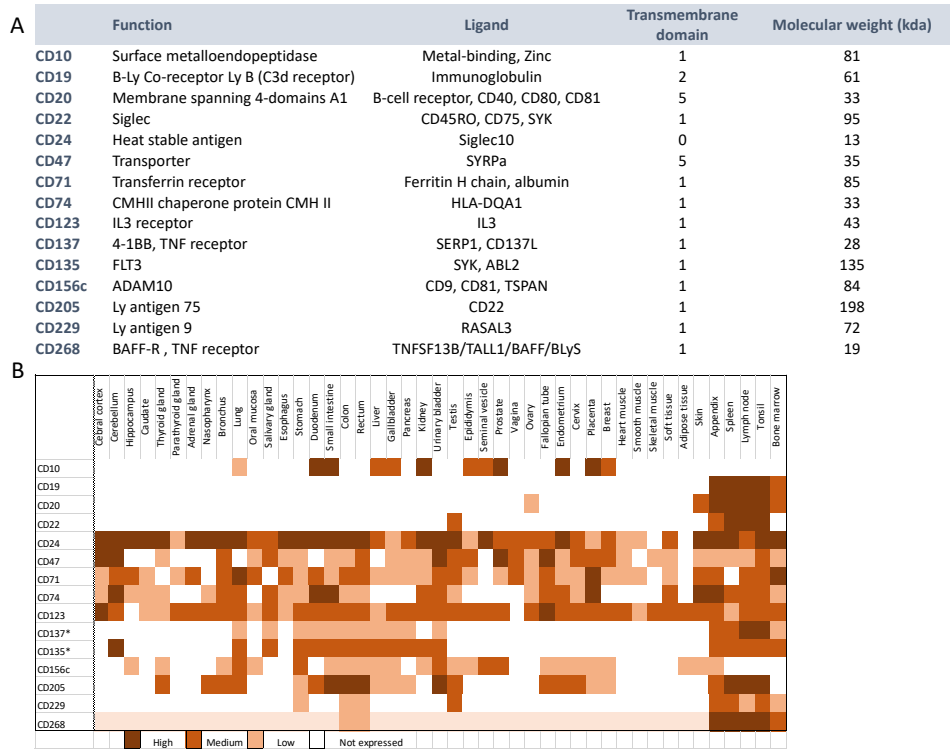


Figure 2: Details about selected antigens. A: Table with the name and main features of 15 selected antigens. B: Heat map of levels of expression of each antigen in healthy tissues (34–43) .

Monotargeting : Variability of ADCC efficiency depending on the targeted antigen

From an experimental point of view, it is important to note that all ADCC assays were performed in an allogeneic situation as mCD16-T-cell population was derived from one healthy donor and BCP-ALL samples were derived from patients. In order to reduce allogenic recognition (TCR dependent), in the long-term ADCC assays (over 24h), we used mCD16-T-cells with a restricted TCR specificity (anti-CMV T-lymphocytes: HLA-A2-CMVpp65^{N9V}). However, and unexpectedly, even with these mCD16-T cells, 5 out of the 8 BCP-ALL tested were lysed among which 3 were strongly lysed (ALL-4, 7 and 8) (**Figure 3A**). Therefore, for all analysis, mAb-independent lysis has been taken into account and is shown in all graphs.

Since our study was performed on primary BCP-ALL samples, directly obtained from patients and after freezing and thawing, the viability of BCP-ALL in culture appeared highly variable, even for samples from a same patient. The cell viability of BCP-ALL cultured alone was controlled in all assays and remained above 50% except for ALL 7 and 8 (35 and 14% respectively) (**Figure S3**).

The capacity of 15 mAb, specific of the previously selected antigens, to induce ADCC against 4 primary BCP-ALL was evaluated using mCD16-T cells as ADCC effector cells. Percent of residual viable leukemic cells after 24 hours in absence or presence of mAb (1µg/ml) and co-cultured with mCD16-T-cells were presented in **Figure 3B**. Positive ADCC controls were performed using an EBV-LCL as target cells, pre-incubated with an anti-CD20 murine IgG1 and cocultured with mCD16-T-cells and for which 50 to 60% of cell lysis was generally measured (**Figure S4**).

In absence of mAbs, ALL-1, -2 and -3 were not spontaneously recognized and lysed by mCD16-T cells, however for ALL-4, only 60 % of leukemic cells are still viable after 24h of coculture. For ALL-1, the percentage of residual viable leukemic cells after 24h of culture is higher than 100%, revealing its proliferation. The percentage of residual viable leukemic cells measured from 7% to 100% was dependent on both the target antigen and the BCP-ALL tested. For all the BCP-ALL, as we already reported, our results clearly discriminated CD20 as a good target for ADCC compared with CD19. Then for most of the samples, a high ADCC activity was observed with anti-CD22, -CD24, -CD47 and CD156c (ADAM10) mAbs (**Figure 3C**). Interestingly, among these 4 antigens, we observe only for CD24 a correlation between its expression level on ALL-B and ADCC lysis ($p=0.14$) (**Figure 3C**). Among the 15 antigens targeted, CD24 is the smallest central

protein and the only one that bound to the outer surface of the plasma membrane by a glycosylphosphatidylinositol (GPI) lipid anchor (**Figure 2A**).

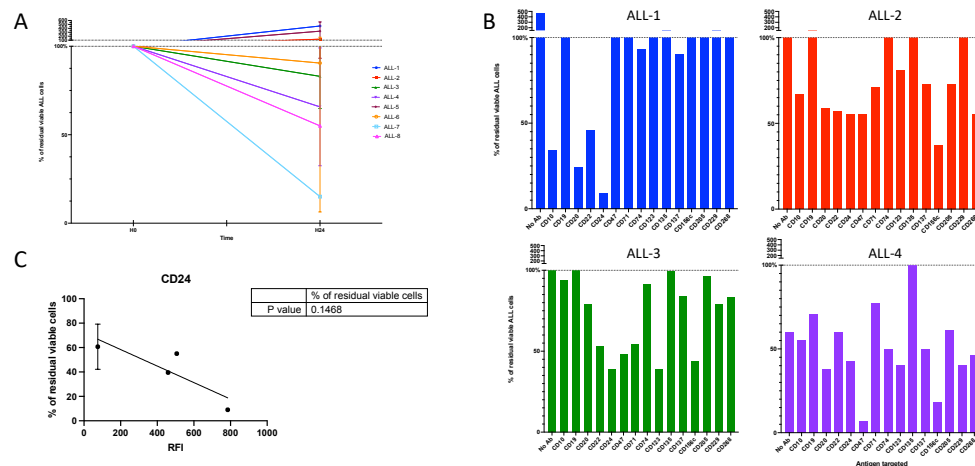


Figure 3: Mono-targeting long term ADCC assays. Leukemic cells and mCD16-T-cells were co-incubated at the E:T ratio 3:1 in X-Vivo-15 medium in absence or with 1 μ g/mL of murine purified antibodies and incubated at 37 $^{\circ}$ C for 24h. At 0 h (H0), and 24 h (H24) of co-culture, residual viable cells were analyzed by MFC. A: Percent of residual viable leukemic cells at H0 and H24 for 8 BCP-ALL co-cultured with mCD16-CTL in absence of mAbs. B: Percentage of residual viable leukemic cells of 4 BCP-ALL cells after 24 hours of co-culture with mCD16 T-cells in absence or in presence of the different murine mAbs. C: Correlation between the level of CD24 expression by 4 BCP-ALL cells and residual viable CD22⁺ cells after 24 hours of co-culture in long-term ADCC assays with an anti-CD24 mAb. A simple linear regression test was used (GraphPrism 9.5.1, GraphPad software).

Multitargeting combination

The antigens CD22, CD24, CD47, CD123, CD268 for which ADCC has been observed for most leukemic cells, were selected to assess multitargeting combinations.

24hours-ADCC assays were performed using two combinations of three antibodies: CD22-CD24-CD268 (Figure 4A) and CD24-CD47-CD123 (Figure 4B). mAbs combinations were tested against 5 BCP-ALL samples: the ALL-4 which was most sensitive to ADCC lysis in single-target assays, and 4 additional BCP-ALL samples expressing varying levels of selected antigens. For the anti-CD22-CD24-CD268 antibodies combination, none of the 4 antibodies's combinations tested tested in 3 ALL was able to induce higher ADCC lysis than mono-targeting. Unexpectedly, addition of anti-CD22 and/or anti-CD268 mAb to anti-CD24 mAb led to a decrease of the leukemic cell lysis induced as compared with the lysis observed with an anti-CD24 targeting alone (**Figure 4A**). This decrease of ADCC activity did not seem to be related to the lack of binding of mAb. Indeed, when revealing with a secondary anti-mouse coupled-antibodies, the binding of antibodies on target cells persisted (data not shown).

For the combination of anti-CD24-CD47-CD123 antibodies tested against 4 BCP-ALL, the association of the anti-CD47 mAb to anti-CD24 mAb decreased the anti-CD24 ADCC activity. Only the simultaneous targeting of CD123 and CD24 did not lead to a decrease of anti-CD24 ADCC-related lysis and in one case (ALL-4) this combination increased slightly the ADCC suggesting an additive effect (**Figure 4B**).

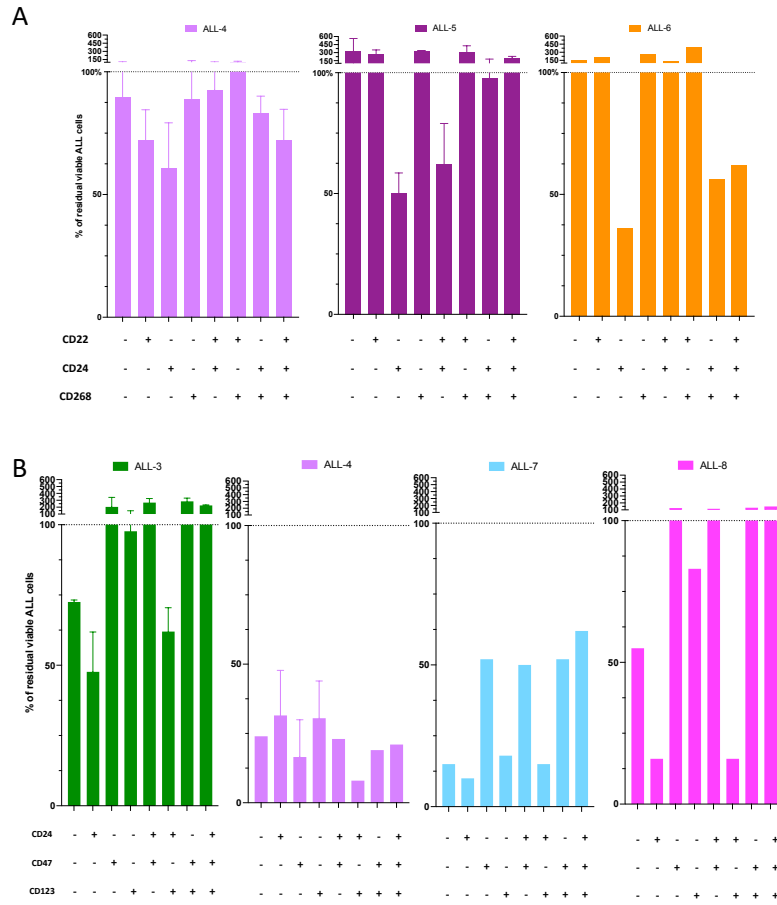


Figure 4: Multitargeting ADCC assays. Primary BCP-ALL leukemic cells and mCD16-T-cells were co-cultured at the effector:target ratio of 3:1 in X-Vivo-15 medium in absence or with 1 µg/mL of each murine purified antibodies and incubated at 37 °C for 24h. At 0 h (H0) and 24 h (H24) of co-culture residual viable cells were analyzed by MFC. A. Percent of residual viable leukemic cells targeted with antiCD22, -CD24, -CD268 mAbs (n=5, 3 different BCP-ALL). B. Percent of residual viable leukemic cells targeted with anti-CD24,-CD47,-CD123 (n=5, 4 different BCP-ALL).

DISCUSSION

First, the results presented here provide an in-depth exploration of surface antigens expression in pediatric BCP-ALL. Multiparametric flow cytometry analysis is an essential tool either in the initial diagnosis work-up, or for the assessment of response to treatment of BCP-ALL. In routine procedure, the expression of 20-25 markers is generally used for the evaluation of BCP-ALL at diagnosis (44). Leukemia-associated aberrant immunophenotype (LAIP) markers expression, may sometimes be difficult to interpret and recently, Boris, E et al, have reported a better understanding of 7 LAIP markers landscape in BCP-ALL: CD9, CD21, CD66c, CD58, CD81, CD123, and NG2 (45). By providing a broad analysis of the expression profile of 361 antigens by BCP-ALL, this work initiated to address this issue, and we potentially have identified new LAIP markers like CD24 and CD156c.

Then, we selected 15 membrane antigens which can be targeted by murine monoclonal antibodies and our innovative human cytotoxic T lymphocytes expressing the mouse FcγRIII receptor (CD16) to directly determined which of them were best suited to induce ADCC-dependant lysis. The level of ADCC mediated lysis was very variable according to the antibody used and the BCP-ALL tested. As previously reported, we confirmed that the opsonization of the target cell by antibodies is necessary, but not sufficient, to induce ADCC. Among the 15 mAbs tested, those targeting CD24 (clone ML5) and CD156c (ADAM10, Clone SHM14) led to an effective ADCC-mediated cytotoxicity and, only for CD24, the lysis seemed to be correlated to its level of expression on BCP-ALL, as ever described for EpCAM (46).

Numerous parameters can influence the efficiency of ADCC and their relative importance is still unclear. First, ADCC requires a minimal threshold number of antibodies bound to the target cells. This threshold depends on the affinity and avidity of the antibody, linked to the interaction of the bivalent Fab with the antigen. Secondly, the distance between the epitope (which is linked to the specificity of the F(ab')₂ region) and the tumour cell surface can influence ADCC potency (47). Moreover, the potency of effector function also appears to be influenced by the angle at which mAbs bind to their epitopes. Indeed, mAbs targeting overlapping epitopes on the HIV-1 envelope glycoprotein, gp120, showed up to a 75-fold difference in ADCC potency. This difference was not related to the affinity of the mAbs for the antigen, but to variations in the orientation of the mAbs when they bind to the antigen (48). The evaluation of all these parameters for one target antigen is difficult and requires extensive studies involving the generation of a library of antibodies recognizing different epitopes on a same antigen with different affinities. Our study presented a first step in the search for membrane proteins of interest for ADCC targeting and identified CD24 and CD156c as potential targets for BCP-ALL.

The CD24 is a Glycosyl-phosphatidylinositol-anchor protein of 20 to 70 kD, broadly expressed, but its level of expression and of glycosylation is highly variable depending on the cell subtype (49,50). Accordingly with two of the most successful targets in oncology, CD20 and CD52, CD24 has also a

small extracellular domain, making it an excellent candidate for the engagement of the Fc-mediated ADCC mechanism (47). CD24 is expressed in several cancer cells, more importantly in stem cell cancer than in differentiated cancer cells. CD24 interacts with several tyrosine kinases (Src, STAT3, MAPK), and promotes the cells proliferation (51,52). Interestingly, CD24 interacts with Siglec10 in human, and acts as a “do not eat me” signal, decreasing the host immune response against tumor (49–51). In 1988, a preliminary report described remission after treatment with a combination of anti CD24 and CD21 B-cell antibodies in two patients in whom oligoclonal B-cell lymphoproliferative syndrome developed after bone marrow transplantation (53). Then an multicenter, prospective study analysed the use of the same antibodies (specific for CD21(BL13 mouse IgG1) and CD24 (ALB9 mouse-IgG1) in 58 patients presenting with B-lymphoproliferative disorder after bone marrow or organ transplantation was conducted (54). This study yielded, some complete remissions (n=36) and a good tolerance of the treatment.

The CD156c (ADAM10) is a transmembrane protein (A Disintegrin and Metalloprotease) involved in cell adhesion and proteolysis (55). The main function of CD156c is the shedding of extracellular domain of transmembrane proteins such as epidermal growth factor, betacellulin, Notch, CD30 or class I chain-related proteins A and B (MIC-A and B) (56). Dysregulation of ectodomain shedding is associated with autoimmune and cardiovascular diseases, neurodegeneration, infection, inflammation and cancer (57). The shedding of Notch extracellular domain, leads to the shedding of its intracellular domain by γ -secretase, which acts as a transcriptional factor and promotes cell proliferation (58). MIC-A and MIC-B are present at the surface of cancer cells and are able to bind NKG2D on NK cells, and therefore to enhance innate immune response against cancer cells (59). An overexpression of ADAM10 has already been described in leukemia, lymphoma and also in colon, prostate and ovaries cancers (57,60). Moreover, the sheddase activity of ADAM10 was therefore associated with an impaired immune response against cancer cells, but also a decrease efficiency of monoclonal therapeutic antibodies in Hodgkin lymphoma (61,62). The clinical development of small molecules inhibiting the Metalloprotease family failed due to musculoskeletal toxicity (57). The INCB7839, which is a sheddase inhibitor (ADAM10 and ADAM17) showed antitumoral efficacy *in vitro*, when combined with an inhibitor of Her2, in breast cancer cell line (63). In Australia, Janes and colleague also raised an antibody directed against a substrate-binding pocket in ADAM10 (8C7) which bind to an active conformation of ADAM10 and marks cancer cells with active Notch signaling and inhibits tumor growth in mouse models of colorectal cancers and glioma (64–67). Subsequently, this team developed a fully human anti-ADAM10 antibody, specific of the same epitope IH5, which is capable to inhibits tumor growth in preclinical models of colorectal cancer, in combination with Iritotecan (68). Today, to our knowledge, the INCB7839 is the only ADAM10 targeting molecule used in clinical studies, since it is used in a phase I clinical trial involving children treated for a high-grade glioma (clinicaltrial.gov)

The third objective of our study was to evaluate cocktails of antibodies targeting two or more cell surface receptors to enhance ADCC activity and BCP-ALL lysis. Indeed, targeting multiple cell surface antigens may increase both antibody occupancy and antigen clustering through crosslinking and Fc-Fc interactions resulting in enhanced avidity interactions. However, none of the 6 combinations of two mAbs and 2 combinations of 3 mAbs tested (anti-CD22-CD24-CD268 and anti-CD24-CD47-CD123) showed any synergistic or additive ADCC activities. Additive and/or synergistic tumor cells lysis was ever described in multitargeting strategies mainly through Complement-Dependent Cytotoxicity (CDC). Recently, Oostindie, S. C. et al. demonstrated that an IgG antibody mixture of modified anti-CD20 and CD37 antibodies could enhance hexamerisation and CDC against tumor B cells but ADCC was not evaluated in parallel (69). Jacobsen and colleagues reported a mixture of six antibodies which, in synergistic pairs, target each of the HER family members EGFR, HER2 and HER3. This mixture, known as Pan-HER (Sym013, Symphogen) was shown to induce potent growth inhibition in a range of cancer cell lines and xenograft models. Pan-HER was also capable to overcome resistance in HER family-expressing tumors due to the increase of ligand production. Pan-HER induced a level of ADCC in vitro similar to that of cetuximab or trastuzumab, whereas the level of CDC was clearly enhanced (70). Enhanced ADCC activity was described with a mAb cocktail targeting several epitopes of Her2 on human breast cancer cell line BT474 and in xenograft models, as compared to trastuzumab alone (71). Although the reasons for this increased ADCC were not explored, this may be attributable to a greater Fc density at the cell surface, or alternatively, a broader range of Fc orientations available for FcγRIIIa engagement.

Since we have reported one of the first Fc chimeric receptor-cells, based on the principle of antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) using genetically modified T-cells expressing CD16 (25), other teams had developed CD16⁺-T cells (14,15,16). However, none of them report the use of these CD16⁺-T cells in ADCC assays with antibody mixtures, to evaluate multi-targeting strategies. The reason may be that, like in our study, they did not observe any additive effects.

Interestingly, while in the field of oncology, very few studies report the ADCC activity of antibody cocktails, such data are emerging in the field of infectious diseases in particular for anti-VIH and anti-influenzae antibodies (72–76).

The single-agent use of monoclonal antibodies for therapy is in many ways contrary to antibody function as established in natural biology. In traditional drug development, single-agent safety and activity is usually required for a drug to be registered and drug combinations are typically only sought following first registration, often using empirical approaches. However, in the body, a combinatorial, polyclonal response is the starting point of the immune response to an antigen. An appreciation of this paradox has

steadily grown, and antibody-based therapeutics have evolved from canonical monoclonal antibodies towards more complex antibody architectures and formats in an effort to enhance functional activity.

Our study has some limitations. First, it was carried out on small number of primary BCP-ALL samples. Second, the use of primary clinical BCP-ALL samples is associated with a great variability in results, induced by both variability in antigen expression and cell viability in vitro. The continuation of our work could be simplified by the use of ALL-B cell lines. Third, despite the use of mCD16 T lymphocytes with an HLA/peptide-restricted TCR specificity (ie. Anti-HLA-A2 CMVpp65), a variable and unpredictable alloreactivity has still been observed. This allogeneic recognition (TCR-mediated) has been previously described (77). Some studies also report an alloreactivity-dependent lysis with CAR-T cells in variable levels (from 5 to 50% of the cytotoxic activity) (10,17,26–28,78,79). In general, this lysis is greater when the cytotoxic assays are performed over 24 hours or longer (26,78). In order to improve our mCD16-T-cellular tools, we planned to insert mCD16 transgene in the TRAC locus by CRISPR-Cas9 to disrupt the TCR expression.

As a conclusion, our study reports the broad phenotyping of BCP-ALL for the selection of antigens of interest for ADCC targeting by original assays using murine antibodies and mCD16-T lymphocytes as effector cells. Among the 13 antigens selected, CD24 and CD156c has emerged as ADCC-effective targets. Our study is one of the rare to report the analysis of ADCC activity with so many antibody combinations. Our results showed that the increase in avidity by multi-targeting rarely led to an increase in ADCC, or even to inhibitory effects. However, such synergies have ever been demonstrated with natural polyclonal anti-viral responses suggesting that synergistic combinations are possible. Therefore, analysis of ADCC activity obtained with cocktails of antibodies or preferentially with polyclonal antibodies against an antigen should be continued to evaluate this strategy as a tumor cells multi-targeting strategy. These studies are necessary for the clinical development of multi-targeting strategies against cancer cells, based on ADCC activity, using mAbs and cell adoptive transfers with NK cells or FcR⁺ T lymphocytes. Another strategy of multi-targeting that we are evaluating is to engineered T lymphocytes with two recognition systems: CD16 (ADCC) and CAR.

ACKNOWLEDGMENT

The authors acknowledge the Cytocell - Flow Cytometry and FACS core facility (SFR Bonamy, BioCore, Inserm UMS 016, CNRS UAR 3556, Nantes, France) for its technical expertise and help, member of the Scientific Interest Group (GIS) Biogenouest and the Labex IGO program supported by the French National Research Agency (n°ANR-11-LABX-0016-01)

FIGURES/TABLES

Figure 1: Expression levels of the 15 selected antigens on primary BCP-ALL sample. The wide immunophenotyping was performed with PE-coupled antibodies provided in the Human Cell Surface Marker Screening Kit (Biolegend® Europe B.V, Amsterdam, The Netherlands). Relative Fluorescence Intensity (RFI in log) were calculated as the median fluorescence intensity (MFI) with the PE-specific antigen antibody divided by the MFI of the isotype control mAb. Results are presented as median and 95%CI interval. Each point symbolizes one ALL sample.

Figure 2: A: Table with the name and main features of 15 selected antigens. B: Heat map of levels of expression of each antigen in healthy tissues (34–43) .

Figure 3: Mono-targeting long term ADCC assays. Leukemic cells and mCD16 T-cells were at co-incubated the E:T ratio 3:1 in X-Vivo-15 medium in absence or with 1 µg/mL of murine purified antibodies and incubated at 37 °C for 24h. At 0 h (H0), and 24 h (H24) of co-culture, residual viable cells were analyzed by MFC. A: Percent of residual viable leukemic cells at H0 and H24 for 8 BCP-ALL co-cultured with mCD16-CTL in absence of mAbs. B: Percentage of residual viable leukemic cells of 4 BCP-ALL cells after 24 hours of co-culture with mCD16 T-cells in absence or in presence of the different murine mAbs. C: Correlation between the level of CD24 expression by 4 BCP-ALL cells and specific ADCC lysis // residual viable CD22+ cells after 24 hours of co-culture in long-term ADCC assays with an anti-CD24 mAb. A simple linear regression test was used (GraphPrism 9.5.1, GraphPad software).

Figure 4: Results of multitargeting ADCC assays. Leukemic cells and mCD16-T-cells were at co-incubated the E:T ratio 3:1 in X-Vivo-15 medium in absence or with 1 µg/mL of murine purified antibodies and incubated at 37 °C for 24h. At 0 h (H0) and 24 h (H24) of co-culture residual viable cells were analyzed by MFC. Two combinations were tested: CD22-CD24-CD268 (n=5, 3 different BCP-ALL) (A) and CD24-CD47-CD123 (n=5, 4 different BCP-ALL) (B). The percent of residual viable leukemic cells after 24 hours of co-culture is given for each condition and each leukemic sample.

REFERENCES

1. Hunger SP, Lu X, Devidas M, Camitta BM, Gaynon PS, Winick NJ, et al. Improved survival for children and adolescents with acute lymphoblastic leukemia between 1990 and 2005: a report from the children's oncology group. *J Clin Oncol*. 2012 May 10;30(14):1663–9.
2. Sun W, Malvar J, Sposto R, Verma A, Wilkes JJ, Dennis R, et al. Outcome of children with multiply relapsed B-cell acute lymphoblastic leukemia: a therapeutic advances in childhood leukemia & lymphoma study. *Leukemia*. 2018 Nov;32(11):2316–25.
3. Brown PA, Ji L, Xu X, Devidas M, Hogan LE, Borowitz MJ, et al. Effect of Postremission Therapy Consolidation With Blinatumomab vs Chemotherapy on Disease-Free Survival in Children, Adolescents, and Young Adults With First Relapse of B-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia: A Randomized Clinical Trial. *JAMA*. 2021 Mar 2;325(9):833–42.
4. Bhojwani D, Sposto R, Shah NN, Rodriguez V, Yuan C, Stetler-Stevenson M, et al. Inotuzumab ozogamicin in pediatric patients with relapsed/refractory acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*. 2019;33(4):884–92.
5. Maude SL, Teachey DT, Porter DL, Grupp SA. CD19-targeted chimeric antigen receptor T-cell therapy for acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2015 Jun 25;125(26):4017–23.
6. Laetsch TW, Maude SL, Rives S, Hiramatsu H, Bittencourt H, Bader P, et al. Three-Year Update of Tisagenlecleucel in Pediatric and Young Adult Patients With Relapsed/Refractory Acute Lymphoblastic Leukemia in the ELIANA Trial. *J Clin Oncol*. 2023 Mar 20;41(9):1664–9.
7. Lamble AJ, Myers RM, Taraseviciute A, John S, Yates B, Steinberg SM, et al. Preinfusion factors impacting relapse immunophenotype following CD19 CAR T cells. *Blood Advances*. 2023 Feb 20;7(4):575–85.
8. Dourthe ME, Rabian F, Yakouben K, Chevillon F, Cabannes-Hamy A, Méchinaud F, et al. Determinants of CD19-positive vs CD19-negative relapse after tisagenlecleucel for B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*. 2021 Dec;35(12):3383–93.
9. Wang X, Dong Z, Awuah D, Chang WC, Cheng WA, Vyas V, et al. CD19/BAFF-R dual targeted CAR T cells for treatment of mixed antigen-negative variants of acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*. 2022 Apr;36(4):1015–24.
10. Qin H, Dong Z, Wang X, Cheng WA, Wen F, Xue W, et al. CAR T cells targeting BAFF-R can overcome CD19 antigen loss in B cell malignancies. *Sci Transl Med*. 2019 Sep 25;11(511).
11. Qin H, Ramakrishna S, Nguyen S, Fountaine TJ, Ponduri A, Stetler-Stevenson M, et al. Preclinical Development of Bivalent Chimeric Antigen Receptors Targeting Both CD19 and CD22. *Mol Ther Oncolytics*. 2018 Dec 21;11:127–37.
12. Ruella M, Barrett DM, Kenderian SS, Shestova O, Hofmann TJ, Perazzelli J, et al. Dual CD19 and CD123 targeting prevents antigen-loss relapses after CD19-directed immunotherapies. *J Clin Invest*. 2016 03;126(10):3814–26.
13. Teng F, Cui T, Zhou L, Gao Q, Zhou Q, Li W. Programmable synthetic receptors: the next-generation of cell and gene therapies. *Signal Transduct Target Ther*. 2024 Jan 3;9(1):7.
14. Hu Y, Zhou Y, Zhang M, Ge W, Li Y, Yang L, et al. CRISPR/Cas9-Engineered Universal CD19/CD22 Dual-Targeted CAR-T Cell Therapy for Relapsed/Refractory B-cell Acute Lymphoblastic Leukemia. *Clin Cancer Res*. 2021 May 15;27(10):2764–72.
15. Cordoba S, Onuoha S, Thomas S, Pignataro DS, Hough R, Ghorashian S, et al. CAR T cells with dual targeting of CD19 and CD22 in pediatric and young adult patients with relapsed or refractory B cell acute lymphoblastic leukemia: a phase 1 trial. *Nat Med*. 2021 Oct;27(10):1797–805.
16. Spiegel JY, Patel S, Muffly L, Hossain NM, Oak J, Baird JH, et al. CAR T cells with

- dual targeting of CD19 and CD22 in adult patients with recurrent or refractory B cell malignancies: a phase 1 trial. *Nat Med*. 2021 Aug;27(8):1419–31.
17. Atar D, Mast AS, Scheuermann S, Ruoff L, Seitz CM, Schlegel P. Adapter CAR T Cell Therapy for the Treatment of B-Lineage Lymphomas. *Biomedicines*. 2022 Sep 28;10(10):2420.
 18. Zhao J, Lin Q, Song Y, Liu D. Universal CARs, universal T cells, and universal CAR T cells. *J Hematol Oncol*. 2018 Dec;11(1):1–9.
 19. Urbanska K, Lanitis E, Poussin M, Lynn RC, Gavin BP, Kelderman S, et al. A Universal Strategy for Adoptive Immunotherapy of Cancer through Use of a Novel T-cell Antigen Receptor. *Cancer Research*. 2012 Apr 1;72(7):1844–52.
 20. Grote S, Mittelstaet J, Baden C, Chan KCH, Seitz C, Schlegel P, et al. Adapter chimeric antigen receptor (AdCAR)-engineered NK-92 cells: an off-the-shelf cellular therapeutic for universal tumor targeting. *Oncoimmunology*. 2020 Sep 29;9(1):1825177.
 21. Seitz CM, Mittelstaet J, Atar D, Hau J, Reiter S, Illi C, et al. Novel adapter CAR-T cell technology for precisely controllable multiplex cancer targeting. *Oncoimmunology*. 2021 Jan 1;10(1):2003532.
 22. Cartellieri M, Feldmann A, Koristka S, Arndt C, Loff S, Ehninger A, et al. Switching CAR T cells on and off: a novel modular platform for retargeting of T cells to AML blasts. *Blood Cancer Journal*. 2016 Aug;6(8):e458–e458.
 23. Rodgers DT, Mazagova M, Hampton EN, Cao Y, Ramadoss NS, Hardy IR, et al. Switch-mediated activation and retargeting of CAR-T cells for B-cell malignancies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2016;113(4):E459–68.
 24. Tamada K, Geng D, Sakoda Y, Bansal N, Srivastava R, Li Z, et al. Redirecting gene-modified T cells toward various cancer types using tagged antibodies. *Clinical Cancer Research*. 2012;18(23):6436–45.
 25. Clémenceau B, Congy-Jolivet N, Gallot G, Vivien R, Gaschet J, Thibault G, et al. Antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) is mediated by genetically modified antigen-specific human T lymphocytes. *Blood*. 2006 Jun 15;107(12):4669–77.
 26. Kudo K, Imai C, Lorenzini P, Kamiya T, Kono K, Davidoff AM, et al. T lymphocytes expressing a CD16 signaling receptor exert antibody-dependent cancer cell killing. *Cancer Res*. 2014 Jan 1;74(1):93–103.
 27. Ochi F, Fujiwara H, Tanimoto K, Asai H, Miyazaki Y, Okamoto S, et al. Gene-modified human α/β -T cells expressing a chimeric CD16-CD3 ζ receptor as adoptively transferable effector cells for anticancer monoclonal antibody therapy. *Cancer Immunol Res*. 2014 Mar;2(3):249–62.
 28. D'Aloia MM, Caratelli S, Palumbo C, Battella S, Arriga R, Lauro D, et al. T lymphocytes engineered to express a CD16-chimeric antigen receptor redirect T-cell immune responses against immunoglobulin G-opsonized target cells. *Cytotherapy*. 2016 Feb;18(2):278–90.
 29. Minutolo NG, Hollander EE, Powell DJ. The Emergence of Universal Immune Receptor T Cell Therapy for Cancer. *Front Oncol*. 2019;9:176.
 30. Clémenceau B, Vivien R, Pellat C, Foss M, Thibault G, Vié H. The human natural killer cytotoxic cell line NK-92, once armed with a murine CD16 receptor, represents a convenient cellular tool for the screening of mouse mAbs according to their ADCC potential. *MABs*. 2013 Jul 1;5(4):587–94.
 31. Gallot G, Vivien R, Ibisch C, Lulé J, Davrinche C, Gaschet J, et al. Purification of Ag-specific T lymphocytes after direct peripheral blood mononuclear cell stimulation followed by CD25 selection. I. Application to CD4(+) or CD8(+) cytomegalovirus phosphoprotein pp65 epitope determination. *J Immunol*. 2001 Oct 15;167(8):4196–206.

32. Liu D, Badeti S, Dotti G, Jiang JG, Wang H, Dermody J, et al. The Role of Immunological Synapse in Predicting the Efficacy of Chimeric Antigen Receptor (CAR) Immunotherapy. *Cell Commun Signal*. 2020 Aug 25;18(1):134.
33. Jiménez-Morales S, Aranda-Urbe IS, Pérez-Amado CJ, Ramírez-Bello J, Hidalgo-Miranda A. Mechanisms of Immunosuppressive Tumor Evasion: Focus on Acute Lymphoblastic Leukemia. *Front Immunol*. 2021;12:737340.
34. Uhlen M, Oksvold P, Fagerberg L, Lundberg E, Jonasson K, Forsberg M, et al. Towards a knowledge-based Human Protein Atlas. *Nat Biotechnol*. 2010 Dec;28(12):1248–50.
35. Uhlen M, Zhang C, Lee S, Sjöstedt E, Fagerberg L, Bidkhor G, et al. A pathology atlas of the human cancer transcriptome. *Science*. 2017 Aug 18;357(6352):eaan2507.
36. Lin Z, Tang X, Cao Y, Yang L, Jiang M, Li X, et al. CD229 interacts with RASAL3 to activate RAS/ERK pathway in multiple myeloma proliferation. *Aging (Albany NY)*. 2022 Nov 28;14(22):9264–79.
37. Stamenkovic I, Sgroi D, Aruffo A, Sy MS, Anderson T. The B lymphocyte adhesion molecule CD22 interacts with leukocyte common antigen CD45RO on T cells and alpha 2-6 sialyltransferase, CD75, on B cells. *Cell*. 1991 Sep 20;66(6):1133–44.
38. Fann DY, Nickles EP, Poh L, Rajeev V, Selvaraji S, Schwarz H, et al. CD137 Ligand-CD137 Interaction is Required For Inflammasome-Associated Brain Injury Following Ischemic Stroke. *Neuromolecular Med*. 2020 Dec;22(4):474–83.
39. Wang S, Xiao Y, An X, Luo L, Gong K, Yu D. A comprehensive review of the literature on CD10: its function, clinical application, and prospects. *Front Pharmacol*. 2024;15:1336310.
40. de Rie MA, Schumacher TN, van Schijndel GM, van Lier RA, Miedema F. Regulatory role of CD19 molecules in B-cell activation and differentiation. *Cell Immunol*. 1989 Feb;118(2):368–81.
41. Pavlasova G, Mraz M. The regulation and function of CD20: an ‘enigma’ of B-cell biology and targeted therapy. *Haematologica*. 2020 Jun;105(6):1494–506.
42. Barkal AA, Brewer RE, Markovic M, Kowarsky M, Barkal SA, Zaro BW, et al. CD24 signalling through macrophage Siglec-10 is a target for cancer immunotherapy. *Nature*. 2019 Aug;572(7769):392–6.
43. Barclay AN, Van den Berg TK. The interaction between signal regulatory protein alpha (SIRPα) and CD47: structure, function, and therapeutic target. *Annu Rev Immunol*. 2014;32:25–50.
44. van Dongen JJM, Lhermitte L, Böttcher S, Almeida J, van der Velden VHJ, Flores-Montero J, et al. EuroFlow antibody panels for standardized n-dimensional flow cytometric immunophenotyping of normal, reactive and malignant leukocytes. *Leukemia*. 2012 Sep;26(9):1908–75.
45. Boris E, Theron A, Montagnon V, Rouquier N, Almeras M, Moreaux J, et al. Immunophenotypic portrait of leukemia-associated-phenotype markers in B acute lymphoblastic leukemia. *Cytometry B Clin Cytom*. 2024 Jan;106(1):45–57.
46. Velders MP, van Rhijn CM, Oskam E, Fleuren GJ, Warnaar SO, Litvinov SV. c. Br J Cancer. 1998 Aug;78(4):478–83.
47. Cleary KLS, Chan HTC, James S, Glennie MJ, Cragg MS. Antibody Distance from the Cell Membrane Regulates Antibody Effector Mechanisms. *J Immunol*. 2017 May 15;198(10):3999–4011.
48. Acharya P, Tolbert WD, Gohain N, Wu X, Yu L, Liu T, et al. Structural definition of an antibody-dependent cellular cytotoxicity response implicated in reduced risk for HIV-1 infection. *J Virol*. 2014 Nov;88(21):12895–906.
49. Panagiotou E, Syrigos NK, Charpidou A, Kotteas E, Vathiotis IA. CD24: A Novel

- Target for Cancer Immunotherapy. *J Pers Med*. 2022 Jul 28;12(8):1235.
50. Fang X, Zheng P, Tang J, Liu Y. CD24: from A to Z. *Cell Mol Immunol*. 2010 Mar;7(2):100–3.
 51. Altevogt P, Sammar M, Hüser L, Kristiansen G. Novel insights into the function of CD24: A driving force in cancer. *Int J Cancer*. 2021 Feb 1;148(3):546–59.
 52. Eyvazi S, Kazemi B, Dastmalchi S, Bandehpour M. Involvement of CD24 in Multiple Cancer Related Pathways Makes It an Interesting New Target for Cancer Therapy. *Curr Cancer Drug Targets*. 2018;18(4):328–36.
 53. Fischer A, Blanche S, Le Bidois J, Bordigoni P, Garnier JL, Niaudet P, et al. Anti-B-cell monoclonal antibodies in the treatment of severe B-cell lymphoproliferative syndrome following bone marrow and organ transplantation. *N Engl J Med*. 1991 May 23;324(21):1451–6.
 54. Benkerrou M, Jais JP, Leblond V, Durandy A, Sutton L, Bordigoni P, et al. Anti-B-cell monoclonal antibody treatment of severe posttransplant B-lymphoproliferative disorder: prognostic factors and long-term outcome. *Blood*. 1998 Nov 1;92(9):3137–47.
 55. Duffy MJ, Mullooly M, O'Donovan N, Sukor S, Crown J, Pierce A, et al. The ADAMs family of proteases: new biomarkers and therapeutic targets for cancer? *Clin Proteomics*. 2011 Jun 9;8(1):9.
 56. Waldhauer I, Goehlsdorf D, Gieseke F, Weinschenk T, Wittenbrink M, Ludwig A, et al. Tumor-associated MICA is shed by ADAM proteases. *Cancer Res*. 2008 Aug 1;68(15):6368–76.
 57. Saftig P, Reiss K. The 'A Disintegrin And Metalloproteases' ADAM10 and ADAM17: novel drug targets with therapeutic potential? *Eur J Cell Biol*. 2011;90(6–7):527–35.
 58. Kopan R, Ilagan MXG. The canonical Notch signaling pathway: unfolding the activation mechanism. *Cell*. 2009 Apr 17;137(2):216–33.
 59. Zocchi MR, Camodeca C, Nuti E, Rossello A, Venè R, Tosetti F, et al. ADAM10 new selective inhibitors reduce NKG2D ligand release sensitizing Hodgkin lymphoma cells to NKG2D-mediated killing. *Oncoimmunology*. 2016 May;5(5):e1123367.
 60. Wu E, Croucher PI, McKie N. Expression of members of the novel membrane linked metalloproteinase family ADAM in cells derived from a range of haematological malignancies. *Biochem Biophys Res Commun*. 1997 Jun 18;235(2):437–42.
 61. Tosetti F, Venè R, Camodeca C, Nuti E, Rossello A, D'Arrigo C, et al. Specific ADAM10 inhibitors localize in exosome-like vesicles released by Hodgkin lymphoma and stromal cells and prevent sheddase activity carried to bystander cells. *Oncoimmunology*. 2018;7(5):e1421889.
 62. Eichenauer DA, Simhadri VL, von Strandmann EP, Ludwig A, Matthews V, Reiners KS, et al. ADAM10 inhibition of human CD30 shedding increases specificity of targeted immunotherapy in vitro. *Cancer Res*. 2007 Jan 1;67(1):332–8.
 63. Witters L, Scherle P, Friedman S, Fridman J, Caulder E, Newton R, et al. Synergistic inhibition with a dual epidermal growth factor receptor/HER-2/neu tyrosine kinase inhibitor and a disintegrin and metalloprotease inhibitor. *Cancer Res*. 2008 Sep 1;68(17):7083–9.
 64. Janes PW, Saha N, Barton WA, Kolev MV, Wimmer-Kleikamp SH, Nievergall E, et al. Adam meets Eph: an ADAM substrate recognition module acts as a molecular switch for ephrin cleavage in trans. *Cell*. 2005 Oct 21;123(2):291–304.
 65. Atapattu L, Saha N, Llerena C, Vail ME, Scott AM, Nikolov DB, et al. Antibodies binding the ADAM10 substrate recognition domain inhibit Eph function. *J Cell Sci*. 2012 Dec 15;125(Pt 24):6084–93.
 66. Atapattu L, Saha N, Chheang C, Eissman MF, Xu K, Vail ME, et al. An activated form of ADAM10 is tumor selective and regulates cancer stem-like cells and tumor growth. *J*

Exp Med. 2016 Aug 22;213(9):1741–57.

67. Yan H, Vail ME, Hii L, Guo N, McMurrick PJ, Oliva K, et al. Preferential Antibody and Drug Conjugate Targeting of the ADAM10 Metalloprotease in Tumours. *Cancers (Basel)*. 2022 Jun 28;14(13):3171.

68. Saha N, Baek DS, Mendoza RP, Robev D, Xu Y, Goldgur Y, et al. Fully human monoclonal antibody targeting activated ADAM10 on colorectal cancer cells. *Biomed Pharmacother*. 2023 May;161:114494.

69. Oostindie SC, van der Horst HJ, Lindorfer MA, Cook EM, Tupitza JC, Zent CS, et al. CD20 and CD37 antibodies synergize to activate complement by Fc-mediated clustering. *Haematologica*. 2019 Sep;104(9):1841–52.

70. Jacobsen HJ, Poulsen TT, Dahlman A, Kjær I, Koefoed K, Sen JW, et al. Pan-HER, an Antibody Mixture Simultaneously Targeting EGFR, HER2, and HER3, Effectively Overcomes Tumor Heterogeneity and Plasticity. *Clin Cancer Res*. 2015 Sep 15;21(18):4110–22.

71. Spiridon CI, Ghetie MA, Uhr J, Marches R, Li JL, Shen GL, et al. Targeting Multiple Her-2 Epitopes with Monoclonal Antibodies Results in Improved Antigrowth Activity of a Human Breast Cancer Cell Line in Vitro and in Vivo. *Int J Cancer*. 2012;131(1):1–12.

72. Zhai L, Zhang L, Jiang Y, Li B, Yang M, Victorovich KV, et al. Broadly neutralizing antibodies recognizing different antigenic epitopes act synergistically against the influenza B virus. *J Med Virol*. 2023 Jan;95(1):e28106.

73. Ramirez Valdez KP, Kuwata T, Maruta Y, Tanaka K, Alam M, Yoshimura K, et al. Complementary and synergistic activities of anti-V3, CD4bs and CD4i antibodies derived from a single individual can cover a wide range of HIV-1 strains. *Virology*. 2015 Jan 15;475:187–203.

74. Yaffe ZA, Ding S, Sung K, Chohan V, Marchitto L, Doecker L, et al. Reconstruction of a polyclonal ADCC antibody repertoire from an HIV-1 non-transmitting mother. *iScience*. 2023 May 19;26(5):106762.

75. Pollara J, Bonsignori M, Moody MA, Liu P, Alam SM, Hwang KK, et al. HIV-1 vaccine-induced C1 and V2 Env-specific antibodies synergize for increased antiviral activities. *J Virol*. 2014 Jul;88(14):7715–26.

76. He W, Tan GS, Mullarkey CE, Lee AJ, Lam MMW, Krammer F, et al. Epitope specificity plays a critical role in regulating antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity against influenza A virus. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2016 Oct 18;113(42):11931–6.

77. Melenhorst JJ, Scheinberg P, Williams A, Ambrozak DR, Keyvanfar K, Smith M, et al. Alloreactivity across HLA barriers is mediated by both naïve and antigen-experienced T cells. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2011 Jun;17(6):800–9.

78. Wu G, Guo S, Luo Q, Wang X, Deng W, Ouyang G, et al. Preclinical evaluation of CD70-specific CAR T cells targeting acute myeloid leukemia. *Front Immunol*. 2023 Feb 10;14:1093750.

79. Tigu AB, Constantinescu CS, Teodorescu P, Kegyes D, Munteanu R, Feder R, et al. Design and preclinical testing of an anti-CD41 CAR T cell for the treatment of acute megakaryoblastic leukaemia. *J Cell Mol Med*. 2023 Sep 4;27(19):2864–75.

SUPPLEMENTARY DATA

Table S1: Clones of PE-coupled murin antibodies (mAb) provided in the Human Cell Surface Marker Screening Kit (Biolegend® Europe B.V, Amsterdam, The Netherlands), and of purified mAb used for ADCC assays.

Antigen	Clones of PE-coupled mAb (Human Cell Surface Marker Screening Kit)	Clones of purified mAb
CD10	HI10a m IgG1	HI10a m IgG1
CD19	HIB19 mIgG1	HIB19 mIgG1
CD20	2H7 mIgG2b	AT80 mIgG1
CD22	S-HCL-1 mIgG2b	S-HCL-1 mIgG2b
CD24	ML5 mIgG2a	ML5 mIgG2a
CD47	CC2C6 mIgG1	CC2C6 mIgG1
CD71	CY1G4 mIgG2a	MCA1148 mIgG1
CD74	LN2 mIgG1	LN2 mIgG1
CD123	6H6 mIgG1	6H6 mIgG1
CD137	4B4-1 mIgG1	4B4-1 mIgG1
CD135	BV10A4H2 mIgG1	BV10A4H2 mIgG1
CD156c	SHM14 mIgG1	SHM14 mIgG1
CD205	HD83 mIgG1	HD83 mIgG1
CD229	H Ly 9.1.25 mIgG1	H Ly 9.1.25 mIgG1
CD268	11C1 mIgG1	11C1 mIgG1

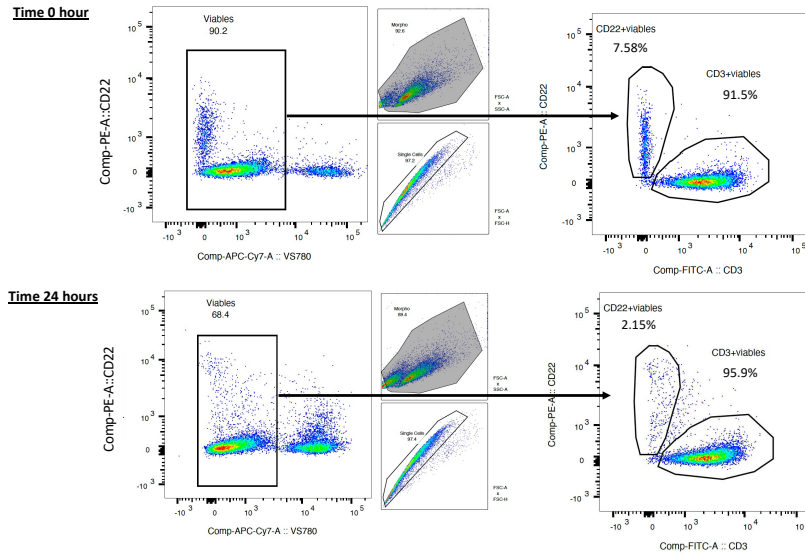


Figure S2: Gating strategy for long-term ADCC assay analysis. BCP-ALL Target cells (80,000 cells/well) were sensitized with murine mAb and plated with ADCC effector T-cells, in X-Vivo-15 media (Lonza®, Basel, Switzerland) at the E:T ratio 3:1, in a flat-bottom 96 wells plate and incubated at 37 °C. At different time points: 0 hr (H0), and 24 hr (H24) after co-culture, cell suspension was collected and labelled with a Fixable Viability Stain 780 (BD Biosciences®, Le Pont de Claix, France) and then with a PE-coupled anti-CD22 antibody (Dako® product provided by Technologies Agilent France, Les Ulis, France) and a FITC-coupled anti-CD3 antibody (Beckman Coulter® France SAS, Roissy, France). For data analysis, a first logical gate was based on FCS/SSC, then singlets were isolated. Secondly, viable (VS780low cells were isolated. A last gate on CD22+, and CD3+ cells allowed to identify leukemic cells and T cells respectively.

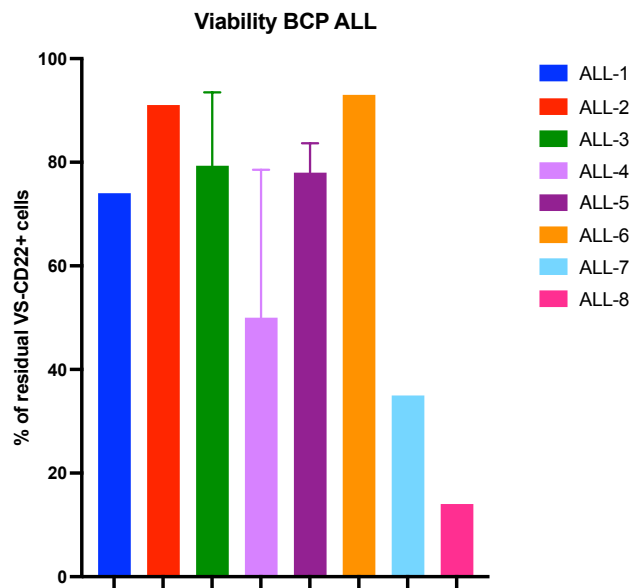


Figure S3: Viability of BCP-ALL after 24h of culture in serum free medium alone. For each long term ADCC assay, leukemic cells were plated (80.000 cell/wells) in X-Vivo-15 culture media and incubated at 37 °C. At 0 h (H0), and 24 h (H24) of co-culture, residual viable cells were analyzed by MFC. The percentage of singlet, viable (VS780^{low}) and CD22⁺, at 24 hours of culture, are presented here.

Article 2 : Efficacité *in vitro* de CAR T-cells anti-HER2 en traitement de LAL B

Baptiste Le Calvez ; Jocelyn Ollier ; Elodie Guiet ; Marie C Béné ; Patrice Chevallier ; Marion Eveillard ; Béatrice Clémenceau ;
Audrey Grain

Ce travail est en cours de finalisation avant relecture par un traducteur anglophone et soumission

Introduction : Au décours d'un traitement par cellules CAR T- anti CD19, 50% des patients vont rechuter et pour 40% d'entre eux la rechute sera liée à une perte d'expression de l'antigène ciblé, par modulation antigénique. La recherche de nouvelles cibles thérapeutiques semble donc essentielle. HER2 est exprimé dans plus de 30% des LAL B de l'adulte et dans 10 % des LAL B pédiatriques. Son expression est associée une chimiorésistance et à un pronostic péjoratif. Ainsi, l'efficacité du trastuzumab (Ac anti-HER2), a été évaluée de manière prospective chez des patients adultes atteints de LAL B R/R, mais les résultats ont été décevants. Les lymphocytes T exprimant un récepteur chimérique à l'antigène (CAR) anti-HER2 pourraient constituer une alternative intéressante.

Méthode : Nous avons pu analyser des échantillons de 7 LAL-B primaires HER2⁺. Le niveau d'expression de HER2 dans les échantillons a été déterminé par cytométrie de flux. Une lignée cellulaire de cancer du sein sur-exprimant HER2 (BT474) a été utilisé comme contrôle. Des tests de cytotoxicité sur 24 heures ont été menés en utilisant des CTL anti-EBV provenant d'un donneur sain et équipés d'un CAR anti-HER 2 ou d'un récepteur CD16 en association avec le trastuzumab (Ac anti-HER2) (stratégie « ADCC »).

Résultats : Le niveau d'expression de HER2 des LAL B sélectionnées était variable, avec un ratio d'intensité de fluorescence (RFI) médian de 9 (2-16). Ces niveaux d'expression étaient inférieurs à ceux de la lignée cellulaire BT474 (RFI= 79). Après 24h de coculture nous avons mis en évidence une cytotoxicité plus importante avec l'utilisation de cellules T-CAR anti-HER2, qu'avec une stratégie d'ADCC.

Conclusion : Ces données préliminaires suggèrent que Her2 pourrait être cible d'intérêt dans certaine LAL-B de haut risque. Une approche CAR-T anti-HER2 pourrait être prometteuse pour le traitement de ces LAL-B, et ce malgré de faibles niveaux d'expression antigénique.

Ce travail a fait l'objet :

- **D'une communication orale au congrès de la Société Française de Pédiatrie (SFP) 15-17 mai 2024**
- **D'une communication orale au congrès annuel de la Société Francophone de Greffe de Moelle et de Thérapie cellulaire (SFGM-TC) 20-22 Novembre 2024**

Title: Pre-clinical evaluation of engineered T-cell targeting human epidermal growth factor 2 (HER2) in acute lymphoblastic leukemia

Baptiste Le Calvez^{1,2}, Jocelyn Ollier¹, Elodie Guet¹, Marie C Béné¹, Patrice Chevallier³, Marion Eveillard⁴, Béatrice Clémenceau¹, Audrey Grain^{1,2}

1.Nantes University, Inserm UMR 1307, CNRS UMR 6075, Angers University, CRCI²NA, Nantes - France

2. Pediatric hematology and oncology Nantes University Hospital, Nantes, France

3. Hematology, Nantes University Hospital, Nantes, France

4. Hematology Biology, Nantes University Hospital, Nantes, France

ACKNOWLEDGEMENTS:

Baptiste Le Calvez research was funded by the grant Etoile de Martin/ SFCE price 2022 provided by the non-profit organization Etoile de Martin/SFCE.

The authors acknowledge the Cytocell - Flow Cytometry and FACS core facility (SFR Bonamy, BioCore, Inserm UMS 016, CNRS UAR 3556, Nantes, France) for its technical expertise and help, member of the Scientific Interest Group (GIS) Biogenouest and the Labex IGO program supported by the French National Research Agency (n°ANR-11-LABX-0016-01)

Introduction:

B-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia (BCP-ALL) accounts for 80% of acute leukemias in children and around 20% in adults. Current therapeutic strategies, based on intensive chemotherapy, enable most patients to be cured. However, around 30% of adults¹ and 15% of children² relapse after a first line of treatment. The prognosis for these relapsed patients is extremely poor.³ For these chemoresistant BCP-ALL, monoclonal antibodies such as rituximab (anti-CD20), blinatumomab (bispecific anti-CD19-CD3 T-cell engager), and inotuzumab-ozogamicin (anti-CD22 antibody conjugated to calicheamicin) have shown encouraging results.⁴⁻⁶ Although associated with high complete remission (CR) rates, tumor escape is frequently observed after several cycles of these targeted therapies, particularly in the absence of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. More recently, genetically modified autologous T-cells expressing a chimeric antigen receptor (CAR) directed against CD19 have been developed (CAR-T cells). In the phase II ELIANA study⁷, tisagenlecleucel (tisa-cel) achieved 81% CR at 3 months in a pediatric population of refractory/relapsed (R/R) BCP-ALL. Unfortunately, around 50% of these patients relapsed within two years.⁸ In about 40% of the cases, blasts no longer expressed the antigen previously targeted.⁹⁻¹³ Because multitargeting strategies could avoid tumoral escape through antigen modulation, new targets are therefore needed.

Human Epidermal Growth Factor Receptor-2 (HER2), known for its expression on breast cancer cells, is also expressed in over 30% of adult¹⁴ and 10% of childhood BCP-ALL.¹⁵ Interestingly, HER2 does not appear to be expressed by normal B progenitors,¹⁵ yet its expression by BCP-ALL cells is associated with chemoresistance and poor prognosis.¹⁴⁻¹⁵ HER2 thus could be an interesting target for BCP-ALL HER2⁺ patients. Trastuzumab is a humanized monoclonal antibody directed against HER2 widely used in solid tumor oncology. A pre-clinical study showed NK activation directed against BCP-ALL cells in the presence of this antibody.¹⁶ Trastuzumab was moreover prospectively tested in adult patients with HER2⁺ relapsed or refractory BCP-ALL but yielded disappointing results when used as single agent.¹⁷ Anti-HER2 adoptive T-cells therapies could therefore be interesting alternatives. Indeed, anti-HER2 CAR T-cells have shown encouraging preclinical efficacy in solid tumors expressing HER2.¹⁸ Tolerance appeared to depend on the CAR construct and the HER2 epitope targeted. However, due to the physiological expression of HER2 in different tissues, in particular the myocardium, "on target-off tumor" effects have been described.¹⁹⁻²¹ To our knowledge, no anti-HER2 cell therapy has however been developed for BCP-ALL.

The present work is a pre-clinical study that was designed to evaluate, *in vitro*, the sensitivity of BCP-ALL blasts to HER2 targeted therapy. Trastuzumab specificity was used in two innovative cellular cytotoxicity assays respectively with anti-HER2 engineered CAR T-cells and with CD16-transfected T-cells mimicking NK-cell antibody dependent cell mediated cytotoxicity (ADCC) via anti-HER2 antibodies.

Material and methods:

Cells

Leukemic samples

Bone marrow aspiration samples were collected at diagnosis or relapse for immunophenotyping from adult patients who presented with a BCP-ALL, in the hematology unit of Nantes University Hospital. Residual samples were submitted to density gradient centrifugation on a Ficoll-Paque solution (Eurobio, Les Ullis, France), and blasts frozen in fetal calf bovine serum 10% dimethylsulfoxide (DMSO). The preclinical study that used this biocollection was approved by the local ethic committee (Groupe Nantais d’Ethique dans le Domaine de la Santé). Patients provided an informed signed non-opposition form for the biocollection. Investigations were therefore conducted in accordance with the principles of the Declaration of Helsinki.

Effector cells:

Anti-EBV cytotoxic T lymphocytes (CTLs) were armed with a trastuzumab-based scFv-CH2-CH3-IgG2a-Fc ϵ RI γ CAR (CAR anti-HER2 CTLs) as previously described²² and were used for long-term cytotoxicity assays (Supplemental Figure 1). Anti-EBV CTLs were also transduced by a retroviral vector allowing for the expression of a chimeric-receptor containing the murine CD16 receptor Fc γ RIII, linked to the intracellular human-chain Fc ϵ RI γ , conferring an ADCC capacity to T-cells²³ (mCD16-CTLs) (Supplemental Figure 1). As mouse CD16 can detect human IgG1 isotypes²⁴, mCD16-h γ -lymphocytes are able to mediate ADCC against both human cells opsonized with murine IgG1, 2a and 2b monoclonal antibodies (mAbs) but also with human IgG1mAbs. For long-term ADCC assays, these mCD16-CTLs were used in combination with trastuzumab (humanized recombinant anti-HER2 IgG1 [clone 4D5]).

Non-transduced anti-EBV CTLs were used as controls as well as cells not exposed to trastuzumab. These CTLs were cultured at 37°C in X-VIVO-15 medium (Lonza) completed with 4% of human serum.

Immunophenotyping

The level of HER2 expression on BCP-ALL samples was determined by flow cytometry and compared to the HER2-expressing breast-cancer cell line BT474. Cells were washed with phosphate buffered saline (PBS) and 0.02% ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) and with PBS before being labelled with an anti-Her2 antibody (Anti-HER-2/neu, clone Neu 24.7, BD Biosciences, San Jose, CA) coupled to phycoerythrin (PE) for 10 min at room temperature (RT) in the dark. After two more washes with PBS supplemented with 0.1% human albumin, cells were fixed in a paraformaldehyde solution (1%) before analysis by flow cytometry on a BD FACSCanto II (Cytocell - Flow Cytometry and FACS core facility SFR Bonamy, BioCore, Inserm UMS 016, CNRS UAR 3556, Nantes, France). Results are expressed as relative fluorescence intensity (RFI) defined as the ratio of specific fluorescence over nonspecific fluorescence (mean fluorescence of cells incubated with mouse isotype control).

For one sample, HER2 expression was assessed on residual viable cells after cytotoxic tests, using an antibody (clone Neu 24.7) recognizing a different epitope from that of trastuzumab (clone 4D5).

Long term cytotoxicity assays:

Leukemic cell lysis was evaluated by using long term cytotoxicity assays over 24 hours, which better reflect *in vivo* responses.²⁵ Blasts were thawed and cultured for 24 hours in X-VIVO-15 medium (Lonza).

Anti-HER2 CAR T-cells were then added to the blasts at a 3:1 effector/target (E/T) ratio using 80,000 blast cells per well in flat-bottom 96 well plates and cultured for 24 hours.

For ADCC, target cells (80,000 cells/well) were first sensitized for 15 min with anti-HER2 antibodies at a final concentration of 1 µg/mL as previously determined. ADCC effector T-cells were then added at a 3:1 E:T ratio and the plates incubated at 37°C for 24 hours. Different purified anti-HER2 antibodies recognizing different epitopes were tested (trastuzumab [anti-human HER2 Ac: clone 4D5], murine anti-HER2 cERB2 3B5, murine anti-HER2 cERB2 9G6). For both assays, cells from predesigned wells were collected at 0 (H0), 4 (H4), and 24 (H24) hours after co-culture. They were then washed with PBS-EDTA (0.02%) and with PBS before being labelled with a viability dye (Fixable Viability Stain 780; BD Biosciences) for 10 min at RT. After two washes, cell suspensions were stained for 15 min at RT with a PE-coupled anti-CD22 antibody (Dako®, Agilent Technologies, Santa Clara, CA) to identify BCP-ALL blasts, and an anti-CD3 antibody conjugated to fluorescein isothiocyanate (Beckman Coulter, Miami, FL) to recognize effector T-cells. After two more washes with PBS supplemented with 0.1%

human albumin, cells were fixed with a paraformaldehyde (PFA) solution (1%) before analysis by flow cytometry. A total of 10 000 events in the viable CD3⁺ gate was acquired. For each condition, viable leukemic cells (VS780^{low}/CD22⁺) at H0 were normalized as 100%. At H24, the percentage of residual viable leukemic cells was established as (count of viable CD22⁺ cells at H24/ count of viable CD22⁺ cells at H0) × 100. The viability of BCP-ALL was checked under the conditions in which they were cultured alone. Cytotoxicity controls consisted in BCP-ALL incubated with either anti-HER-2 mAbs alone or mCD16-CTLs alone.

Results:

DMSO-frozen cell-samples from 6 HER2⁺ BCP-ALL patients were available for this study. Patient characteristics are shown in Table 1.

A variable level of expression of HER2 was observed between patients, with a median relative fluorescence intensity ratio (RFI) of 9 (range 2 to 16). These levels of expression were much lower than those of the BT474 breast-cancer cell line which displays an RFI of 79 (Figure 1). When cocultured with anti-HER2-CAR engineered CTLs, a high rate of BCP-ALL lysis was observed at 24 hours, with a median of 73% (range 50-97) (Figure 2A). When blasts were co-cultured with non-transduced anti-EBV CTLs (CAR negative) (n=4), a decrease of residual viable BCP-ALL cells was observed at variable but significant levels (Figure 2B). Lysis percentages provided by anti-HER2-CAR engineered CTLs were significantly higher than those observed with non-transduced anti-EBV CTLs (p=0.004) (Figure 2B). Non-CAR-related lysis observed at 24h was possibly due to allogeneic recognition (TCR dependent) since anti-EBV CTLs were not autologous to the leukemias tested. This unspecific lysis had to be taken into account in cytotoxicity assay interpretation. Thus, “lysis scores” were calculated by subtracting the percentage of lysis observed in the presence of non-transduced CTLs from the percentage of lysis observed in the presence of effectors equipped with the anti-HER CAR or CD16 (Figure 3).

The kinetics of BCP-ALL cell lysis was relatively stereotyped, the percentage of lysis increasing between 4 and 24 hours (Figure 2C). There was no correlation between HER2 expression levels and the lysis level.

ADCC activity of mCD16-CTLs induced lower levels of blast-cell lysis than CAR-T-cells, with median lysis scores of 12% (range: 8-15%) (Figure 3). Again, ADCC lysis did not correlate with the level of HER2 expression. Pre-incubation of BCP-ALL cells with trastuzumab did not prevent the binding of either the anti-HER2 coupled-antibody used for labelling (clone Neu 24.7) nor of the anti-CD22 purified antibody used for cytotoxic assays. After cytotoxic assays

with anti-HER2-CAR engineered CTLs or mCD16-CTLs associated with trastuzumab, a significant decrease of HER2 expression was observed on remaining viable cells (Supplemental Figure 2).

Discussion:

This *in vitro* pre-clinical, proof-of-concept study assessed the value of targeting HER2 on BCP-ALL blasts, using T-cells equipped either with an anti-HER2 CAR or a CD16 receptor in combination with anti-HER2 antibodies ("ADCC" strategy). Anti-HER2 CAR T-cells displayed an encouraging significant cytolytic activity, while the ADCC model was less successful.

In the recently published observation of the efficacy of another model of T lymphocytes equipped with the FcγRI (CD64) receptor (a receptor with high affinity for immunoglobulin constant fragment) associated with trastuzumab in solid tumor models²⁶, ADCC activity correlated with the level of expression of the targeted antigen. This was also shown in some publications²⁷⁻³⁰, while others demonstrated the importance of epitope affinity of the antibody used³⁰⁻³¹. Of note cells used in these various models of solid tumors express much higher levels of HER2 than those detected on BCP-ALL. The lower expression of HER2 on the surface of BCP-ALL could explain the lower lysis rates observed with the ADCC strategy. More recently, margetuximab, an anti-HER2 monoclonal antibody derived from the same clone as trastuzumab, but with an Fc fragment genetically modified to increase its affinity for FcγRIIIa (CD16)³³ has shown a greater ability to induce ADCC *in vitro* than trastuzumab. Its use in combination with effector T lymphocytes equipped with FcγRIIIa (CD16) could improve anti-HER2 ADCC activity.

Although associated with significant cytotoxic activity, anti-HER2 CAR T-cells did not eradicate 100% of blast cells within 24 hours. Flow analysis of residual BCP-ALL cocultured with anti-HER2 CAR engineered EBV CTLs cells showed the persistence of a residual population expressing high levels of CD22 but low levels of HER2 (Supplemental Figure 2). This observation argues in favour of exploring multi target strategies.

Owing to the lower but yet significant efficacy of ADCC activity, the mCD16 T-cells technology could enable to explore strategies that target several membrane antigens simultaneously. Such a strategy would accommodate the non-specific CD16-transfected cells ability to bind any kind of targeted antibody bound to target cells. In the same line of thought, CAR T-cells carrying scFvs capable of recognizing HER2 and CD19 have shown interesting *in vitro* and *in vivo* results in solid tumor cell-lines.³⁴ Facing the encouraging activity of anti-HER2

CAR-T cells, the development of T-cell expressing both anti-HER2 CAR and CD16 could allow multitargeting strategy in patients pretreated with anti-CD19, anti-CD20, and anti-CD22 monoclonal antibodies, providing enough targets to these cytotoxic cells. Of course, this concept should first be evaluated in pre-clinical *in vitro* study and animal models.

Conclusion

This pre-clinical proof of concept study first demonstrated the interest of developing CAR T-cells directed to HER2 for BCP-ALL patients whose blasts express this antigen, even at low density. It moreover indicates the potential multi-target interest of T-cells engineered to express CD16 and providing ADCC mediated tumor cell lysis.

Table 1: Patient characteristics

Patient	Sex	Genetic abnormality	Sampling time	Percentage of HER2+ blasts	HER2 RFI
1	F	t(9;22)	Relapse	76	16
2	M	t(9;22)	Diagnosis	27	5
3	M	t(9;22)	Relapse	98	14
4	F	t(9;22)	Diagnosis	87	2
5	M	t(4;11)	Relapse	100	7
6	M	t(9;22)	Diagnosis	100	21

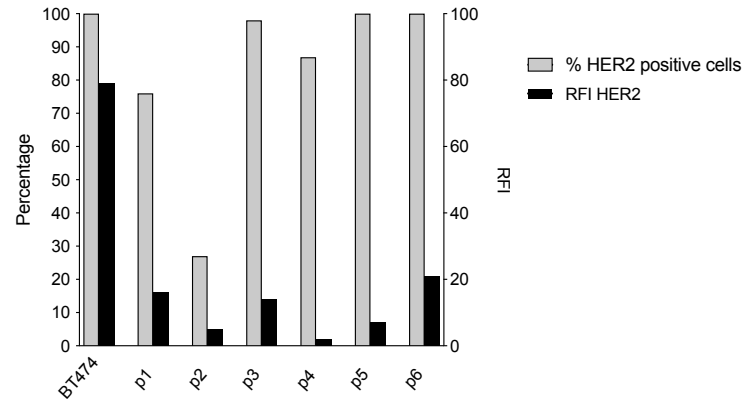


Figure 1. Percentage of HER2-expressing cells and HER-2 relative fluorescence intensity (*RFI*) for 6 BCP-ALL and the BT474 breast carcinoma line.

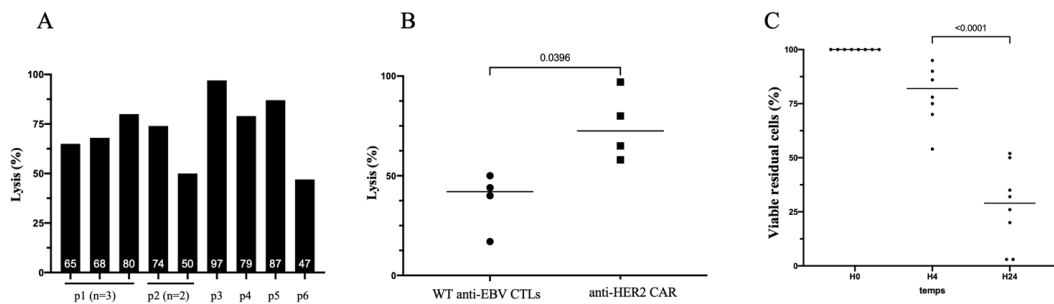


Figure 2. (A) Percentage of lysis observed in 6 BCP-ALL samples, after 24h of coculture with anti-HER2 CAR T-cells (Effector/Target (E/T) ratio =3:1). (B) Percentage of lysis observed for 4 BCP-ALL samples, after 24h of coculture with anti-HER2 CAR T cells (right) compared to non-transduced T-cells (left). (C) Lysis kinetics and mean viable residual BCP-ALL cells at H0, H4 and H24 of coculture with anti-EBV CTLs equipped with an anti-HER2 CAR.

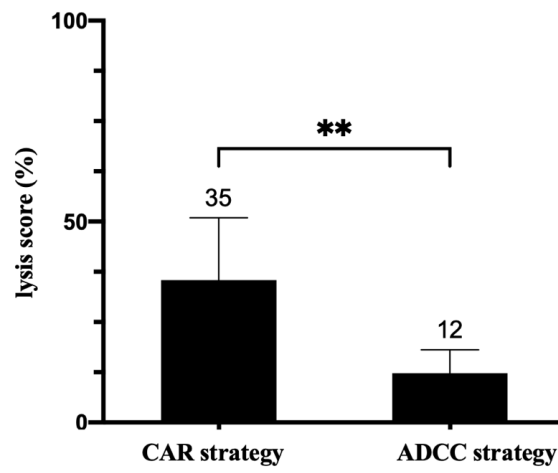
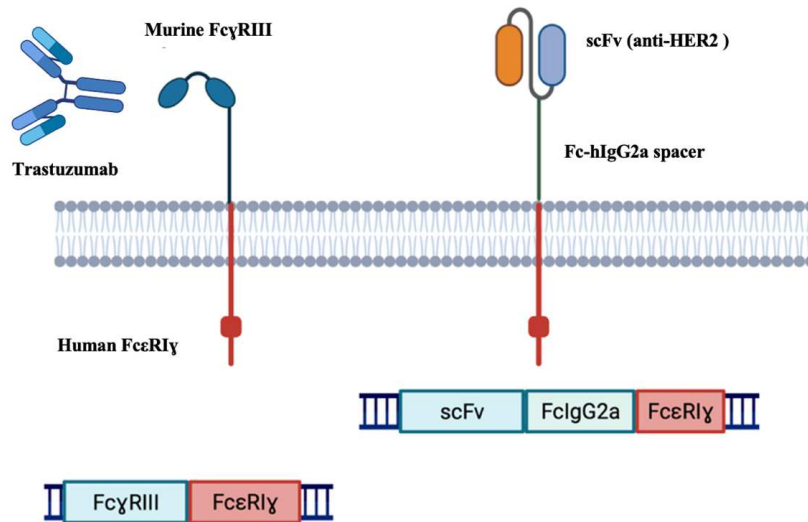
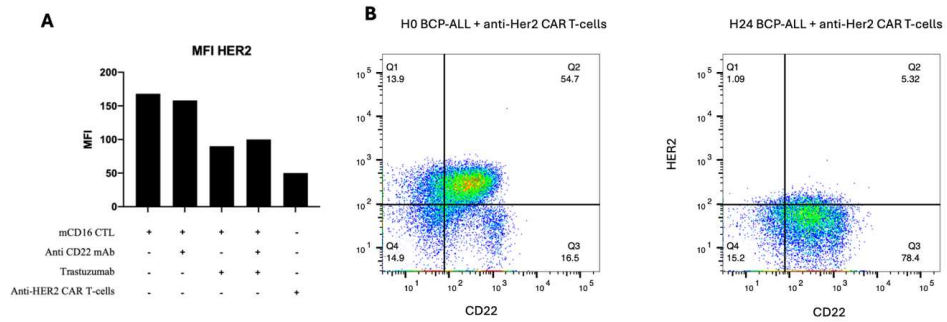


Figure 3. Median lysis score of 6 BCP-ALL after 24h of coculture with anti-HER2 CAR or mCD16- CTLs in combination with trastuzumab (1 μ g/ml), (Effector/Target (E/T) ratio =3:1).



Supplemental Figure 1: Schematic representation of the anti-HER2 CAR and the murine chimeric CD16 receptor. The FcγRIIIa/FcεRIγ (CD16) chimeric comprises the two extracellular domains (EC1 and EC2) of human CD16^{H48V158} and two amino acids (aa) of the extracellular domain of the human FcεRIγ (Pro4-Gln5), as well as the intact transmembrane (TM) and intracellular (IC) domains. The trastuzumab-based CAR contains the VL and VH from the mAb (clone 4D5), separated by a linker, the human CH2-CH3 IgG2 as a spacer, and the same signaling domain as that of CD16.



Supplemental Figure 2: (A) Expression of HER2 on residual viable BCP-ALL (mean fluorescence intensity [MFI]) after 24h of coculture under different conditions. (B) Expression of HER2 (using an antibody [clone Neu 24.7] recognizing a different epitope from that of trastuzumab) on blast cells at H0 and H24 of coculture of a BCP-ALL sample with anti-HER2 CAR.

REFERENCES:

1. Gökbüget N, Boissel N, Chiaretti S, et al. Management of ALL in adults: 2024 ELN recommendations from a European expert panel. *Blood*. 2024;143(19):1903-1930. doi:10.1182/blood.2023023568
2. Boissel N. In Adults with Ph-Negative Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL), Age-Adapted Chemotherapy Intensity and MRD-Driven Transplant Indication Significantly Reduces Treatment-Related Mortality (TRM) and Improves Overall Survival – Results from the Graall-2014 Trial. In: ASH; 2022. Accessed April 4, 2023. <https://ash.confex.com/ash/2022/webprogram/Paper157903.html>
3. Sun W, Malvar J, Spoto R, et al. Outcome of children with multiply relapsed B-cell acute lymphoblastic leukemia: a therapeutic advances in childhood leukemia & lymphoma study. *Leukemia*. 2018;32(11):2316-2325. doi:10.1038/s41375-018-0094-0
4. Maury S, Chevret S, Thomas X, et al. Rituximab in B-Lineage Adult Acute Lymphoblastic Leukemia. *N Engl J Med*. 2016;375(11):1044-1053. doi:10.1056/NEJMoa1605085
5. Kantarjian H, Stein A, Gökbüget N, et al. Blinatumomab versus Chemotherapy for Advanced Acute Lymphoblastic Leukemia. *N Engl J Med*. 2017;376(9):836-847. doi:10.1056/NEJMoa1609783
6. Kantarjian HM, DeAngelo DJ, Stelljes M, et al. Inotuzumab Ozogamicin versus Standard Therapy for Acute Lymphoblastic Leukemia. *N Engl J Med*. 2016;375(8):740-753. doi:10.1056/NEJMoa1509277
7. Maude SL, Laetsch TW, Buechner J, et al. Tisagenlecleucel in Children and Young Adults with B-Cell Lymphoblastic Leukemia. *N Engl J Med*. 2018;378(5):439-448. doi:10.1056/NEJMoa1709866
8. Laetsch TW, Maude SL, Rives S, et al. Three-Year Update of Tisagenlecleucel in Pediatric and Young Adult Patients With Relapsed/Refractory Acute Lymphoblastic Leukemia in the ELIANA Trial. *JCO*. 2023;41(9):1664-1669. doi:10.1200/JCO.22.00642
9. Schultz LM, Baggott C, Prabhu S, et al. Disease Burden Affects Outcomes in Pediatric and Young Adult B-Cell Lymphoblastic Leukemia After Commercial Tisagenlecleucel: A Pediatric Real-World Chimeric Antigen Receptor Consortium Report. *JCO*. 2022;40(9):945-955. doi:10.1200/JCO.20.03585
10. Orlando EJ, Han X, Tribouley C, et al. Genetic mechanisms of target antigen loss in CAR19 therapy of acute lymphoblastic leukemia. *Nat Med*. 2018;24(10):1504-1506. doi:10.1038/s41591-018-0146-z
11. Shah NN, Maatman T, Hari P, Johnson B. Multi Targeted CAR-T Cell Therapies for B-Cell Malignancies. *Front Oncol*. 2019;9:146. doi:10.3389/fonc.2019.00146
12. Mikhailova E, Illarionova O, Shelikhova L, et al. Immunophenotypic changes in leukemic blasts in children with relapsed/refractory B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia after treatment with CD19-directed chimeric antigen receptor (CAR)- expressing T cells. *haematol*. 2021;107(4):970-974. doi:10.3324/haematol.2021.279677
13. Dourthe ME, Rabian F, Yakouben K, et al. Determinants of CD19-positive vs CD19-negative relapse after tisagenlecleucel for B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*. Published online May 17, 2021. doi:10.1038/s41375-021-01281-7
14. Chevallier P, Robillard N, Willeme-Toumi S, Méchinaud F, Harousseau JL, Avet-Loiseau H. Overexpression of Her2/neu is observed in one third of adult acute lymphoblastic leukemia patients and is associated with chemoresistance in these patients. *Haematologica*. 2004;89(11):1399-1401.
15. Camuset M, Huault A, Grain A, et al. Therapeutic targets in childhood B-acute lymphoblastic leukemia: what about HER2/neu? *Hematological Oncology*. 2021;39(2):270-272. doi:10.1002/hon.2799
16. Haen SP, Schmiedel BJ, Rothfelder K, et al. Prognostic relevance of HER2/neu in acute lymphoblastic leukemia and induction of NK cell reactivity against primary ALL blasts by trastuzumab. *Oncotarget*. 2016;7(11):13013-13030. doi:10.18632/oncotarget.7344
17. Chevallier P, Robillard N, Charbonnier A, et al. Trastuzumab for treatment of refractory/relapsed HER2-positive adult B-ALL: results of a phase 2 GRAALL study. *Blood*. 2012;119(11):2474-2477. doi:10.1182/blood-2011-11-390781
18. Budi HS, Ahmad FN, Achmad H, et al. Human epidermal growth factor receptor 2 (HER2)-specific chimeric antigen receptor (CAR) for tumor immunotherapy; recent progress. *Stem Cell Res*

- Ther.* 2022;13(1):40. doi:10.1186/s13287-022-02719-0
19. Press MF, Cordon-Cardo C, Slamon DJ. Expression of the HER-2/neu proto-oncogene in normal human adult and fetal tissues. *Oncogene*. 1990;5(7):953-962.
 20. Dempsey N, Rosenthal A, Dabas N, Kropotova Y, Lippman M, Bishopric NH. Trastuzumab-induced cardiotoxicity: a review of clinical risk factors, pharmacologic prevention, and cardiotoxicity of other HER2-directed therapies. *Breast Cancer Res Treat.* 2021;188(1):21-36. doi:10.1007/s10549-021-06280-x
 21. Liu X, Zhang N, Shi H. Driving better and safer HER2-specific CARs for cancer therapy. *Oncotarget.* 2017;8(37):62730-62741. doi:10.18632/oncotarget.17528
 22. Clémenceau B, Valsesia-Wittmann S, Jallas AC, et al. In Vitro and In Vivo Comparison of Lymphocytes Transduced with a Human CD16 or with a Chimeric Antigen Receptor Reveals Potential Off-Target Interactions due to the IgG2 CH2-CH3 CAR-Spacer. *Journal of Immunology Research.* 2015;2015:1-13. doi:10.1155/2015/482089
 23. Clémenceau B, Vivien R, Pellat C, Foss M, Thibault G, Vié H. The human natural killer cytotoxic cell line NK-92, once armed with a murine CD16 receptor, represents a convenient cellular tool for the screening of mouse mAbs according to their ADCC potential. *Mabs.* 2013;5(4):587-594. doi:10.4161/mabs.25077
 24. Overdijk MB, Verploegen S, Ortiz Buijsse A, et al. Crosstalk between human IgG isotypes and murine effector cells. *J Immunol.* 2012;189(7):3430-3438. doi:10.4049/jimmunol.1200356
 25. Liu D, Badeti S, Dotti G, et al. The Role of Immunological Synapse in Predicting the Efficacy of Chimeric Antigen Receptor (CAR) Immunotherapy. *Cell Commun Signal.* 2020;18(1):134. doi:10.1186/s12964-020-00617-7
 26. Rasoulouniriana D, Santana-Magal N, Gutwillig A, et al. T Cells Expressing a Modified FcγRI Exert Antibody-Dependent Cytotoxicity and Overcome the Limitations of CAR T-cell Therapy against Solid Tumors. *Cancer Immunology Research.* 2023;11(6):792-809. doi:10.1158/2326-6066.CIR-22-0423
 27. Collins DM, Madden SF, Gaynor N, et al. Effects of HER Family-targeting Tyrosine Kinase Inhibitors on Antibody-dependent Cell-mediated Cytotoxicity in HER2-expressing Breast Cancer. *Clin Cancer Res.* 2021;27(3):807-818. doi:10.1158/1078-0432.CCR-20-2007
 28. Loeff FC, van Egmond HME, Nijmeijer BA, Falkenburg JHF, Halkes CJ, Jedema I. Complement-dependent cytotoxicity induced by therapeutic antibodies in B-cell acute lymphoblastic leukemia is dictated by target antigen expression levels and augmented by loss of membrane-bound complement inhibitors. *Leuk Lymphoma.* 2017;58(9):1-14. doi:10.1080/10428194.2017.1281411
 29. Derer S, Bauer P, Lohse S, et al. Impact of epidermal growth factor receptor (EGFR) cell surface expression levels on effector mechanisms of EGFR antibodies. *J Immunol.* 2012;189(11):5230-5239. doi:10.4049/jimmunol.1202037
 30. Velders MP, van Rhijn CM, Oskam E, Fleuren GJ, Warnaar SO, Litvinov SV. The impact of antigen density and antibody affinity on antibody-dependent cellular cytotoxicity: relevance for immunotherapy of carcinomas. *Br J Cancer.* 1998;78(4):478-483.
 31. Agus DB, Akita RW, Fox WD, et al. Targeting ligand-activated ErbB2 signaling inhibits breast and prostate tumor growth. *Cancer Cell.* 2002;2(2):127-137. doi:10.1016/s1535-6108(02)00097-1
 32. He W, Tan GS, Mullarkey CE, et al. Epitope specificity plays a critical role in regulating antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity against influenza A virus. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2016;113(42):11931-11936. doi:10.1073/pnas.1609316113
 33. Musolino A, Gradishar WJ, Rugo HS, et al. Role of Fcγ receptors in HER2-targeted breast cancer therapy. *J Immunother Cancer.* 2022;10(1):e003171. doi:10.1136/jitc-2021-003171
 34. Hombach AA, Ambrose C, Lobb R, Rennert P, Abken H. A CD19-Anti-ErbB2 scFv Engager Protein Enables CD19-Specific CAR T Cells to Eradicate ErbB2+ Solid Cancer. *Cells.* 2023;12(2):248. doi:10.3390/cells12020248

Article 3 : Deux stratégies de ciblage d'une rechute CD19 positive de LAL-B survenant après thérapie CAR-T anti-CD19.

Audrey Grain, Jocelyn Ollier, Thierry Guillaume, Patrice Chevallier, Baptiste Le Calvez, Marion Eveillard, Béatrice Clémenceau

Publié: Biomedicines. 2023 Jan 25;11(2):345. doi: 10.3390/biomedicines11020345. PMID: 36830882

Rationnel : Lors d'une rechute CD19⁺ après traitement par cellules CAR-T anti-CD19, une seconde injection de cellules CAR-T anti-CD19, ou l'utilisation d'Acs monoclonaux peuvent être discutées. Nous avons analysé le phénotype membranaire et la sensibilité à la lyse d'une rechute de LAL-B CD19⁺ après traitement par des cellules CAR-T anti-CD19. Les options thérapeutiques potentielles sont discutées.

Méthode : Les cellules issues de rechutes successives d'une LAL-B chez un même patient ont été collectées. Une analyse étendue du phénotype membranaire a été réalisée. La sensibilité à la lyse, induite via trois modes de reconnaissance différents (cytotoxicité cellulaire dépendante des Acs (ADCC), récepteur CAR anti-CD19 et TCR), a été analysée par des tests au ⁵¹Cr et par des tests de cytotoxicité sur 24 heures.

Résultats : L'expression des antigènes préalablement ciblés, diminuait dans les prélèvements issus des rechutes alors que de nouvelles cibles thérapeutiques apparaissaient. Les cellules issues des rechutes demeuraient sensibles à la lyse induite via le CAR anti-CD19, le TCR ou l'ADCC. Cependant la cinétique de la lyse cellulaire observée était différente selon le mode de reconnaissance utilisé. Par ailleurs, nous avons identifié une population monocyttaire potentiellement impliquée dans la perte des cellules CAR-T circulantes chez le patient.

Conclusion : Cette rechute CD19⁺ après traitement par cellules CAR-T anti-CD19 conserve sa sensibilité à la lyse induite par des lymphocytes T. Dans le cadre de ces rechutes de haut risque un immunophénotypage étendu pourrait permettre de discuter de nouvelles options thérapeutiques

Ce travail a fait l'objet :

- **D'une communication orale à la journée annuelle du réseau Immunothérapie du canceropôle Grand Ouest 9-10 Mars 2023**
- **D'une communication affichée au congrès annuel de la Société Francophone de Greffe de Moelle et de Thérapie cellulaire (SFGM-TC) 9-11 Novembre 2022**



Brief Report

Two Ways of Targeting a CD19 Positive Relapse of Acute Lymphoblastic Leukaemia after Anti-CD19 CAR-T Cells

Audrey Grain ^{1,2,*}, Jocelyn Ollier ¹, Thierry Guillaume ³, Patrice Chevallier ³, Baptiste Le Calvez ³, Marion Eveillard ⁴ and Béatrice Clémenceau ¹

¹ Nantes Université, Inserm UMR 1307, CNRS UMR 6075, Université d'Angers, CRCI2NA, F-44007 Nantes, France

² Paediatric Haematology and Oncology Nantes University Hospital, 44093 Nantes, France

³ Haematology Department, Nantes University Hospital, 44093 Nantes, France

⁴ Haematology Biology Department, Nantes University Hospital, 44093 Nantes, France

* Correspondence: audrey.grain@chu-nantes.fr; Tel.: +33-2-40-08-36-14

Abstract: Background: Therapeutic options for CD19⁺ relapses after anti-CD19 CAR-T cells are still debated; second infusion of anti-CD19 CAR-T cells, therapeutic antibodies, or targeted therapies can be discussed. Here, we explore the immunophenotyping and lysis sensitivity of CD19⁺ ALL relapse after anti-CD19 CAR-T cells and propose different therapeutic options for such a high-risk disease. Methods: Cells from successive B-ALL relapses from one patient were collected. A broad immunophenotype analysis was performed. ⁵¹Cr cytotoxic assays, and long-term killing assays were conducted using T-cell effectors that are capable of cytotoxicity through three recognition pathways: antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC), anti-CD19 CAR-T, and TCR. Results: Previously targeted antigen expression, even if maintained, decreased in relapses, and new targetable antigens appeared. Cytotoxic assays showed that ALL relapses remained sensitive to lysis mediated either by ADCC, CAR-T, or TCR, even if the lysis kinetics were different depending on the effector used. We also identified an immunosuppressive monocytic population in the last relapse sample that may have led to low persistence of CAR-T. Conclusion: CD19⁺ relapses of ALL remain sensitive to cell lysis mediated by T-cell effectors. In case of ALL relapses after immunotherapy, a large immunophenotype will make new therapies possible for controlling such high risk ALL.

Keywords: acute lymphoblastic leukaemia; immunotherapy; relapse; CAR-T cells



Citation: Grain, A.; Ollier, J.; Guillaume, T.; Chevallier, P.; Le Calvez, B.; Eveillard, M.; Clémenceau, B. Two Ways of Targeting a CD19 Positive Relapse of Acute Lymphoblastic Leukaemia after Anti-CD19 CAR-T Cells. *Biomedicines* **2023**, *11*, 345. <https://doi.org/10.3390/biomedicines11020345>

Academic Editor: Myunggon Ko

Received: 6 January 2023

Revised: 20 January 2023

Accepted: 22 January 2023

Published: 25 January 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

T-cells expressing a chimeric antigen receptor (CAR) recognizing the CD19 antigen have shown high early response rates in high-risk B acute lymphoblastic leukaemia (B-ALL) [1]. Nevertheless, 35% to 44% of patients relapse, and more than 50% of them present CD19⁺ relapses [2,3]. CD19⁺ relapses are often related to low potency or low persistence of CAR-T cells [4]. Amplification and persistence of CAR-T cells may be negatively impacted by the choice of co-stimulatory domain, T-cell subtype composition, and an unfavourable immune environment [4,5]. Therapeutic options are still debated in the CD19⁺ relapse setting: a second infusion of anti-CD19 CAR-T or antibodies targeting ALL have been proposed [6]. Humanised anti-CD19 CAR-T or associating a second infusion of anti-CD19 CAR-T cells with an anti-PD1 are other strategies explored in on-going Phase 1 studies [4,7–9].

To our knowledge, the susceptibility of ALL relapses to T-cells mediated lysis has not been explored so far. Here, we analyse broad immunophenotyping and cytotoxicity assays, conducted on ALL cells from successive relapses in one patient after three different immunotherapies in order to consider the optimal therapeutic way in this particularly complex setting.

2. Materials and Methods

2.1. Case Description

A 21-year-old patient presented with a hyperleukocytic CRLF2 overexpressing and IKZF1 deleted B-ALL (Dg) in November 2019. After failed induction chemotherapy combined with rituximab, intensification led to the first complete remission (CR) with positive minimal residual disease of 0.3% by multicolour flow cytometry (MFC) and 7×10^{-3} by molecular biology (based on Ig/TCR gene rearrangement). A geno-identical allogeneic HSCT was then performed. A relapse (R2) occurred 2 months later, and the patient received salvage chemotherapy followed by anti-CD19 CAR-T cells (tisagenlecleucel, 1.9×10^9 total viable cells, of which 9.4% were CAR⁺ (based on the manufacturer's certificate) in July 2020. Bone marrow aspiration showed 81% of blasts before anti-CD19 CAR-T infusion. Circulating CAR-T cells in blood were detected using multicolour flow cytometry (MFC) and showed an expansion peak at day 8 (3.5% of T lymphocytes). Interestingly, the contemporary appearance of CD14⁺/HLA-DR^{lo/neg} monocytic cells was noted. A second CR was obtained with negative minimal residual disease at 1 month post-anti-CD19 CAR-T, persisting at 3 months post-infusion. The patient presented a loss of B cell aplasia at 4.5 months and a CD19⁺ relapse at 5.5 months post-CAR-T cells (R3). He received palliative chemotherapy and died in January 2022 (Figure 1). The patient provided signed consent for cell collection.

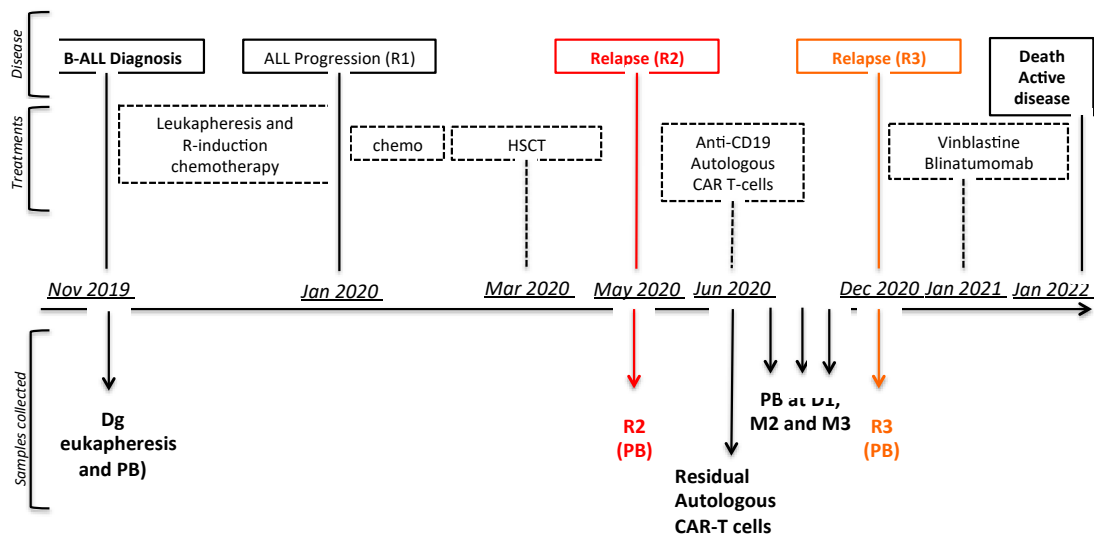


Figure 1. Clinical case medical history: disease progression, treatments received, and samples collected (Dg; R2; autologous CAR-T cells, blood samples and R3); ALL: acute lymphoblastic leukaemia; R: rituximab; HSCT: haematopoietic stem cell transplantation; PB: peripheral blood; chemo: chemotherapy.

2.2. Cells

At diagnosis, peripheral blood cells were collected from the leukapheresis product. Peripheral blood samples were collected at relapses R2 and R3. All contained at least 90% of blastic cells. Peripheral blood mononucleated cells (PBMC) were then isolated using density gradient centrifugation on a FICOLL-Paque solution (Eurobio). Cells were then frozen and used for experiments after thawing. The results could thus have been compared between relapses and initial diagnosis.

2.2.1. Cell Lines

Epstein-Barr B-lymphoblastoid cell lines (BLCL) were used as controls in all experiments and were derived from donor peripheral-blood mononuclear cells (PBMCs) following in vitro infection with EBV containing culture supernatant from the Marmoset B95-8 cell line in the presence of 1 µg/mL cyclosporin-A (sandimmun).

2.2.2. Effector Cells

- The patient's anti-CD19 CAR-T cells were collected from residual material in the bag after infusion of tisagenlecleucel. We performed an independent analysis of the cells in our laboratory. Of the CD3⁺ cells, 11% were CAR⁺. This result was close to that reported in the manufacturer certificate. The CD4⁺/CD8⁺ ratio among CAR⁺ cells was 3.4 (77.5% CD4⁺ and 22.3% CD8⁺). CAR-T cells were largely composed of a differentiated T-cell subset, with CD62L⁺, CCR7[−], and CD45RA[−] phenotypes.
- Because the tisagenlecleucel preparation only contained 9% of anti-CD19-CAR⁺ T-cells, the anti-CD19-CAR⁺ cells were selected with a CD19 biotin-coupled protein (Miltenyi Biotec). An APC-coupled anti-biotin antibody was then used for FACS-sorting the anti-CD19-CAR⁺ cells. This T-cell population containing 95% of anti-CD19-CAR⁺ T-cells (of which 71% were CD8⁺ and 12% were CD4⁺) was used for the cytotoxic assays. Note that the remaining 7% of CD4[−] and CD8[−] cells were composed of 72% of αβ-T lymphocytes and 28% of γδ-T lymphocytes.
- The anti-HLA-DPB1*04:01 CD4⁺ T-clone has been previously described [10]. Cells were grown in RPMI 1640 culture medium (Eurobio) supplemented with 8% human serum, 300 IU/mL IL-2, 2 mM L-glutamine, penicillin, and streptomycin (Gibco).
- An anti-CMVpp65 polyclonal CD8⁺-T-cell population was obtained as previously described [11] and grown in the same culture media.
- A CD8⁺ polyclonal T cell population transduced by a retroviral vector expressing a chimeric-receptor containing the murine CD16 receptor murine FcγRIII, linked to the human-chain FcεRIγ, was obtained as previously described and used to perform antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC) assays with murine antibodies [12].

See all the effector cells in Supplementary Figure S1.

2.3. Immunophenotype

Extended immunophenotyping of Dg, R2, and R3 cells was performed using the Human Cell Surface Marker Screening Kit from Biolegend® (Biolegend Europe B.V, Amsterdam, The Netherlands) (LEGENDscreen). The Human Cell Surface Marker Screening Kit contains 4 96-wells plates. Each well contains a PE-coupled antibody targeting one human surface antigen. Cells were first incubated with an anti-CD19-APC coupled antibody (Biolegend®, clone HIB19) in order to select the leukaemic blasts by gating CD19⁺ cells for analysis. A minimum of 10 000 CD19⁺ cells was acquired on a CANTO II cytometer (BD Biosciences, Le Pont de Claix, France) (Plateforme CytoCell–Nantes University), and the results were analysed using FlowJo v10.8.1 software (BD LifeSciences). Results were given in Relative Fluorescence Intensity (RFI in log) which is calculated as median fluorescence intensity of the targeted-antigen coupled antibody/median fluorescence intensity of the unspecific control isotype. All antigens screened in the panel are detailed in Supplementary Figure S2.

2.4. Cytotoxicity Assays

2.4.1. ⁵¹Cr Assays

In order to assess sensitivity to T-cells-induced lysis of each ALL sample, using different way of recognition (TCR, ADCC, CAR), standard ⁵¹Cr assay was first performed. Target cells were previously labeled with 75 µCi ⁵¹Cr for 1 h at 37 °C then washed 4 times with RPMI, SVF 10%. For cytotoxic assay using anti-CMV-pp65 CD8⁺ T cells,

target cells were previously incubated for 30 min at 37 °C with 1 µg/mL final concentration of CMVpp65 peptides pool (PepTivator CMV pp65 human) (Miltenyi Biotec SAS, Paris, France) and then washed twice. Target cells and effector T cells were then plated at the indicated effector-to-target ratio (E:T ratio) in flat-bottom 96 wells plates. A BLCL line was used as control. After a 4 h incubation at 37 °C, 25 µL of supernatant was removed from each well, mixed with 100 µL scintillation fluid (Ultima Gold XR) (PerkinElmer Health Sciences, Groninger, The Netherlands), and released 51Cr activity was counted in a scintillation counter (MicroBeta JET) (PerkinElmer Health Sciences, Groninger, The Netherlands). Each test was performed in triplicate. Results are expressed as the percentage of lysis, which is calculated according to the following equation: (experimental release – spontaneous release) / (maximal release – spontaneous release) × 100. Three experiments in triplicate were performed independently.

2.4.1.1. Long-Term Killing Assays

Sensitivity to CAR-T induced lysis was analysed over 24 h because it better represents *in vivo* CAR-T activity [13]. Target (200,000 cells/well) and effector cells were plated at the E:T ratio 3:1 in a flat-bottom 96 wells plate and incubated at 37 °C. At different time points: 0 h (H0), 4 h (H4) and 24 h (H24) after co-culture, cell suspension was collected and wells were rinsed in order to collect all residual cells. Cells were then washed with PBS EDTA (0.02%) and with PBS before being labelled with a Fixable Viability Stain 780 (BD Biosciences) over 10 min at room temperature (RT). After having been washed twice, cells were then incubated with both a PE-coupled anti-CD22 antibody (Dako product provided by Technologies Agilent France, Les Ulis, France) and a FITC coupled anti-CD3 antibody (Beckman Coulter France SAS, Roissy, France) over 15 min RT, to distinguish effector and target residual viable cells. After two more washing with PBS-0.1% human albumin, cells were fixed before analysis by MFC. For each condition, the % of viable leukaemic cells (VS780^{low}/CD22⁺) at time 0 was reported as 100%. Thus, at time 4 h and 24 h, the percentage of residual viable leukaemic cells was calculated as follows: = (% of viable CD22⁺ cells at this time / % of viable CD22⁺ cells at H0) × 100.

Two experiments in duplicate were performed independently. All MFC analysis was performed on BD FACSCanto II (Plateforme CytoCell – Nantes University).

3. Results

3.1. ALL Immunophenotypes

Extended immunophenotyping showed that the level of expression of CD19 decreased from a Relative Fluorescence Intensity (RFI) of 171 at Dg, to 13 and 23 at R2 and R3, respectively. Expression of the previously targeted CD20 also decreased from Dg (RFI = 36) to R2 (RFI = 12) and R3 (RFI = 13). In contrast, CD22 was highly expressed in all samples.

Interestingly, while CD135 (FLT3) expression was present on only 7% of the Dg ALL cells, at relapse R2 its expression was observed on all the cells and was maintained at relapse R3. Similarly, CD268 (BAFF-R), CD304 (Neuropilin-1), and CD71 expressions increased on the successive relapse cells.

Expression of molecules involved in immunological synapse and co-stimulatory ligands remained stable, and expression of checkpoint inhibitors was low in all samples (Supplementary Figure S3).

The phenotypic analysis also revealed the presence of a monocytic CD14⁺, HLA-DR^{neg}, CD33⁺, and CD11b^{high} population in the R3 relapse sample (3.8% of cells), and we showed that this population was detectable in the patient's peripheral blood 7 days after CAR-T cell infusion. The immunophenotype of these monocytic cells is presented in Supplementary Figure S4.

3.2. Lysis Sensitivity Mediated by T-Cells Using Different Recognition Pathways: Anti-CD19-CAR, ADCC, and TCR:

3.2.1. The Anti-CD19 CAR Pathway

Four-hour ^{51}Cr cytotoxicity assays were performed, analysing the three ALL sample lysates induced by the FACS of CD19-CAR⁺ cells. All ALL samples were efficiently and similarly lysed by the patient's anti-CD19 CAR-T cells, even R3 (Figure 2a). The lysis scores were directly proportional to the effector–target ratio. The rapid lysis of all the ALL through the CAR recognition pathway was confirmed by the long-term killing assays. Only 0.5% of the residual viable CD22⁺ cells were seen after 4 h of co-culture (Figure 3b). The percentage of residual viable cells in the wells where ALL cells were cultured alone are presented as control (Figure 3a).

3.2.2. The ADCC Pathway

Four antigens, highly expressed by the three ALL (Dg, R2 and R3) were selected for the ADCC assays: CD19 (clone HIB19), CD24 (adhesion molecule, in B cells; clone ML5), CD184 (IL-4 receptor; clone 12G5), and CD220 (insulin receptor; clone B6.220). The mCD16-T lymphocytes were used as effector cells. For all targeted antigens, ADCC lysis scores ranged from 20% to 35% within four-hour ^{51}Cr cytotoxicity assays. In addition, ALL sensitivity to ADCC-mediated cell lysis remained stable from Dg to successive relapses, whatever antigen was targeted. No cell lysis was observed in the absence of antibodies (Figure 2d). Because of the lack of biological material, long-term killing assays could not be performed for ADCC.

3.2.3. The TCR Pathway

In the ^{51}Cr cytotoxicity assay, little or no ALL cell lysis was observed after co-culture with the anti-HLA DPB1*04:01 CD4⁺ T-clone or the anti-CMVpp65 CD8-polyclonal T-cells (Figure 2b,c). However, in the long-term killing assays, after 24 h of co-culture, the percentage of residual leukaemic viable CD22⁺ cells progressively fell to 30% in the presence of anti-CMVpp65 CD8-T cells and to 35% in the presence of the anti-HLA DPB1*04:01 CD4⁺ T-clone (Figure 3c,d). No significant difference in sensitivity to lysis was observed between ALL Dg and relapses. Note that in addition to the molecular HLA typing previously described, we checked with MFC that ALL cells maintained HLA-A2 and HLA-DPB1*04:01 expression (Figure 2b,c).

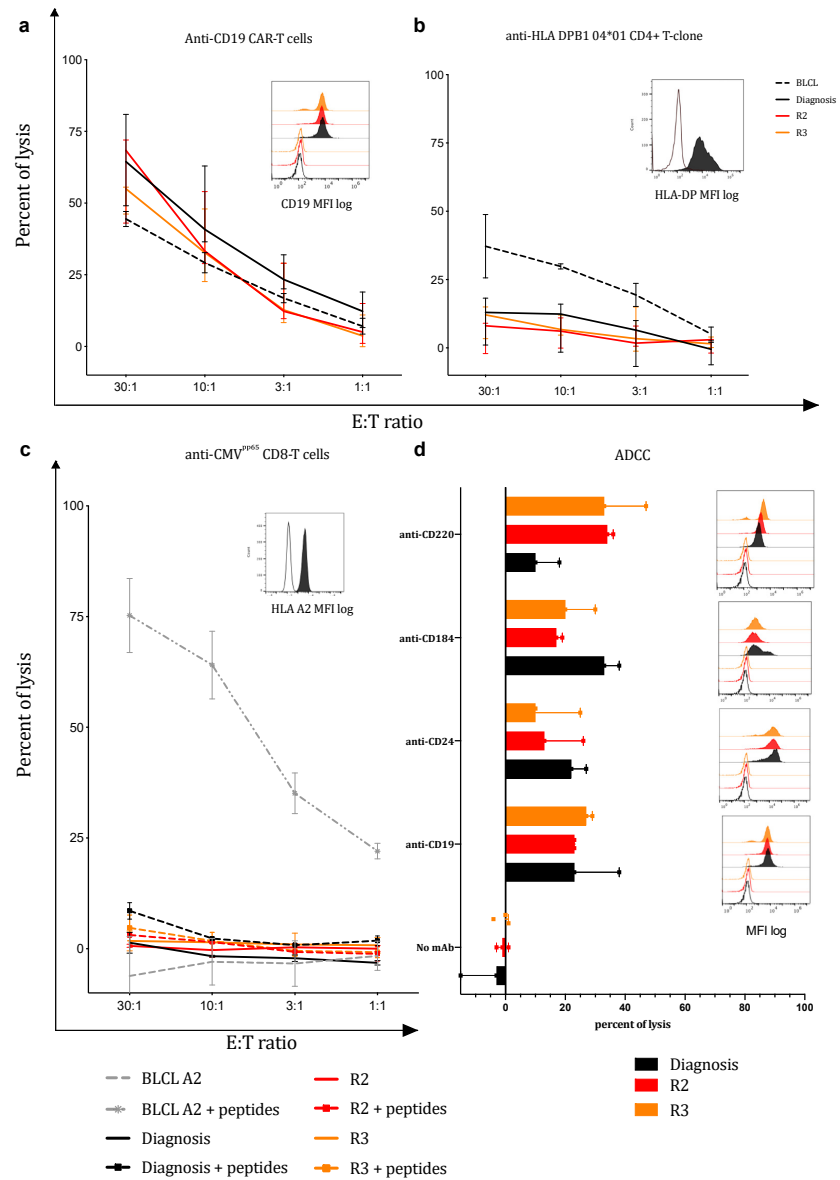


Figure 2. 4h-⁵¹Cr cytotoxic assays over 4 h. Percentage of ALL lysis at four E:T ratio after co-culture with the autologous anti-CD19 CAR-T cell preparation (a); or anti-HLA DPB1*04:01 CD4+ T-clone (b); or anti-CMVpp65 CD8 T-cells (c); or through the ADCC pathway using anti-CD220, anti-CD184, anti-CD24, and anti-CD19 antibodies in combination with mCD16-T lymphocytes (d). Expressions of targeted antigens are, respectively, represented as median of immunofluorescence (MFI) in a log of 10. (BLCL: B cell lineage used as controls). Three experiments in triplicate were performed. Results are given as median/error.

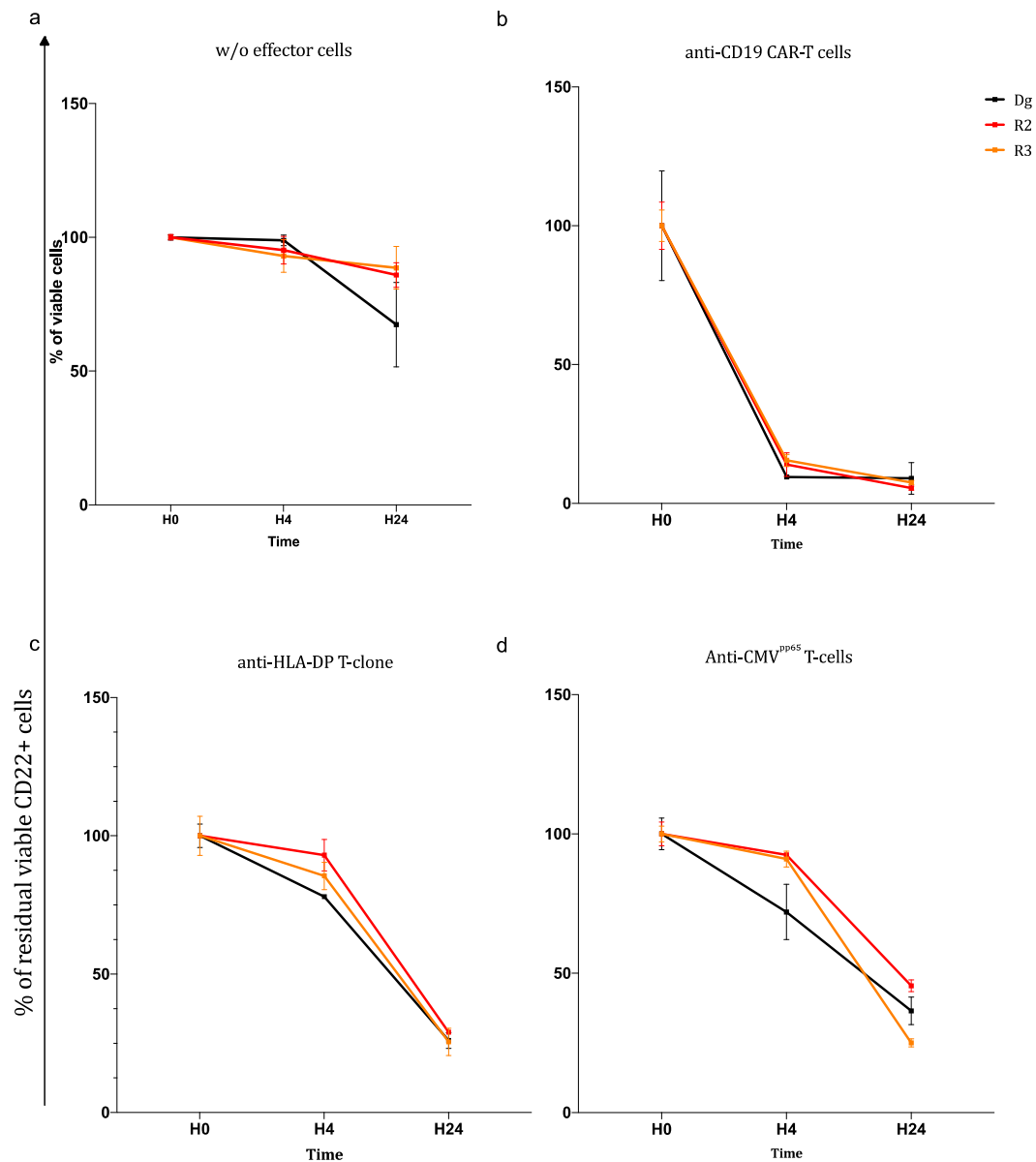


Figure 3. Long-term killing assays. Residual viable ALL cells at 3 time points of co-culture H0 (starting point), after 4 h (H4) of co-culture and after 24 h (H24) of co-culture: (a) with no effector, results showed total viable cells; (b) with a purified autologous anti-CD19 CAR-T cell preparation (percent of residual CD22+ viable cells); (c) with anti-HLA DPB1*04:01 CD4+ T-clone (percent of residual CD22+ viable cells); (d) with anti-CMVpp65 CD8 T-cells (percent of residual CD22+ viable cells). Two experiments in duplicate were performed at effector/ratio = 3:1. Results are given as mean + SD. CMVpp65 peptides: PepTivator CMVpp65 human, 130-093-435, Miltenyi Biotec; T eff: T-cell effectors, here polyclonal CD8+ T cells against CMV peptides.

4. Discussion

For the first time, we report here an analysis of the T-cell-mediated lysis sensitivity of two successive ALL relapses that occurred after three immunotherapies (rituximab, geno-identical allogeneic HSCT, and anti-CD19 CAR T-cells). We showed that ALL relapses remained sensitive to all cytotoxic T-cell effectors tested, which recognized ALL cells through different receptors (CAR, TCR, and CD16). Even if CD19 targeted antigen expression decreased in relapse samples, CAR-T cell-mediated lysis remained effective.

We did not identify the appearance of surface molecules that may impact CAR-T cell persistence. Meanwhile, some unexpected targetable antigens, not routinely tested, appeared between Dg and the successive relapses, including FLT3 (CD135) or BAFF-R (CD268). Overall, our results provide options for antibody- or cell-based immunotherapy in the setting of post-CAR-T CD19+ relapses.

The loss of CAR-T cells persistence is the first factor associated with CD19⁺ ALL re-occurrence after anti-CD19 CAR-T cells. It is now well-known that the co-stimulatory domain impacts CAR-T persistence, as the CAR construct with 4-1BB is associated with longer persistence than the CD28 domain [4]. The patient described here received tisagenlecleucel (a 4-1BB anti-CD19 CAR construct). Because relapses remained sensitive to CAR-T cell-induced lysis, a second injection of tisagenlecleucel could therefore have been discussed. Nevertheless, published data from second anti-CD19 CAR-T cells infusions report disappointing results, mostly due to lack of expansion [6]. An unfavourable *in vivo* immune environment may also impact CAR-T expansion and persistence. The murine scFv of CAR could lead to immune rejection, and some groups are experimenting use of humanized or fully human CAR constructs [14,15]. In addition, lack of co-stimulatory molecules (CD80, CD86, ICAM-1) and expression of molecules leading to immune cell anergy (CD47, HLA-II or PD-L1) through leukaemic cells or the bone marrow microenvironment have also been described [16–20]. Therefore, pilot studies combining a second injection of CAR-T and a PD1 blockade were conducted, with encouraging results [7–9], and a Phase I/II study is ongoing (CAPTiRALL EUDRACTN: 2021-003035-28). Other strategies targeting pathways known to contribute to T-cell exhaustion were also explored with encouraging results (CTLA-4, TIM-3, TGF receptor) [21]. In our case, we did not find a lack of co-stimulatory molecules or expression of checkpoint inhibitors. Nevertheless, we identified the appearance of CD14⁺/HLA-DR^{lo/neg} monocytic cells in the R3 sample. Retrospectively, we noted that this monocytic population had appeared in peripheral blood since day 4 after tisagenlecleucel infusion. These monocytic CD14⁺/HLA-DR^{lo/neg} cells recently emerged as tumour-induced immunosuppression mediators and are associated with poorer CAR-T expansion during manufacturing [22–24]. Targeting this immunosuppressive monocyte population might therefore have improved responses to a potential second anti-CD19 CAR-T injection in this patient.

Our analysis of broad immunophenotyping revealed newly appeared targetable antigens in relapse samples and led to unexpected therapeutic options. For this patient, anti-FLT3 targeted therapy could thus have been discussed in a curative or pre-emptive setting. In addition, we also showed that ALL cells remain sensitive to ADCC-mediated lysis (antibody + mCD16-T lymphocytes). The mCD16-T lymphocytes are described as universal CAR-T cells because their construction allows targeting of multiple antigens when used in combination with different antibodies. These immunotherapeutic T-cells could be helpful for targeting both one or more leukaemic antigens and the immunosuppressive microenvironment.

In conclusion, our analysis of this refractory ALL revealed that, even in relapses, blastic cells remain sensitive to three-way T-cell-induced lysis. Moreover, we identified the appearance of new potential therapeutic targets in relapse samples. In light of our results, a second injection of anti-CD19 CAR-T could have been discussed. However, targeting the immunosuppressive microenvironment should probably have been considered. CD16-T-cells, seem particularly interesting in the post-conventional anti-CD19 CAR-T-cells relapse

setting, allowing the simultaneous targeting of several antigens, possibly identified by broad immunophenotyping.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/biomedicines11020345/s1>, Figure S1: T-cell effectors used in the cytotoxicity assay. Figure S2: Antigens screened by the Human Cell Surface Marker Screening Kit from Biolegend®(LEGENDscreen). Figure S3: Immunophenotyping results. Figure S4: Cell surface antigen expressed by the monocytic population

Author Contributions: A.G., B.C., and J.O. conceived and performed the analysis. A.G. and B.C. wrote the manuscript. T.G. and B.L.C. treated the patient. P.C., M.E., B.L.C. critically reviewed the manuscript. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Written informed consent of the patient was preliminarily obtained for cell collection.

Data Availability Statement: Data are available on request from the corresponding author.

Acknowledgments: We thank the Cytometry Facility Cytocell in Nantes for expert technical assistance.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Maude, S.L.; Laetsch, T.W.; Buechner, J.; Rives, S.; Boyer, M.; Bittencourt, H.; Bader, P.; Verneris, M.R.; Stefanski, H.E.; Myers, G.D.; et al. Tisagenlecleucel in children and young adults with B-cell lymphoblastic leukemia. *N. Engl. J. Med.* **2018**, *378*, 439–448. [CrossRef] [PubMed]
2. Dourthe, M.E.; Rabian, F.; Yakouben, K.; Chevillon, F.; Cabannes-Hamy, A.; Méchinaud, F.; Grain, A.; Chaillou, D.; Rahal, I.; Caillat-Zucman, S.; et al. Determinants of CD19-positive vs CD19-negative relapse after tisagenlecleucel for B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* **2021**, *35*, 3383–3393. [CrossRef] [PubMed]
3. Grupp, S.A.; Maude, S.L.; Rives, S.; Baruchel, A.; Boyer, M.W.; Bittencourt, H.; Bader, P.; Büchner, J.; Laetsch, T.W.; Stefanski, H.; et al. Updated analysis of the efficacy and safety of tisagenlecleucel in pediatric and young adult patients with relapsed/refractory (r/r) acute lymphoblastic leukemia. *Blood* **2018**, *132*, 895. [CrossRef]
4. Nie, Y.; Lu, W.; Chen, D.; Tu, H.; Guo, Z.; Zhou, X.; Li, M.; Tu, S.; Li, Y. Mechanisms underlying CD19-positive ALL relapse after anti-CD19 CAR T cell therapy and associated strategies. *Biomark. Res.* **2020**, *8*, 1–17. [CrossRef] [PubMed]
5. Guha, P.; Cunetta, M.; Somasundar, P.; Espot, N.J.; Junghans, R.P.; Katz, S.C. Frontline Science: Functionally impaired geriatric CAR-T cells rescued by increased $\alpha 5\beta 1$ integrin expression. *J. Leukoc. Biol.* **2017**, *102*, 201–208. [CrossRef] [PubMed]
6. Holland, E.M.; Molina, J.C.; Dede, K.; Moyer, D.; Zhou, T.; Yuan, C.M.; Wang, H.-W.; Stetler-Stevenson, M.; Mackall, C.; Fry, T.J.; et al. Efficacy of second CAR-T (CART2) infusion limited by poor CART expansion and antigen modulation. *J. Immunother. Cancer* **2022**, *10*, e004483. [CrossRef] [PubMed]
7. Maude, S.L.; Hucks, G.E.; Seif, A.E.; Talekar, M.K.; Teachey, D.T.; Baniewicz, D.; Callahan, C.; Gonzalez, V.; Nazimuddin, F.; Gupta, M.; et al. The effect of pembrolizumab in combination with CD19-targeted chimeric antigen receptor (CAR) T cells in relapsed acute lymphoblastic leukemia (ALL). *J. Clin. Oncol.* **2017**, *35*, 103. [CrossRef]
8. Jjaeger, U.; Worel, N.; McGuirk, J.; Riedell, P.A.; Fleury, I.; Borchmann, P.; Du, Y.; Abdelhady, A.M.; Han, X.; Martinez-Prieto, M.; et al. Safety and efficacy of tisagenlecleucel (tisa-cel) plus pembrolizumab (pembro) in patients (pts) with relapsed/refractory diffuse large B-cell lymphoma (r/r DLBCL): Updated analysis of the phase 1b PORTIA study. *J. Clin. Oncol.* **2021**, *39*, e19537. [CrossRef]
9. Cao, Y.; Lu, W.; Sun, R.; Jin, X.; Cheng, L.; He, X.; Wang, L.; Yuan, T.; Lyu, C.; Zhao, M. Anti-CD19 chimeric antigen receptor T cells in combination with nivolumab are safe and effective against relapsed/refractory B-cell non-Hodgkin lymphoma. *Front. Oncol.* **2019**, *9*, 767. [CrossRef]
10. Vivien, R.; Saïagh, S.; Lemarre, P.; Chabaud, V.; Jesson, B.; Godon, C.; Jarry, U.; Guillaume, T.; Chevallier, P.; Vié, H.; et al. The doubling potential of T lymphocytes allows clinical-grade production of a bank of genetically modified monoclonal T-cell populations. *Cytotherapy* **2018**, *20*, 436–452. [CrossRef]
11. Gallot, G.; Vivien, R.; Ibsch, C.; Lulé, J.; Davrinche, C.; Gaschet, J.; Vié, H. Purification of Ag-specific T lymphocytes after direct peripheral blood mononuclear cell stimulation followed by CD25 selection. I. Application to CD4+ or CD8+ cytomegalovirus phosphoprotein pp65 epitope determination. *J. Immunol.* **2001**, *167*, 4196–4206. [CrossRef] [PubMed]
12. Ollier, J.; Vivien, R.; Vié, H.; Clémenceau, B. Transfection of Fc γ RIIIa (CD16) Alone Can Be Sufficient To Enable Human $\alpha\beta$ TCR T Lymphocytes To Mediate Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity. *ImmunoHorizons* **2017**, *1*, 63–70. [CrossRef]

13. Liu, D.; Badeti, S.; Dotti, G.; Jiang, J.G.; Wang, H.; Dermody, J.; Soteropoulos, P.; Streck, D.; Birge, R.B.; Liu, C. The role of immunological synapse in predicting the efficacy of chimeric antigen receptor (CAR) immunotherapy. *Cell Commun. Signal.* **2020**, *18*, 134. [\[CrossRef\]](#)
14. Cao, J.; Cheng, H.; Shi, M.; Wang, G.; Chen, W.; Qi, K.; Li, H.; Qiao, J.; Zhao, J.; Wu, Q.; et al. Humanized CD19-specific chimeric antigen-receptor T-cells in 2 adults with newly diagnosed B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* **2019**, *33*, 2751–2753. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
15. Maude, S.L.; Barrett, D.M.; Rheingold, S.R.; Aplenc, R.; Teachey, D.T.; Callahan, C.; Shaw, P.A.; Brogdon, J.; Young, R.; Scholler, J.; et al. Efficacy of humanized CD19-targeted chimeric antigen receptor (CAR)-modified T cells in children with relapsed ALL. *J. Clin. Oncol.* **2016**, *34*, 3007. [\[CrossRef\]](#)
16. Jiménez-Morales, S.; Aranda-Urbe, I.S.; Pérez-Amado, C.J.; Ramírez-Bello, J.; Hidalgo-Miranda, A. Mechanisms of Immunosuppressive Tumor Evasion: Focus on Acute Lymphoblastic Leukemia. *Front. Immunol.* **2021**, *12*, 737340. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
17. Kang, S.H.; Hwang, H.J.; Yoo, J.W.; Kim, H.; Choi, E.S.; Hwang, S.H.; Cho, Y.U.; Jang, S.; Park, C.J.; Im, H.J.; et al. Expression of immune checkpoint receptors on T-cells and their ligands on leukemia blasts in childhood acute leukemia. *Anticancer Res.* **2019**, *39*, 5531–5539. [\[CrossRef\]](#)
18. Kebelmann-Betzing, C.; Körner, G.; Badiali, L.; Buchwald, D.; Möricke, A.; Korte, A.; Köchling, J.; Wu, S.; Kappelmeier, D.; Oettel, K.; et al. Characterization of cytokine, growth factor receptor, costimulatory and adhesion molecule expression patterns of bone marrow blasts in relapsed childhood B cell precursor all. *Cytokine* **2001**, *13*, 39–50. [\[CrossRef\]](#)
19. Luczyński, W.; Stasiak-Barmuta, A.; Ilendo, E.; Kovalchuk, O.; Krawczuk-Rybak, M.; Malinowska, I.; Mitura-Lesiuk, M.; Chyczewski, L.; Matysiak, M.; Kowalczyk, J.; et al. Low expression of costimulatory molecules and mRNA for cytokines are important mechanisms of immunosuppression in acute lymphoblastic leukemia in children? *Neoplasma* **2006**, *53*, 301–304.
20. Simone, R.; Tenca, C.; Fais, F.; Luciani, M.; De Rossi, G.; Pesce, G.; Bagnasco, M.; Saverino, D. A soluble form of CTLA-4 is present in paediatric patients with acute lymphoblastic leukaemia and correlates with CD1d+ expression. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e44654. [\[CrossRef\]](#)
21. Titov, A.; Kaminskiy, Y.; Ganeeva, I.; Zmievskaya, E.; Valiullina, A.; Rakhmatullina, A.; Petukhov, A.; Miftakhova, R.; Rizvanov, A.A.; Bulatov, E. Knowns and Unknowns about CAR-T Cell Dysfunction. *Cancers* **2022**, *14*, 1078. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
22. Bourbon, E.; Sesques, P.; Gossez, M.; Tordo, J.; Ferrant, E.; Safar, V.; Wallet, F.; Aussedat, G.; Maarek, A.; Bouafia, F.; et al. HLA-DR expression on monocytes and outcome of anti-CD19 CAR-T cell therapy for large B-cell lymphoma. *Blood Adv.* **2022**. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
23. Mengos, A.E.; Gastineau, D.A.; Gustafson, M.P. The CD14+HLA-DRlo/neg Monocyte: An Immunosuppressive Phenotype That Restrains Responses to Cancer Immunotherapy. *Front. Immunol.* **2019**, *10*, 1147. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
24. Stroncek, D.F.; Ren, J.; Lee, D.W.; Tran, M.; Frodigh, S.E.; Sabatino, M.; Khuu, H.; Merchant, M.S.; Mackall, C.L. Myeloid cells in peripheral blood mononuclear cell concentrates inhibit the expansion of chimeric antigen receptor T cells. *Cytotherapy* **2016**, *18*, 893–901. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

TRAVAUX DE RECHERCHE - AXE 2

Article 4 : Analyse de la réponse vaccinale cellulaire T et humorale chez les patients traités par cellules CAR-T anti-CD19

A. Llorens ; J. Ollier ; E. Guiet ; P. Chevalier ; B. Tessoulin ; T. Gastinne ; B. Clémenceau ; A. Grain

Ce travail est en cours d'élaboration. Des analyses doivent être réalisées afin de finaliser l'article

Introduction : Les cellules CAR-T anti-CD19 ont montré d'excellents résultats dans le traitement des leucémies aiguës lymphoblastiques et des lymphomes B non hodgkiniens. Après injection, les cellules CAR-T s'expandent et lysent les cellules malignes exprimant le CD19 ainsi que les lymphocytes B sains. La plupart des patients traités et répondeurs présentent alors une aplasie B prolongée et une hypogammaglobulinémie. Actuellement, il n'existe pas de consensus sur la gestion de cette aplasie B, notamment concernant l'intérêt d'une supplémentation en immunoglobulines et la reprise du calendrier vaccinal. A l'exception de la réponse au vaccin contre le SARS-CoV-2, peu d'études ont analysé l'immunité résiduelle chez ces patients, notamment post-vaccinale.

Méthodes : Il s'agit d'une étude prospective, descriptive et monocentrique incluant tous les patients âgés de 1 à 80 ans traités par cellules CAR-T anti-CD19, dans les services d'hématologie clinique et d'oncohématologie pédiatrique du CHU de Nantes entre octobre 2022 et avril 2024. L'analyse de réponse vaccinale résiduelle est réalisée avant infusion des cellules CAR-T anti-CD19, au 21^{ème} jour et au 3^{ème} mois après le traitement. La fréquence de lymphocytes T sécréteurs de cytokines après incubation avec différents peptides vaccinaux est mesurée par la technique FluoroSpot IFN- γ /IL-10/Granzyme B. La réponse humorale à différents vaccins (tétanos, rougeole, rubéole, pneumocoque, SARS-CoV-2) est évaluée par dosage des taux sériques d'immunoglobulines spécifiques.

Résultats : 30 patients ont été inclus. Une diminution de la fréquence des lymphocytes T spécifiques sécréteurs d'IFN- γ est observée, à l'échelle individuelle, 3 mois après traitement. Cependant, une réponse cellulaire T au SARS-CoV-2 et à d'autres antigènes vaccinaux comme la tuberculose et le tétanos, persiste à 3 mois, et est proche de celle mesurée chez les donneurs sains. De même, les taux d'immunoglobulines spécifiques des patients diminuent après infusion des cellules CAR-T, tout en restant supérieurs aux seuils séroprotecteurs définis dans la population générale.

Conclusion : Une réponse immunitaire vaccinale cellulaire T persiste donc après traitement par cellules CAR-T. Nos résultats confirment également la persistance d'une réponse humorale chez ces patients, malgré une diminution effective du taux d'immunoglobulines à l'échelle individuelle. Ces résultats apportent des premiers éléments pour améliorer la prophylaxie anti-infectieuse chez les patients traités par cellules CAR-T. Cependant, la persistance de cette réponse vaccinale résiduelle au-delà de 3 mois après traitement, et sa corrélation avec une protection clinique contre les infections chez ces patients doit encore être explorée.

Ce travail a fait l'objet d'une communication affichée au congrès de la Société Francophone de Greffe de Moelle et de Thérapie Cellulaire (SFGM-TC) 20-22 Novembre 2024

TITLE: Analysis of residual cellular and humoral vaccine responses in patients treated with anti-CD19 CAR-T cells

RUNNING HEAD TITLE: Residual vaccine respons after anti-CD19 CAR-T cells

AUTHORS:

A. Llorens^{1,2} ; J. Ollier¹ ; E. Guiet¹; P. Chevalier³ ; B. Tessoulin³ ; T. Gastinne³ ; B. Clémenceau¹ ; A. Grain^{1,2}

AFFILIATIONS:

- ^{1.} Team 12, CRCINA (INSERM UMR1307, CNRS UMR6075), Nantes, France.
- ^{2.} Pediatric hematology and oncology department, university hospital of nantes, nantes, France
- ^{3.} Hematology department, university hospital of Nantes, Nantes, France

INTRODUCTION:

Chimeric Antigen Receptor-T cells (CAR-T cells) therapy is a cellular immunotherapy that involves reprogramming T cells to express a chimeric antigen receptor, enabling them to recognize and destroy tumor cells through cytotoxic lysis. Most of CAR-T cells currently available target the CD19, and are indicated in relapse or refractory B-Cell Progenitor Acute Lymphoblastic Leukemia (BCP-ALL) and B- Non-Hodgkin Lymphoma (B-NHL). Anti-CD19 CAR-T cells provide impressive results in such very high-risk diseases both in adults, and in children. Eligible patients for CAR-T cells therapy have already undergone intensive chemotherapy treatment, and 26% of them presented with an hypogammaglobulinemia ($< 4\text{g/L}$) before the lymphodepleting chemotherapy required for CAR-T cells infusion (1). Following infusion, anti-CD19 CAR-T cells target all CD19 positive cells. They subsequently target both malignant B-lymphocytes and healthy B-cells, and induce their lysis through T-cell activation and degranulation. The loss of circulating B-lymphocytes due to the “on-target/off-tumor” effect, also called B-cell aplasia, is an indirect marker of CAR-T cells persistence, even when the cells are no longer detectable in the peripheral blood (2).

After treatment, 43% of pediatric patients and 57% of adults receiving Kymriah® for BCP-ALL are presenting an hypogammaglobulinemia, which can persist for years (3). The immunosuppression observed in these patients is largely attributed to CAR-T cells activity, even if the impact of prior chemotherapy and lymphodepletion should not be overlooked (4). Infections are the leading cause of relapse-free mortality after CAR-T cells treatment. Their incidences peak during the first month post-infusion, mainly due to bacterial infections, before gradually declining (5). However, infections remain frequent even one year after treatment. Wudhikarn et al. reported 101 infections in the year following infusion of anti-CD19 CAR-T cells in 60 patients treated for a diffuse large-cell B-lymphoma, among which 23 severe infections, one life-threatening and one fatal case. The 1 year cumulative of overall, bacterial,

severe bacterial, viral and fungal infections were 63.3%, 57.2%, 29.6%, 44.7% and 4% respectively (6). There is no consensus concerning the management of the prolonged B-cell aplasia post anti-CD19 CAR-T cells. The use of immunoglobulin replacement is left to the clinician's discretion (2,7). In pediatric patients, immunoglobulin replacement is commonly used, whereas it is not systematic in adults patients. There are also no evidence-based guidelines regarding the resumption of vaccination schedules, even if some expert suggestions, derived from the strategy used in immunocompromised patients, are provided (3,8,9).

Secondarily to the B-cell aplasia induced by anti-CD19 CAR-T cells, patients may develop profound hypogammaglobulinemia and may lose their ability to mount an humoral response. An American prospective study analyzed the levels of immunoglobulin G (IgG) specific to 12 vaccine antigens in patients who received anti-CD19 CAR-T cells. In the subgroup of adults patients not receiving immunoglobulin replacement therapy, 90% of patients had overall antibody levels below normal and 47% below 4 g/L. The proportion of seroprotective levels of Ig for specific antigen was similar with the one in healthy donors. Moreover, seroprotective antibodies levels were detected for 67% of the tested antigens (10). While overall serum immunoglobulin concentrations decrease, the levels of IgG and IgA specific of certain vaccines or pathogens remain stable. This persistence of vaccine-induced seroprotection may be attributed to the persistence of long-lived plasma cells in the bone marrow, even in cases of B-cell aplasia (11). Previous studies showed that long-lived plasma cells persist in the spleen of patients treated with Rituximab (an anti-CD20 antibody that also depletes circulating B cells) (12,13). The most recent analyses of humoral response in anti-CD19 CAR-T cells recipients come from studies on SARS-CoV-2 vaccination. Two meta-analyses reported cumulative humoral response rates of 27.7% and 31%, in very heterogeneous cohorts of patients (14,15). In 2021, Ram et al. found that 57% of anti-CD19 CAR-T cells recipients have both humoral and cellular response to the BNT162b2 mRNA vaccine (Pfizer-BioNTech, New York, USA)

(16). However, Dhakal et al. report a post-vaccination seroconversion in only 21% of patients, with very low antibody levels in patients treated with corticosteroids or vaccinated shortly after anti-CD19 CAR-T cells infusion (17). Interestingly, the mRNA-1273 vaccine (Moderna Biotech, Massachusetts, USA), a high serum IgG level and anti-BCMA CAR-T cells seem to be associated with a stronger humoral response post-vaccination (18). The safety use of the BNT162b2 mRNA vaccine (Pfizer-BioNTech, New York, USA) in anti-CD19 CAR-T cells recipients, was confirmed in a prospective French study. However, only 30% of seroconversion was observed, even after 2 doses of vaccines (19). To our knowledge, only 2 studies analyzed the persistence of immune response to non-SARS-CoV-2 vaccine antigens in anti-CD19 CAR-T recipients. In 2023, Lee et al. reported a decline in pneumococcal-specific IgG levels following anti-CD19 CAR-T cells therapy. Moreover, the vaccination using the 13-valent pneumococcal conjugate vaccine (PCV13) at D90 or D180 failed to induce seroconversion in the patients included (20). Walti et al. report that 40% of patients vaccinated against influenza (quadrivalent influenza vaccine) before anti-CD19 CAR-T infusion and 31% of those vaccinated after infusion showed an humoral response 30 days after infusion (21).

Regarding cellular response to vaccines, published data in anti-CD19 CAR-T cells area are scarce and limited to SARS-CoV-2. In 2021, Ram et al. reported 50% of T-cell response (positive ELISpot test) after 2 doses of BNT162b2 mRNA vaccine (Pfizer-BioNTech) (16). After a third dose, the response rate increased to 83%, with better results when vaccines is administered later after the infusion (22). Moreover, this efficient T-cell response seem to be heightened as compared with the cellular response in healthy controls, while their humoral response is weakened (23,24). Jarisch et al confirmed these findings, reporting 100% CD4+ T-cell reactivity to a SARS-CoV-2-specific peptide pool in CAR-T-treated patients (25). Several studies including small series of patients also suggest an efficient T-cell response to SARS-

CoV-2 vaccination in anti-CD19 CAR-T cells recipient. However, no data on cellular response to other vaccines has yet been reported in the literature.

This study aimed to analyze the residual immune T-cell response to childhood vaccines (tetanus, smallpox, tuberculosis/BCG) and to SARS-CoV-2, as well as the residual humoral response to childhood vaccine antigens (tetanus, pneumococcus, rubella, measles) and to SARS-CoV-2 in patients treated with anti-CD19 CAR-T cells for hematological malignancies (high-risk B-NHL or BCP-ALL).

POPULATION AND METHODS:

Patients:

We conducted a prospective, descriptive, single-center study, (ReVacCT study), referenced as RC22_0088 on the Easydore local database. All participants and/or their guardians provided an informed consent., The study was approved by the Ethical Review Board of Nantes University Hospital on March 13, 2022. All patients aged from 1 to 80 who were treated with anti-CD19 CAR-T cells (Kymriah®, Yescarta®, Tecartus®, or Breynzi®) in the adult clinical hematology and pediatric oncohematology departments of Nantes University Hospital, from October 21, 2022, to April 30, 2024 were eligible. The flow chart of eligible and included patients is depicted in Figure 1. The Figure 2 provides an overview of the ReVacCT clinical trial protocol. Blood samples were collected when indication of anti-CD19 CAR-T cell treatment is given (enrollment), before lymphodepletion chemotherapy, at day 21 after CAR-T cells infusion (D21), and at 3 months (M3) after infusion. This last sample could have been taken few weeks later depending on the visits scheduled for the patient. A bank of mononuclear cells from a cohort of healthy donors, stored in liquid nitrogen, was used as control.

Peripheral Blood Mononuclear Cell (PBMC) isolation:

Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMC) were collected on Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA). PBMC were isolated using Ficoll density gradient centrifugation (Eurobio, Les Ulis, France) and were frozen with Fetal Bovine Serum-and 10% dimethylsulfoxide (DMSO). PBMC were thawed and kept overnight in TexMacs Medium (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) or X-VIVO™ 15 Serum-free Hematopoietic Cell Medium (Lonza, Bâle, Suisse) before be used for experimentations.

Flow cytometry:

Immunophenotype was assessed by flow cytometry using the following fluorochrome-conjugated monoclonal antibodies: Fixable Viability Stain-780, CD45-PerCP, CD3-BUV395, CD14-PE, CD19-BB515, CD4-BB515, CD8-BV421 and CD16-PE (BD Biosciences, Fremont, CA, USA). Anti-CD19 CAR-T cells were labeled using the biotinylated-CD19 (CD19 CAR Detection Reagent, human, Biotin) and the Biotin-APC coupled antibody (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany). Data acquisition was carried out on the BD FACSymphony A5.2. Results were analyzed using FlowJo™ Software version 10 (BD Biosciences, Fremont, CA, USA).

FluoroSpot:

The IFN- γ /IL-10/Granzyme B FluoroSpot technique was validated prior to this study on a cohort of healthy donors. PBMC (2×10^5) were added to each well of FluoroSpot Human IFN- γ /IL-10/Granzyme B Kit plates (Mabtech, Nacka Strand, Sweden) (total volume in 100 μ L). Each peptide pools were added the corresponding wells. ; at a final concentration of 1 μ g/mL. The peptide pools included Tetanus Toxin Peptide Pool (Peptide & elephants,

Hennigsdorf, Germany), PepMix™ Pan-Tuberculosis BCG Select Development Grade, PepMix™ Vaccinia virus (JPT Peptide Technologies, Berlin, Germany), PepTivator® SARS-CoV-2 Prot_S Complete research grade and PepTivator® EBV Consensus - premium grade, human (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany). A co-stimulation signal with anti-CD28 was added to each well. An anti-CD3, a condition without any peptide pool and a condition without any PBMC were used as positive and negative controls respectively. When enough PBMC were available, experiments were performed in duplicates. Plates were incubated at 37°C with 5% CO₂ for 48 hours, developed according to the manufacturer's instructions, and dried before spot-counting using the Mabtech IRIS™ 2 (Mabtech, Nacka Strand, Sweden).

Serological analysis:

Serologies for measles, rubella, and SARS-CoV-2 were analyzed by the Nantes University Hospital laboratory, while tetanus and pneumococcus were tested by an external laboratory (Eurofins Biomnis, Lyon, France). Positive titers were defined as 0.1 UI/mL for tetanus, 3.3 mg/mL for pneumococcus, 13 UI/mL for rubella, 5 U/mL for measles and 0.8 BAU/mL for SARS-CoV-2 IgG. Seroprotective thresholds were set at 0.1 UI/mL for tetanus, 1.3 mg/mL for pneumococcus, 10 UI/mL for rubella, 175 U/mL for measles and 264 BAU/mL for SARS-CoV-2, as defined in the literature (26–30).

Statistical analysis:

For all assays, the negative controls remained highly reliable, with a mean Spot Forming Unit (SFU per well (min-max) of 0.050 (0-2) for Interferon- γ (IFN- γ), 0.086 (0-3) for Interleukin-10 (IL-10), 0.042 (0-2) for Granzyme B and 0.008 (0-1) for the IFN- γ /Granzyme B combination. Positive controls consistently yielded positive results. The average number of

spots was calculated for each duplicate well. Frequencies of SFU were reported per 100 CD3+ T-cells, as determined by flow cytometry in each PBMC suspension. When cytokine secreting T-cells were detected in the unstimulated condition, this percentage was subtracted from the stimulated conditions. Graphs and statistical analyses were generated using GraphPad Prism version 9.0.1 software.

RESULTS:

Patients:

Out of 37 eligible patients. Seven patients were excluded, because of the cancellation of anti-CD19 CAR-T cells infusion or death. Thirty patients were included in the analysis, which are still ongoing for 8 out of them (see the Flowchart in Figure 1), Their demographic and clinical characteristics are detailed in Table 1. The median age at the time of anti-CD19 CAR-T cells infusion was 65, with a male preponderance (72.41% male *versus* 27.59% female). Out of the 29 patients, 27 (93.10%) were treated for a B-NHL, with approximately 60% having an aggressive *de novo* lymphoma and 40% having a transformed indolent lymphoma. Patients had undergone a median of 2 lines of chemotherapy before the decision for anti-CD19 CAR-T cells therapy. Most patients (82.76%) received a bridging therapy, which mainly comprised high-intensity chemotherapy (65.52%). The lymphodepleting chemotherapy was based on fludarabine and cyclophosphamide, but with variable dosing regimens. The main anti-CD19 CAR-T cells product was Yescarta® (65.52%), followed by Kymriah® and Breynanzi® (13.79% each), and Tecartus® (only 6.90%). A Cytokine Release Syndrome (CRS) occurred in 24 patients (82.76%) and Immune effector Cell-Associated Neurotoxicity Syndrome (ICANS) in 12 patients (41.38%). Ten patients (34.48%) required Intensive Care Unit (ICU) admission. All patient but one still presented a B-cell aplasia (CD19⁺ cells < 3% of total lymphocytes) at M3 (mean of percentage of CD19⁺ cells 0,5% (n=16)).

Detection of pre-activated circulating T-cells in patients:

When examining the number of SFU for each cytokine per 100 CD3+ T-cells in the absence of stimulation (medium only condition), we observed a measurable frequency of cytokine-producing T-cells for both a healthy donor and several patients. In patients, at enrollment (baseline) the frequency of cytokine-secreting T-cells was 4.5 times higher than in the healthy donors for IFN- γ , 7.5 times higher for IL-10, 1.5 times higher for Granzyme B, and 1.6 times higher for the IFN- γ /Granzyme B combination (Supplemental Figure 1).

Increase of the frequency of cytokine-secreting T-cells at D21:

Exploitable sample at D21 were analysed for 16 patients. Several patients presented with a peak in the frequency of cytokine-secreting T-cells at D21. However, there was also an increase in the number of SFU in the medium-only condition, indicating a pre-activation of T-cell independently of our experiment. In these cases, the baseline frequency of cytokine IFN- γ -secreting T-cells was taken into account and subtracted for the analysis of T-cell activation in subsequent samples (Supplemental Figure 2).

Influence of CAR-T cells persistence on pre-activated T cells at M3:

Among the 12 patients with more than 0.3% circulating anti-CD19 CAR-T cells detected by flow cytometry at M3, 9 exhibited increased frequencies of T cells secreting IFN- γ , IL-10 and Granzyme B during follow-up, both after peptide stimulation and in the medium-only condition. Conversely, for the remaining 3 patients, a decrease in the frequency of secreting T-cells was observed but these last patients also had the lowest circulating CAR-T cells frequencies (averaging 0.61% *versus* 1.08%). In the remaining patients with less than 0.3% of circulating

anti-CD19 CAR-T cells at M3, no increase in the frequencies of pre-activated or specific T cells was detected.

Persistence of a T-cell response at M3 comparable to healthy donors:

The frequency of peptide-specific T-cells were compared between healthy donors and patients at baseline and at M3. A decrease in the frequency of T cells secreting IFN- γ , IL-10, Granzyme B, and the IFN- γ /Granzyme B combination was observed in response to most peptide pools between the baseline and after M3 in patients. However, the frequencies of anti-BCG and anti-tetanus T-cells were similar to those observed in healthy donors. Anti-SARS-CoV-2 T-cells frequencies were significantly higher in patients at baseline compared to healthy donors, and this difference persisted at M3. This may be attributed to the higher number of vaccine booster doses received by patients compared to healthy donors. The frequencies of interleukine-secreting T-cells detected in healthy donor and in patients at baseline and at M3 for each peptide-pool are represented in Figure 2.

Humoral response analysis in patients:

Analysis of specific IgG levels for various vaccine antigens in the 22 patients was incomplete: 21 missing analyses for tetanus, 22 for pneumococcus, 27 for rubella, 28 for measles, and 25 for SARS-CoV-2 out of 88 planned analyses. No statistical analysis was performed due to missing data; however, a decrease in anti-pneumococcal and anti-SARS-CoV-2 IgG levels was observed over the follow-up period. 3 patients were revaccinated against pneumococcus, 2 against tetanus and 1 against SARS-CoV-2, yet no increase in specific IgG level was detected. The significant rise in anti-SARS-CoV-2 IgG levels in 2 non-revaccinated patients may have been due to an undetected infection, as SARS-CoV-2 Polymerase Chain Reaction (PCR) was not routinely performed during the follow-up. Overall, despite a decline in specific IgG levels

after anti-CD19 CAR-T cells infusion, they remained above the seroprotective thresholds defined for the general population(27,30). The evolution of anti-pneumococcal and anti-SARS-CoV-2 IgG levels are represented in Figure 3. Results for anti-tetanus, anti-rubella and anti-measles IgG levels are presented in Supplemental Figure 3.

DISCUSSION:

This study is the first reporting an in-depth analysis of residual vaccine response in anti-CD19 CAR-T cells recipient. Our results revealed a decrease of T-cell response specific to vaccine antigens following infusion of anti-CD19 CAR-T cells. However, this adaptive response persisted and remained comparable to that observed in healthy donors. Similarly, despite a decline in vaccine antigen-specific IgG levels in patients after anti-CD19 CAR-T cells infusion, these levels remained higher than the seroprotective threshold defined in the general population.

First, interestingly, the experiment performed at baseline after anti-CD19 CAR-T cells infusion, revealed the presence of activated T-cells independently of the peptide pool activation. Moreover, the frequency of these pre-activated T-cells increased à D21 after infusion, and persisted at M3 mostly for patients for whom circulating CAR⁺ T-cells were detected. This higher frequency of pre-activated T-cells may be due to the inflammatory response to previous lines of treatment and/or previous infections. After infusion, the higher frequency of activated T-cells could also be related with the circulating CAR⁺-T cells, their activation and expansion (20,31).

Secondly, our results showed that, despite a decrease both in specific IgG serum level and specific T-cells response after anti-CD19 CAR-T cells infusion, significant humoral and cellular responses persisted at M3 post-CAR-T infusion. Regarding the humoral response, our

results confirm those reported in the literature. Indeed, the study by Walti et al. previously showed a decrease in overall IgG levels in patients treated with CAR-T cells, while specific IgG levels of 12 vaccine antigens remained above the seroprotective threshold for 67% of the antigens tested, even in case of persistent B-cell aplasia (10). This durability of vaccine protection could be attributed to the presence of long-lived plasma cells in the bone marrow (11).

Regarding the T-cell vaccine response in CAR-T cells treated patients, published data are scarce and focused on SARS-CoV-2. Most of these studies reported a significant T-cells response following vaccination against SARS-CoV-2, accompanied by the persistence of an humoral response (16). However, these studies often describe the response to revaccination after CAR-T cells therapy, rather than the persistence of a vaccine response when vaccination occurred before the CAR-T cells infusion. Furthermore, to our knowledge, no study has focused on evaluating the response to antigens other than SARS-CoV-2 in patients treated with CAR-T cells.

Our study has some limitations. The first one is due to the lack of exploitable samples in several patients, particularly at D21 leading to a small size of cohort. Indeed, the high number of samples with too few PBMC at D21 was foreseeable given the lymphopenia secondary to the lymphodepleting chemotherapy at this stage. However, our study used exploitable samples for several patient, and is the first one providing data on immune response at different time points after anti-CD19 CAR-T infusion. Our findings, of course, need to be validated by larger multicenter studies, as part of Working Group No. 2 of the UNITC consortium, established in April 2024 for research on cell and gene therapies (32). Additionally, it would be beneficial to schedule further follow-up points after CAR-T cells infusion to gather longer-term data.

Another limitation is the lack of clinical data about clinical efficiency of the persistent immune response. Indeed, although our results indicate a persistence of both humoral and T-cells responses at 3 months post-infusion, they do not provide insight into whether these responses offer effective clinical protection against infections. Thus, further studies are necessary to establish a correlation between the presence or absence of clinical symptoms during infections and the sustained T-cell vaccine response. This information is critical for evaluating the indication of infectious prophylaxis and the vaccinal schedule in anti-CD19 CAR-T recipients. The absence of a second control group is another limitation of our study. Indeed, it should be interesting to compare the humoral and T-cell responses of anti-CD19 CAR-T cells recipients with those of a control group who received the same previous lines of treatment including chemotherapy or immunotherapy protocols. It should provide a clearer assessment of the specific impact of anti-CD19 CAR-T cells therapy on the vaccine response. Additionally, the type of lymphodepleting chemotherapy used, should also impact the immunosuppression observed after CAR-T cells infusion. Because of the small size of our cohort, subgroup analysis depending on the lymphodepletive regimen could not have been performed, but should enhance the robustness of future studies on a larger scale.

Overall, our study revealed, for the first time, significant preliminary findings regarding the presence of a persistent T-cell response not only to SARS-CoV-2 but also to other vaccine antigens, such as those for tuberculosis and tetanus, in patients treated with anti-CD19 CAR-T cells at M3. It also confirmed the persistence of seroprotective levels of IgG for most of the antigens tested. These preliminary results provide initial evidence to justify anti-infectious prophylaxis strategies in patients treated with anti-CD19 CAR-T cells, such as systematic drug prophylaxis, immunoglobulin substitution or resumption of the vaccination schedule. Indeed,

revaccination based on monitoring of post-vaccination serologies or on the detection of specific T-lymphocytes could be discussed in these patients. This approach could help to avoid premature revaccination, which may be ineffective or unnecessary in patients who are already protected.

CONCLUSION:

Our study presents, for the first time, significant preliminary findings regarding the presence of a persistent T-cell response not only to SARS-CoV-2 but also to other vaccine antigens, such as those for tuberculosis and tetanus, in patients treated with anti-CD19 CAR-T cells. Moreover, a humoral response persists in these patients, despite a significant decrease in antibody levels at the individual level.

ACKNOWLEDGMENT / FUNDING:

This study was supported by the ADELMAS foundation.

DECLARATION OF INTEREST:

All authors do not have conflict of interest to disclose.

ETHICS APPROVAL:

Approval was obtained from the local ethics committee (*Groupe Nantais d’Ethique dans le Domaine de la Santé* [GNEDS]). The procedures used in this study adhere to the tenets of the Declaration of Helsinki. Collected data were declared to the national committee for technology information and freedom (CNIL). The patients and their parents and/or guardians were informed of this study and provided signed consent.

AUTHORS COLLABORATIONS / STATEMENT:

AG and BC designed and conducted the study; AG, BT, TG, and PC included patients; AL, JO, EG performed the experiments. AL, BC and JO analysed the results. AL, AG and BC wrote the manuscript. All co-authors critically reviewed the manuscript.

STUDY REGISTRATION:

The study was registered on the Easydore database (<http://easydore/easydore>) with the number: RC22_0088.

REFERENCES:

1. Hill JA, Li D, Turtle CJ. Infectious complications of CD19-targeted chimeric antigen receptor–modified T-cell immunotherapy. 2018;
2. Yakoub-Agha I, Chabannon C, Bader P, Basak GW, Bonig H, Ciceri F, et al. Management of adults and children undergoing chimeric antigen receptor T-cell therapy: best practice recommendations of the European Society for Blood and Marrow Transplantation (EBMT) and the Joint Accreditation Committee of ISCT and EBMT (JACIE). *Haematologica*. févr 2020;105(2):297-316.
3. Hill JA, Giral S, Torgerson TR, Lazarus HM. CAR-T – and a side order of IgG, to go? – Immunoglobulin replacement in patients receiving CAR-T cell therapy. *Blood Rev*. nov 2019;38:100596.
4. Lickefett B, Chu L, Ortiz-Maldonado V, Warmuth L, Barba P, Doglio M, et al. Lymphodepletion – an essential but undervalued part of the chimeric antigen receptor T-cell therapy cycle. *Front Immunol*. 22 déc 2023;14:1303935.
5. Kampouri E, Little JS, Rejeski K, Manuel O, Hammond SP, Hill JA. Infections after chimeric antigen receptor (CAR) - T - cell therapy for hematologic malignancies. *Transpl Infect Dis*. nov 2023;25(S1):e14157.
6. Wudhikarn K, Palomba ML, Pennisi M, Garcia-Recio M, Flynn JR, Devlin SM, et al. Infection during the first year in patients treated with CD19 CAR T cells for diffuse large B cell lymphoma. *Blood Cancer J*. 5 août 2020;10(8):79.
7. Maude SL, Laetsch TW, Buechner J, Rives S, Boyer M, Bittencourt H, et al. Tisagenlecleucel in Children and Young Adults with B-Cell Lymphoblastic Leukemia. *N Engl J Med*. févr 2018;378(5):439-48.
8. Hill JA, Seo SK. How I prevent infections in patients receiving CD19-targeted chimeric antigen receptor T cells for B-cell malignancies. *Blood*. 20 août 2020;136(8):925-35.
9. Reynolds G, Hall VG, Teh BW. Vaccine schedule recommendations and updates for patients with hematologic malignancy post - hematopoietic cell transplant or CAR T - cell therapy. *Transpl Infect Dis*. nov 2023;25(S1):e14109.
10. Walti CS, Krantz EM, Maalouf J, Boonyaratankornkit J, Keane-Candib J, Joncas-Schrone L, et al. Antibodies to vaccine-preventable infections after CAR-T-cell therapy for B-cell malignancies. *JCI Insight* [Internet]. 29 avr 2021 [cité 3 nov 2023]; Disponible sur: <http://insight.jci.org/articles/view/146743>
11. Bhoj VG, Arhontoulis D, Wertheim G, Capobianchi J, Callahan CA, Ellebrecht CT, et al. Persistence of long-lived plasma cells and humoral immunity in individuals responding to CD19-directed CAR T-cell therapy. *Blood*. 21 juill 2016;128(3):360-70.
12. Mamani-Matsuda M, Cosma A, Weller S, Faili A, Staib C, Garçon L, et al. The human spleen is a major reservoir for long-lived vaccinia virus–specific memory B cells. *Blood*. 1 mai 2008;111(9):4653-9.
13. Mahévas M, Michel M, Weill JC, Reynaud CA. Long-Lived Plasma Cells in Autoimmunity: Lessons from B-Cell Depleting Therapy. *Front Immunol* [Internet]. 2013 [cité 6 mai 2024];4. Disponible sur: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2013.00494/abstract>
14. Ge C, Du K, Luo M, Shen K, Zhou Y, Guo K, et al. Serologic response and safety of COVID-19 vaccination in HSCT or CAR T-cell recipients: a systematic review and meta-analysis. *Exp Hematol Oncol*. 16 août 2022;11(1):46.
15. Abid MA, Abid MB. SARS - CoV - 2 vaccine response in CAR T - cell therapy recipients: A systematic review and preliminary observations. *Hematol Oncol*. avr 2022;40(2):287-91.
16. Ram R, Hagin D, Kikozashvili N, Freund T, Amit O, Bar-On Y, et al. Safety and

Immunogenicity of the BNT162b2 mRNA COVID-19 Vaccine in Patients after Allogeneic HCT or CD19-based CART therapy—A Single-Center Prospective Cohort Study. *Transplant Cell Ther.* sept 2021;27(9):788-94.

17. Dhakal B, Abedin S, Fenske T, Chhabra S, Ledeboer N, Hari P, et al. Response to SARS-CoV-2 vaccination in patients after hematopoietic cell transplantation and CAR T-cell therapy. *Blood.* 7 oct 2021;138(14):1278-81.

18. Greenberger LM, Saltzman LA, Senefeld JW, Johnson PW, DeGennaro LJ, Nichols GL. Antibody response to SARS-CoV-2 vaccines in patients with hematologic malignancies. *Cancer Cell.* août 2021;39(8):1031-3.

19. Gastinne T, Le Bourgeois A, Coste-Burel M, Guillaume T, Peterlin P, Garnier A, et al. Safety and antibody response after one and/or two doses of BNT162b2 Anti - SARS - CoV - 2 mRNA vaccine in patients treated by CAR T cells therapy. *Br J Haematol.* janv 2022;196(2):360-2.

20. Lee D, Jordan AI, Menges MA, Lazaryan A, Nishihori T, Gaballa SR, et al. Pneumococcal Conjugate Vaccine Does Not Induce Humoral Response When Administrated Within the Six Months After CD19 CAR T-Cell Therapy. *Transplant Cell Ther.* avr 2023;29(4):277.e1-277.e9.

21. Walti CS, Loes AN, Shuey K, Krantz EM, Boonyaratanakornkit J, Keane-Candib J, et al. Humoral immunogenicity of the seasonal influenza vaccine before and after CAR-T-cell therapy: a prospective observational study. *J Immunother Cancer.* oct 2021;9(10):e003428.

22. Ram R, Freund T, Halperin T, Ben-Ami R, Amit O, Bar-On Y, et al. Immunogenicity of a Third Dose of the BNT162b2 mRNA Covid-19 Vaccine in Patients with Impaired B Cell Reconstitution After Cellular Therapy—A Single Center Prospective Cohort Study. *Transplant Cell Ther.* mai 2022;28(5):278.e1-278.e4.

23. Oh BLZ, Tan N, De Alwis R, Kunasegaran K, Chen Z, Poon M, et al. Enhanced BNT162b2 vaccine-induced cellular immunity in anti-CD19 CAR T cell-treated patients. *Blood.* 14 juill 2022;140(2):156-60.

24. Atanackovic D, Luetkens T, Omili D, Iraguha T, Lutfi F, Hardy NM, et al. Vaccine-induced T-cell responses against SARS-CoV-2 and its Omicron variant in patients with B cell-depleted lymphoma after CART therapy. *Blood.* 14 juill 2022;140(2):152-6.

25. Jarisch A, Wiercinska E, Huenecke S, Bremm M, Cappel C, Hauler J, et al. Immune Responses to SARS-CoV-2 Vaccination in Young Patients with Anti-CD19 Chimeric Antigen Receptor T Cell-Induced B Cell Aplasia. *Transplant Cell Ther.* juill 2022;28(7):366.e1-366.e7.

26. 2017 OMS tétanos.pdf.

27. Goulenok T, Bahuaud M, Francois C, Vanderhaegen MC, Alexandra JF, Aucouturier P, et al. Réponse vaccinale anti-pneumococcique et analyse de ses déterminants cliniques et immunologiques chez des sujets lupiques vaccinés contre le pneumocoque (PCV13/PPV23). *Rev Médecine Interne.* déc 2017;38:A87-8.

28. 2018 Prazuck IgG rougeole.pdf.

29. Bianchi FP, De Nitto S, Stefanizzi P, Larocca AMV, Germinario CA, Tafuri S. Immunity to rubella: an Italian retrospective cohort study. *BMC Public Health.* déc 2019;19(1):1490.

30. Egri N, Olivé V, Hernández-Rodríguez J, Castro P, De Guzman C, Heredia L, et al. CoVITEST: A Fast and Reliable Method to Monitor Anti-SARS-CoV-2 Specific T Cells From Whole Blood. *Front Immunol.* 5 juill 2022;13:848586.

31. Tudesq JJ, Yakoub-Agha M, Bay JO, Courbon C, Paul F, Picard M, et al. Prise en charge du syndrome de relargage cytokinique et du syndrome d'activation macrophagique après traitement par CAR-T cells : recommandations de la SFGM-TC. *Bull Cancer (Paris).* févr 2023;110(2):S116-22.

32. CAR T-cells : labellisation par l'Institut du premier consortium national de recherche sur les thérapies cellulaires et géniques - Actualités [Internet]. [cité 19 juill 2024]. Disponible sur: <https://www.e-cancer.fr/Actualites-et-evenements/Actualites/CAR-T-cells-labellisation-par-l-Institut-du-premier-consortium-national-de-recherche-sur-les-therapies-cellulaires-et-geniques>

FIGURES AND TABLES:

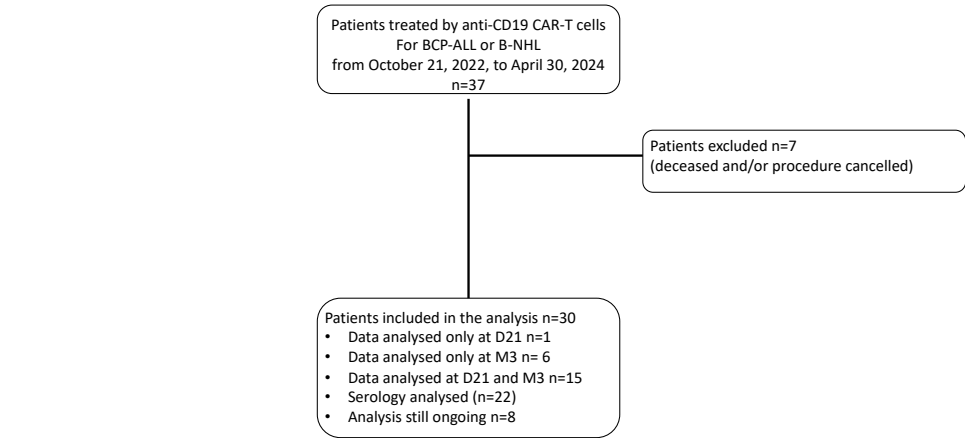


Figure 1: Flow chart of patients in the ReVacCT study. (BCP-ALL B cell progenitor acute lymphoblastic leukemia; B-NHL: B-Non Hodgkin Lymphoma)

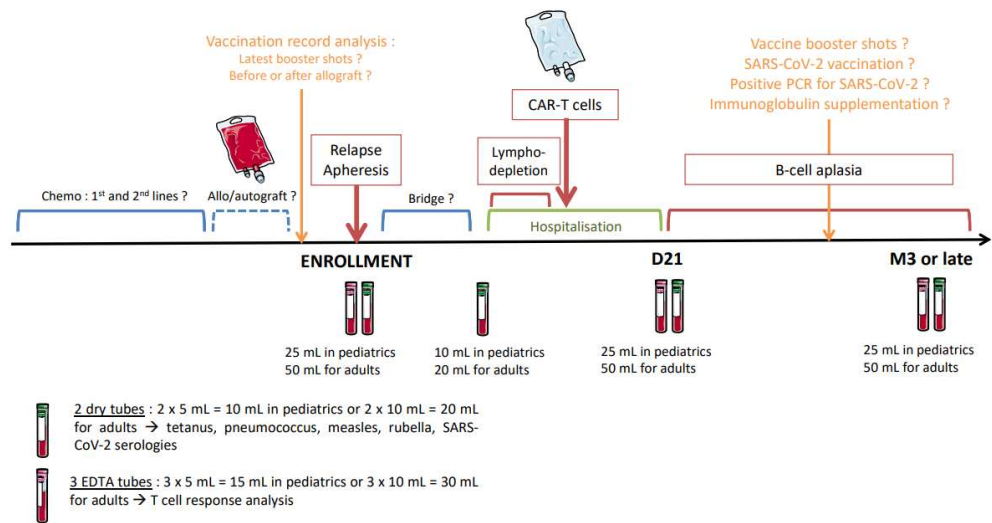


Figure 2: Overview of the ReVacCT clinical trial protocol

Table 1: Basic demographic and clinical characteristics of the population (n = 29).

Demographic and clinical characteristics		Population (n = 30)
Age at CAR-T cells (years)		65.00 [46.00-70.50]
Weight at CAR-T cells (kg)		70.00 [62.00-85.00]
Gender	Male	21 (72.41)
	Female	8 (27.59)
Histopathological diagnosis	B-ALL	2 (6.90)
	B-NHL	27 (93.10)
	De novo aggressive lymphoma	16 (59.26)
	Transformed indolent lymphoma	11 (40.74)
Lugano staging	Limited: I-II	3 (11.11)
	Advanced: III-IV	24 (88.89)
Number of treatment lines prior to CAR-T cells		2.00 [1.00-3.00]
Response to prior treatments	Primary refractory disease	8 (27.59)
	Relapsing disease	21 (72.41)
Time from initial diagnosis to CAR-T cells treatment (months)		28.20 [10.40-75.18]
Time from diagnosis of relapsing/refractory disease to CAR-T cells treatment (months)		3.10 [2.10-5.19]
Hematological treatments prior to CAR-T cells	Allogeneic hematopoietic stem cell transplant	1 (3.45)
	Autologous hematopoietic stem cell transplant	10 (34.48)
	Blinatumomab	1 (3.45)
	Inotuzumab	1 (3.45)
	Rituximab	27 (93.10)
Bridging treatment before CAR-T cells	High-intensity systemic therapy	19 (65.52)
	Low-intensity systemic therapy	4 (13.79)
	Radiotherapy	1 (3.45)
	No bridging or systemic corticosteroids	5 (17.24)
Lymphodepletion chemotherapy	Fludarabine-cyclophosphamide	29 (100.00)
	30 mg/m ² - 500 mg/m ² x 3 days	15 (51.72)
	25 mg/m ² - 250 mg/m ² x 3 days	2 (6.90)
	30 mg/m ² - 500 mg/m ² x 2 days	7 (24.14)
	30 mg/m ² - 300 mg/m ² x 3 days	3 (10.34)
	30 mg/m ² - 500 mg/m ² x 1 day	1 (3.45)
	30 mg/m ² x 3 days - 500mg/m ² x 2 days	1 (3.45)
	Bendamustine	0 (0.00)
	Cyclophosphamide alone	0 (0.00)
CAR-T cells product	Yescarta®	19 (65.52)
	Tecartus®	2 (6.90)
	Kymriah®	4 (13.79)
	Breyanzi®	4 (13.79)
Complications of CAR-T cells	CRS	24 (82.76)
	ICANS	12 (41.38)
	Transfer to intensive care unit	10 (34.48)
	Tocilizumab	18 (62.07)
	Systemic corticosteroids	13 (44.83)
	Immunoglobulin supplementation	2 (6.90)

*Lugano staging is applicable to patients with non-Hodgkin lymphoma and not with B-ALL, n = 27.

Data are expressed as median (IQR) or number (percentage).

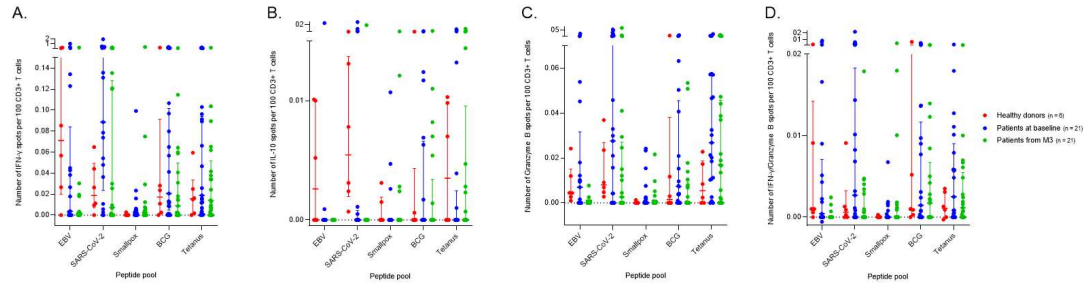


Figure 2: Comparison between healthy donors and patients at baseline and at M3 of the proportion of specific cytokine secretion by T-cells incubated with different peptide pools. These graphs show for each cytokine (A. IFN- γ ; B. IL-10; C. Granzyme B; D. IFN- γ /Granzyme B combination) the number of Spot Forming Unit (SFU) for 100 CD3⁺ T cells incubated with different peptide pools (EBV, Sars Cov 2, Smallpox, BCG and Tetanus). The unspecific activation of T-cells in the unstimulated condition was subtracted. Results as medians and IQRs are presented for healthy donors (n = 6) (red) and for patients at baseline (n = 21) (blue) and at M3 (n = 21) (green).

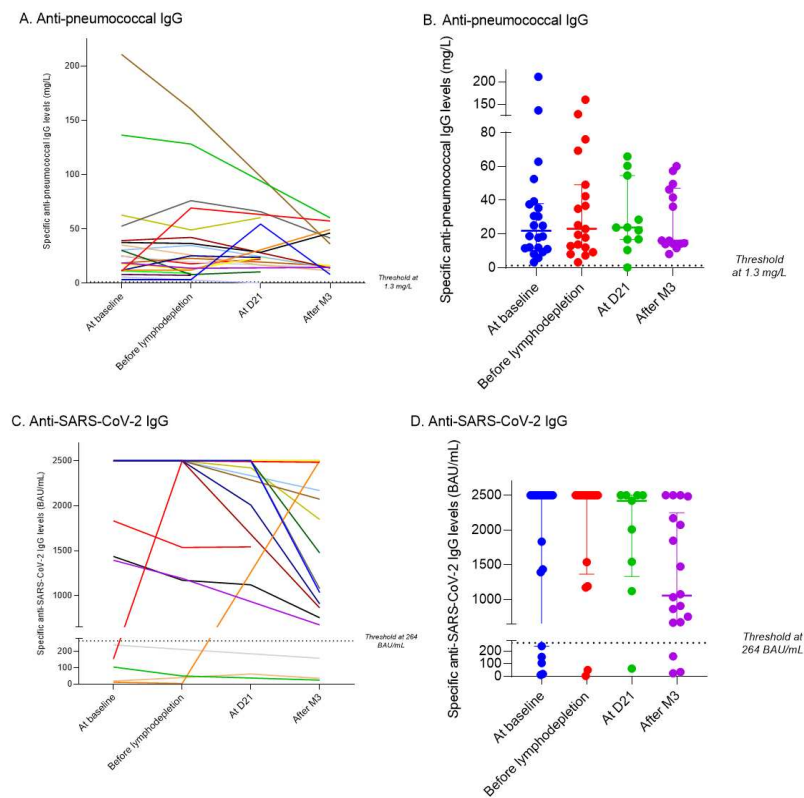
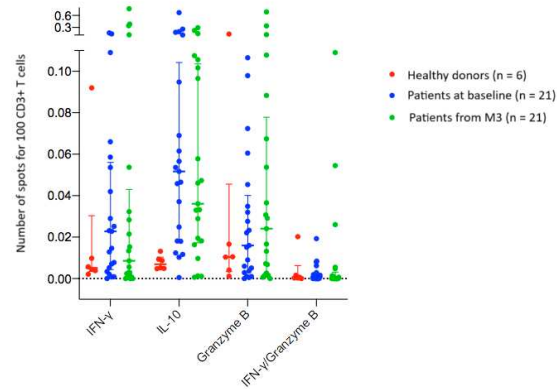
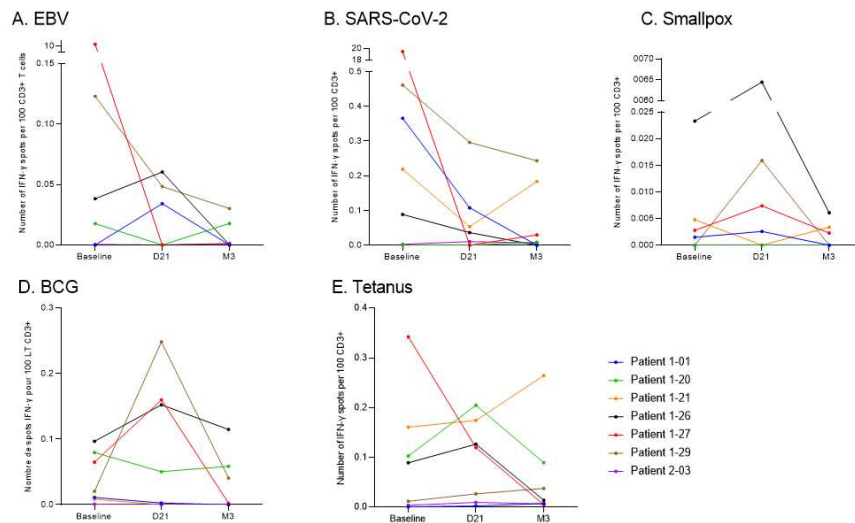


Figure 3: Evolution of specific IgG levels in patients during follow-up (n = 22). These graphs show the evolution of specific IgG levels for some vaccine antigens (A. and B. Pneumococcus; C. and D. SARS-CoV-2) during patient follow up. Individual patient trajectories from baseline, to M3 are represented in graphs A. and C. (each patient is represented by a different color). Medians and IQRs are presented in graphs B. and D. The dotted line represents the seroprotective threshold for each specific IgG, as defined in the literature (26–30).

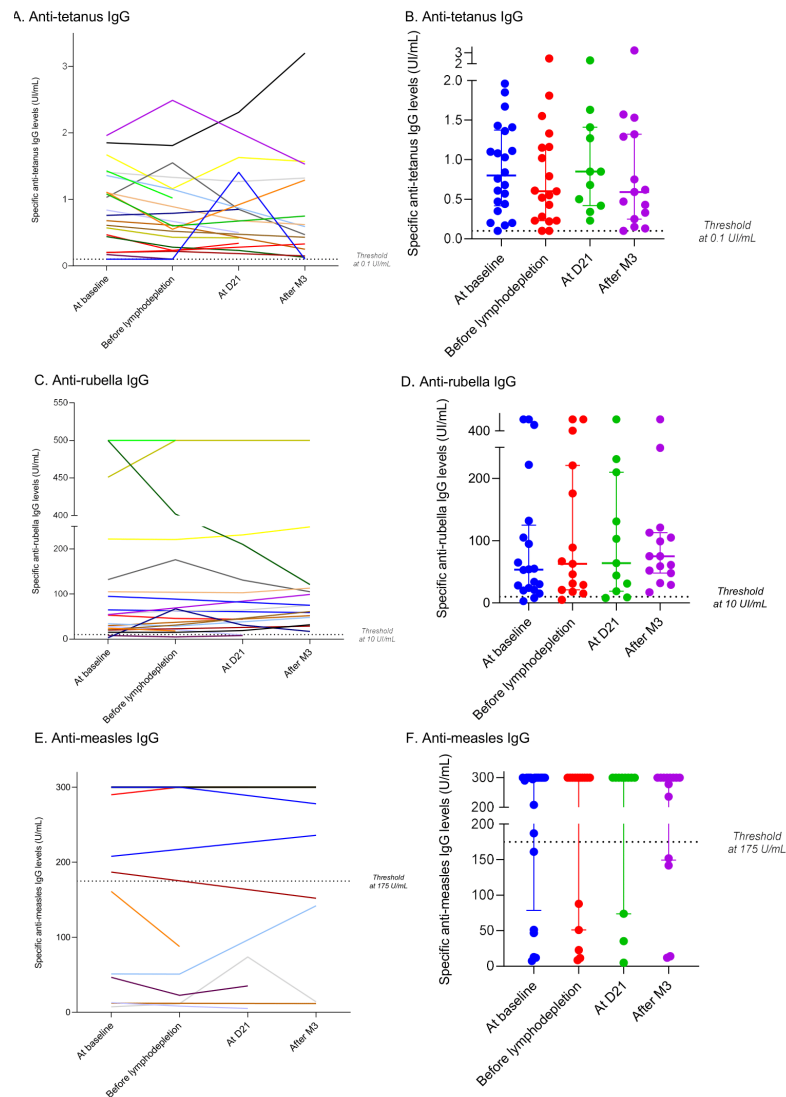
SUPPLEMENTAL FIGURES:



Supplemental Figure 1: Comparison of cytokine secretion by T cells incubated without stimulation between healthy donors, and patients at baseline and after M3. This graph shows, for each cytokine (IFN- γ , IL-10, Granzyme B, IFN- γ /Granzyme B), the number of Spot Forming Units (SFU) per 100 CD3+ T cells incubated in medium alone (unstimulated condition), for healthy donors (n = 6), patients at baseline (n = 21), and after M3 (n = 21). Medians and IQRs are presented.



Supplemental Figure 2: Evolution of specific IFN- γ -secreting T cells frequency in patients (n = 7): These graphs show the number of Spot Forming Units (SFU) for IFN- γ per 100 CD3+ T cells incubated with different peptide pools (A. EBV; B. SARS-CoV-2; C. Smallpox; D. BCG; E. Tetanus) in 7 patients (each patient represented by a different color). The results are presented at different time points: baseline, D21, and M3.



Supplemental Figure 3: Evolution of specific IgG levels in patients during follow-up (n = 22). These graphs show the evolution of specific IgG levels for some vaccine antigens (A. and B. Tetanus; C. and D. Rubella; E. and F. Measles) during patient follow up. Individual patient trajectories are represented in graphs A. and C. (each patient represented by a different color). Medians and IQRs are presented in graphs B and D. The dotted line represents the seroprotective threshold for each specific IgG, as defined in the literature (26–30).

4. Discussion :

4.1. Résumé des principaux résultats :

Mes travaux de recherche ont fourni dans un premier temps une analyse large de l'expression d'antigènes membranaires de 13 d'échantillons de LAL-B pédiatriques récoltées depuis 2020. L'expression membranaire de 361 antigènes a, en effet, pu être analysée. Ces données continueront d'être exploitées pour de nouvelles études, et notamment dans le cadre de la comparaison entre les leucémies au diagnostic et à la rechute. En effet, dans le cadre du recueil prospectif des échantillons médullaires, des couples diagnostic-rechute de LAL chez un même patient commencent à être identifiés. Par ailleurs, notre bio-collection comprend des échantillons de plusieurs LAL-T qui seront étudiées prochainement dans le cadre d'un projet de recherche pour un étudiant de Master 2.

Dans un deuxième temps, parmi les antigènes fortement exprimés par la majorité des LAL-B testées, nous avons pu sélectionner des cibles antigéniques d'intérêt, qui étaient associées à une lyse des cellules leucémiques, médiée par ADCC. Le ciblage de CD24, par un Ac monoclonal (ML5 IgG1) et des LT-mCD16⁺ permettait d'obtenir une lyse importante et efficace des cellules leucémiques, qui semblait corrélée au niveau d'expression membranaire du CD24. De même, la reconnaissance du CD156c aboutissait à une lyse significative des cellules leucémiques dans la majorité des échantillons testés. Par ailleurs, l'expression de Her2, bien que peu fréquente dans les LAL-B pédiatriques, est associée à un pronostic défavorable. Nos travaux ont permis de montrer que la reconnaissance de Her2 par un Ac monoclonal (Trastuzumab) et des LT-hCD16⁺ induisait une lyse tumorale significative médiée par ADCC. Cependant, une lyse plus importante est observée avec des LT équipés d'un CAR anti-Her2. CD24, CD156c et Her2 ont ainsi été identifiés comme des cibles antigéniques d'intérêt dans les LAL-B pédiatriques. Nos travaux indiquent que selon la modalité de reconnaissance de la cellule tumorale, CAR ou ADCC, la cinétique et niveau de lyse tumorale peuvent être différents.

Enfin, nous n'avons pas encore identifié de combinaison de cibles (2 ou 3 antigènes reconnus), ayant permis d'obtenir une lyse, médiée par ADCC, plus importante que celle obtenue après reconnaissance du CD24 seul. Les combinaisons testées (reconnaissance simultanée de CD22-CD24-CD268 ou CD24-CD47-CD123) induisaient une réduction de la lyse des cellules leucémiques médiée par ADCC en comparaison à la lyse observée en ciblant CD24 seul. D'autres combinaisons seront

testées dans les mois à venir, et différentes modalités de reconnaissance pourront être associées (cf partie 4.3).

4.2. Identification de cibles d'intérêt :

4.2.1. CD24 :

Parmi les 13 antigènes fortement exprimés par les LAL-B sélectionnés après analyse du phénotype membranaire, le CD24 est apparu comme une cible d'intérêt car associé à une forte activité ADCC qui semblait corrélée à son niveau d'expression.

Le CD24 est un antigène thermostable (heat stable antigen) identifié pour la première fois en 1978, et codé par un gène situé sur le chromosome 6 (6q21). Le CD24 est une protéine de petite taille (20 à 70kD), dont le niveau de glycosylation est très variable. Cette protéine ne possède pas de domaine transmembranaire, mais est enchâssée dans la membrane cellulaire par un résidu glycosyl-phosphatidylinositol. Le CD24 est très largement exprimé au sein de l'organisme, cependant, son niveau d'expression et son niveau de glycosylation varie selon les tissus (273,274). CD24 est ainsi exprimé par les cellules hématopoïétiques (cellules B, cellules T, polynucléaires neutrophiles, éosinophiles, macrophages et cellules dendritiques), et les cellules non hématopoïétiques (épithéliale, neurales, pancréatiques, musculaires, et kératinocytes). Il est intéressant de noter que CD24 est plus fortement exprimé par les cellules progénitrices ou métaboliquement actives que par des cellules très différenciées (274). Dans le système immunitaire, CD24 est exprimé par les cellules B progénitrices et les lymphocytes B matures, mais pas par les plasmocytes différenciés. De même, CD24 est fortement exprimé par les cellules T progénitrices mais pas par les LT matures. Dans les LT, il agit comme un régulateur de la prolifération T (275). Sur les cellules B, CD24 agit comme un co-stimulateur de l'expansion clonale des LT-CD4 (276,277).

L'expression de CD24 a également été observée dans de multiples pathologies tumorales (cancer ovarien, cancer du sein, cancer du pancréas, adénocarcinome pulmonaire à petites cellules, cancer de la prostate, tumeurs du système nerveux central mais également de nombreuses hémopathies). Son expression a également été mise en évidence au sein des vésicules circulantes libérée par les cellules tumorales (273,278–280). CD24 interagit avec des molécules d'adhésion cellulaire (Selectines) et favorise ainsi la dissémination métastatique des cellules cancéreuses. CD24 semble

également avoir un rôle de signalisation propre en interagissant notamment avec les tyrosine kinases Src, mais également STAT3, EGFR, Wnt/ β -caténines et la voie MAPK, favorisant ainsi la prolifération cellulaire (278,281). Dans certaines tumeurs solides, l'expression de CD24 est donc associée à un pronostic plus péjoratif avec des pathologies plus agressives et un potentiel métastatique plus élevé (274,280,282). Récemment, une équipe de Stanford a mis en évidence l'interaction de CD24 (exprimé par les cellules tumorales) avec Siglec10 (exprimé par les macrophages infiltrant les tumeurs) dans plusieurs pathologies tumorales (sein et ovaires). L'inhibition de cette interaction était associée à une augmentation de la phagocytose des cellules tumorales par les macrophages. Ainsi, CD24 pourrait également agir comme un inhibiteur de l'immunité anti-tumorale (« do not eat me » signal) (283), et apparaît donc comme une cible de choix dans plusieurs pathologies malignes.

Plusieurs études pré-cliniques ont ainsi montré l'efficacité anti-tumorale, d'Ac monoclonaux anti-CD24 (clone SWA11, ALB9, SN3 et G7mAb) nus ou couplés à une molécule cytotoxique, sur des lignées cellulaires ou des modèles préclinique de cancers solides (ovaires, colon, pancréas) (273,284). Des cellules T exprimant un CAR anti-CD24 (avec le scFv du clone SWA11) ont également montré une efficacité anti-tumorale sur des modèles pré-cliniques d'adénocarcinomes pancréatiques (285).

L'utilisation d'agents anti-CD24 a également été évaluée en clinique. La première étude, a été menée en France, et publiée pour la première fois en 1991. Cette étude multicentrique incluait 58 patients, présentant un Lymphome B non-Hodgkinien post-transplantation d'organes solides (n=12) ou de CSH (n=14). Les patients recevaient un traitement associant un Ac anti-CD24 (ALB9, IgG1 murine) et un Ac anti-CD21 (BL13, IgG1 murine). Une rémission a été obtenue chez 36 patients, et le traitement a été très bien toléré (286,287). En 2020, et dans une stratégie de vaccination, la bonne tolérance clinique d'un traitement ciblant le CD24 a été confirmée, par une étude prospective, incluant 36 patients traités pour un carcinome hépato-cellulaire, recevant un traitement adjuvant par cellules dendritiques chargés avec un peptide CD24 et des LT autologues cytotoxiques activés. L'OS à 4 ans était, dans cette série de 47% et 53% chez les patients ayant reçu ce traitement 2 ou 4 fois respectivement (288).

A la date du 6/12/2024 d'autres études cliniques utilisant une protéine de fusion comprenant un domaine de reconnaissance du CD24 sont en cours dans le cadre du traitement du mélanome (NCT04060407) ou d'autres tumeurs solides (NCT04552704). Une étude italienne rapporte également les résultats obtenus chez des patients traités pour une leucémie lymphoïde B chronique, ou un lymphome du manteau ayant reçu un traitement par Ac anti-CD24 (NCT05888701)

Nos travaux ont confirmé la forte expression de l'antigène CD24 par la majorité des LAL-B pédiatriques. Par ailleurs, la reconnaissance de CD24 par un Ac monoclonal murin, permettait d'aboutir à une activité ADCC, et une lyse importante des cellules leucémiques ciblées. L'existence de plusieurs molécules thérapeutique de grade clinique, et leur bonne tolérance clinique rapportée dans le contexte de tumeurs solides conforte l'intérêt de cet antigène. Si l'ADCC observée avec l'Ac murin utilisé dans nos expérimentations (clone ML5), est importante et corrélée au niveau d'expression du CD24, elle pourrait être améliorée. Il a été montré que la localisation de l'épitope sur l'antigène et particulièrement sa distance à la membrane cellulaire impactait l'ADCC. Ainsi, bien que CD24 soit une molécule de petite taille, nous souhaitons tester l'impact de l'épitope reconnu sur l'activité ADCC observée (266). Des tests de cytotoxicité seront donc menés en utilisant des Acs polyclonaux anti-CD24 (collaboration avec l'équipe MOBIDIC, U1236, K Tarte, M Cogne). Par ailleurs, différentes modalités de reconnaissance du CD24 seront évaluées et notamment, la construction d'un CAR anti-CD24 est en cours de conception pour évaluer l'efficacité anti-leucémique de cellules CAR T anti-CD24 *in vitro* seuls ou en combinaison avec de l'ADCC, et également sur des modèles *in vivo*. Ce projet est en partie financé par le Prix Capucine 2023.

4.2.2. Her2 :

Her2 (Récepteur 2 du Facteur de Croissance Épidermique Humain) est un récepteur membranaire possédant une activité tyrosine kinase. A ce jour, le ligand direct de Her2 n'a pas encore été identifié. C'est la dimérisation de Her2 (homodimérisation) ou avec un récepteur de la même famille (Her3, ou Her4) (hétérodimérisation) qui entraîne l'autophosphorylation du domaine intracellulaire, puis l'activation de plusieurs voies de signalisation intracellulaires notamment les voies MAPK, et PI3K conduisant à la prolifération, la survie, l'angiogenèse et la migration cellulaire. Les hétérodimères induisent une prolifération cellulaire plus importante, en particulier les dimères Her2-Her3. Par

ailleurs, les homodimères Her2, entraînent une délocalisation et une dégradation rapide de l'inhibiteur du cycle cellulaire P27 et donc une prolifération cellulaire (289).

Le rôle de Her2 dans la carcinogénèse mammaire a été identifié dès les années 80 (290). La surexpression de Her2 a été mise en évidence initialement dans 15 à 30% des carcinomes mammaires et était associée à un pronostic péjoratif (291). Une surexpression de Her2 a ensuite été identifiée dans de multiples tumeurs solides (œsophage, estomac, colon, ovaire, endomètre, col utérin, vessie, poumons) motivant le développement de thérapies ciblées anti-Her2 dans ces pathologies (289).

La première thérapie ciblant Her2 développée en clinique a été le Trastuzumab. Il s'agit d'un Ac monoclonal capable de reconnaître un des domaines extra-cellulaires de Her2, et abouti à une activité antitumorale par inhibition du signal intra-cellulaire et de la voie PI3K, inhibition de l'angiogénèse et lyse cellulaire médiée par ADCC (289). De larges études cliniques de phase III ont montré que le Trastuzumab conférait un avantage en survie sans progression et en survie globale dans les cancers du sein en première ligne et dans les maladies métastatiques. Le Trastuzumab a donc été approuvé dans le cadre du traitement des cancers mammaires Her2+ mais également des cancers gastriques en combinaison avec la chimiothérapie (289). D'autres molécules anti-Her2 ont ensuite été développées parmi lesquelles (1) certains inhibiteurs de tyrosine kinases (lapatinib, neratinib, tucatinib), (2) d'autres Ac monoclonaux : le Pertuzumab (Ac monoclonal humanisé anti-Her2 reconnaissant un épitope différent de celui reconnu par le Trastuzumab), (3) des Ac couplés : l'Ado-trastuzumab-Emtansine (trastuzumab couplé à une molécule cytotoxique la mertansine), ou encore le trastuzumab-deruxtecan (trastuzumab couplé à un inhibiteur de topoisomérase I) ; (4) un Ac ciblant deux épitopes (ECD2 et 4) d'Her2 (MBS301, Zanidatamab, KN026), (5) un Ac bi-spécifiques anti Her2/Her3 (Zenocutuzumab, MM111), (6) un BiTE, Ac anti Her2/CD3 (GB31302) (289,292,293).

Cependant, la pénétration des Ac au sein des tumeurs solides et leur persistance *in vivo* reste modérée. En 1993, l'équipe de Z.Eshhar en Israël, construit un récepteur CAR basé sur le même principe que le CAR anti-CD19 préalablement décrits (partie 1.6.13.1) et comprenant un scFv issu de l'Ac anti-Her2 (clone N29) reliée à une chaîne intracellulaire CD3 ζ ou γ du récepteur aux Ig (Fc ϵ R1 γ). Les LT équipés de ce CAR-anti-Her2 étaient capables de s'activer (sécrétion d'IL2) et de détruire des cellules surexprimant Her2 (294). De même que pour les cellules CAR-T anti-CD19, plusieurs

génération de CAR anti-Her2 ont ensuite été développées en y incorporant un ou plusieurs domaines de co-stimulation afin d'améliorer leur expansion et leur persistance. La conception de CAR comportant le CD28, 4-1BB, OX40, ICOS ou CD27 a ainsi permis d'obtenir une meilleure activité anti-tumorale dans des études pré-cliniques et cliniques dans les cancers du sein, de l'estomac, dans les sarcomes ou les glioblastomes (295). Cependant, l'utilisation de ces cellules CAR-T présente quelques limites dans le contexte de traitement des tumeurs solides et notamment, encore une fois, la pénétration des cellules thérapeutiques au sein d'un microenvironnement tumoral solide (capsule), hypoxique, et immunosuppresseur est limitée. Plusieurs équipes ont généré des cellules NK-CAR anti-HER2. Les cellules NK-CAR ont plusieurs avantages : une meilleure tolérance en terme de CRS liée à la sécrétion de cytokines différentes de celles sécrétées par les LT (INF γ , GM-CSF), l'absence d'allo-réactivité et donc l'absence de risque de GVH lors d'une utilisation en situation allogénique avec des cellules NK issues de donneurs sains, donc immédiatement disponibles, et enfin leur capacité à induire la lyse tumorale de façon également indépendante du CAR (reconnaissance anti-tumorale par le CD16 et ADCC, par NKG2D, ...) (296). Deux équipes aux Etats-Unis et en Allemagne, ont ainsi montré sur des modèles pré-cliniques murin de tumeurs mammaires, une efficacité anti-tumorale de cellules NK exprimant un CAR anti-Her2 ou un CAR humanisé anti-Her2 (CD28 – CD3 ζ) respectivement (297,298). Actuellement, plusieurs études cliniques en cours, proposent l'utilisation de cellules NK-CAR-anti-Her2 dans le traitement de tumeurs solides (NCT03383978, NCT05528341 et NCT05137275) (293).

Dans le cadre des hémopathies, une surexpression de Her2 a également été identifiée dans 30% des LAL-B de l'adulte et 15% des LAL-B pédiatriques, et son expression semble associée à un pronostic plus péjoratif (299,300). Dans le contexte de thérapies ciblées déjà en cours de développement, les équipes Nantaise identifiaient, dès 2009, Her2 comme une cible thérapeutique potentielle dans les LAL-B (301). Les équipes Nantaise ont ensuite mené une étude de phase 2 (NCT00724360), entre 2006 et 2011, qui incluait 15 patients (âge médian 62 ans (24-80)) porteurs d'une LAL-B réfractaire ou en rechute, surexprimant Her2. Ces patients recevaient un traitement par Trastuzumab seul en injections hebdomadaires. Seuls 2/15 patients (13%) ont présenté une réponse partielle, un seul cas de toxicité cardiaque de grade 3, réversible, avait été observé. Ces résultats, bien que décevants, confirmaient la bonne tolérance du Trastuzumab et soulevaient la question de la combinaison du Trastuzumab avec la chimiothérapie (302).

La faible efficacité clinique du Trastuzumab seul dans le traitement des LAL-B pourrait être optimisée en amplifiant l'activité ADCC induite ou en utilisant d'autres modalités de reconnaissance de la cible Her2 à la surface des LAL-B, par un récepteur CAR notamment. En effet, nos travaux de recherche ont montré que les LAL-B surexprimant Her2 l'exprimaient à niveau bien moindre que la lignée cellulaire BT474 de carcinome mammaire. Or la densité d'expression de l'antigène à la surface de la cellule cible mais également l'affinité de l'Ac monoclonal pour l'épitope reconnu impactent tous deux l'ADCC induite (262). Ainsi, le choix de l'Ac monoclonal anti-Her2 (Trastuzumab, Pertuzumab) peut permettre d'optimiser l'ADCC (265). Une autre stratégie consiste à modifier les Acs utilisés (profils de glycosylation, séquence d'acides-aminés du fragment Fc) pour amplifier la réponse ADCC. Ainsi le Margetuximab est un Ac anti-Her2 dont la séquence d'acides aminés du fragment Fc a été modifiée afin d'augmenter son affinité pour le FcγRIIIa (CD16), et qui induit ainsi une activité ADCC plus importante que le Trastuzumab *in vitro* sur des cellules tumorales Her2⁺ (303).

Au laboratoire, un récepteur chimérique (CAR) anti-Her2 comprenant le domaine de reconnaissance (scFv) du Trastuzumab, relié à la chaîne de transduction intracellulaire FcεR1γ par un linker a été produit (253). Ces LT-CAR-anti-Her2 ont une activité anti-tumorale sur des lignées cellulaires de cancer du sein ainsi que sur des échantillons de LAL-B Her2⁺ adultes et pédiatriques (304). Nos résultats montrent aussi une activité anti-tumorale *in vitro* des LT-CAR-anti-Her2 supérieure à l'activité ADCC observée avec le Trastuzumab combiné aux LT-CD16.

Ainsi, Her2 apparaît comme une cible potentielle dans certaines LAL-B de haut risque. La modalité de reconnaissance la plus efficace (CAR, Ac monoclonal anti-Her2 nu, modifié, ou couplé) doit encore être déterminée, même si des résultats précliniques encourageant sont observés avec les LT-CAR-anti-Her2 conçus dans l'équipe. Dans une stratégie de ciblage multiple, des LT exprimant à la fois le CD16 et un CAR anti-Her2 sera évaluée.

4.2.3. CD156c / ADAM10

Le CD156c (ADAM10) est une protéinase transmembranaire (A Disintegrin and Metalloprotease) impliquée dans l'adhésion cellulaire et la protéolyse (305). La principale fonction de CD156c est le clivage et le relargage du domaine extracellulaire des protéines transmembranaires telles que le facteur de croissance épidermique (EGFR), la bétacéline, Notch, CD30 ou les chaînes protéiques A et B liées à l'HLA de classe I (MIC-A et B) (306). La dérégulation de ce système de clivage des domaines

extracellulaires des récepteurs membranaires est impliquée dans certaines maladies auto-immunes et cardiovasculaires, la neurodégénérescence, certaines infections, et le cancer (307). Ainsi, le clivage de la partie extracellulaire de Notch, par ADAM10, entraîne le clivage puis la libération de son domaine intracellulaire par la γ -sécrétase. Ce dernier agit comme un facteur de transcription et favorise la prolifération cellulaire (308). ADAM10 a également été identifié comme l'une des principales molécules impliquées dans le clivage, puis le relargage du domaine extra-cellulaire d'Her2 dans le compartiment plasmatique. Ce domaine extra-cellulaire d'Her2 possède une activité kinase propre, favorisant, de façon indépendante, la prolifération cellulaire tumorale. Ainsi, cliniquement la détection de niveaux élevés de fragment extracellulaire d'Her2 dans le sérum des patientes suivies pour un carcinome mammaire métastatique, dont ADAM10 serait le principal pourvoyeur, est associé à un mauvais pronostic (309,310). Par ailleurs, MIC-A et MIC-B sont également des substrats d'ADAM10. Ces protéines sont exprimées à la surface des cellules cancéreuses et sont reconnues par NKG2D exprimé par les cellules NK. Cette reconnaissance induit une activation de la réponse immunitaire innée contre les cellules cancéreuses. Une surexpression d'ADAM10, et son activité protéolytique, sont donc associées à une altération de la réponse immunitaire contre les cellules cancéreuses, mais également à une diminution de l'efficacité des Acs thérapeutiques monoclonaux notamment dans le lymphome de Hodgkin (311–313). Une surexpression d'ADAM10 a déjà été décrite dans les leucémies, le lymphome et également dans les cancers du côlon, de la prostate et des ovaires (307,314).

Le développement clinique de petites molécules inhibant la famille des métalloprotéases s'est heurté à une trop grande toxicité musculo-squelettique (307). Cependant, l'INCB7839, qui est un inhibiteur de métalloprotéase (ADAM10 et ADAM17) a montré une efficacité antitumorale in vitro sur une lignée cellulaire de cancer du sein, en combinaison à un inhibiteur de Her2 (315). En Australie, Janes et al. ont développé un Ac dirigé contre le domaine de liaison au substrat d'ADAM10 (8C7). Cet Ac est capable de se lier à la conformation active d'ADAM10 et marque les cellules cancéreuses ayant une activation de la voie Notch. Il a également montré une activité antitumorale dans des modèles murins de cancers colorectaux et de gliomes (292,316–318). Cette même équipe a ensuite développé un Acs anti-ADAM10 humain, spécifique du même épitope (1H5). Cet Ac, combiné à l'irinotecan, est capable d'inhiber la croissance tumorale, dans des modèles précliniques de cancer colorectal (319). Aujourd'hui, à notre connaissance, seul l'INCB7839 est utilisée dans des

études cliniques. Un essai actuellement ouvert de phase I, propose en effet son utilisation dans le traitement des gliomes de haut grade pédiatriques (clinicaltrial.gov).

4.3. Recherche de combinaisons de cibles efficaces :

L'un des objectifs de mes travaux de recherche était de définir d'éventuelles combinaisons d'antigènes d'intérêt, qui une fois ciblés simultanément, seraient associés à une lyse plus importante des cellules tumorales (effet additif ou synergique). L'identification de telles combinaisons efficaces, pourrait alors permettre de limiter l'échappement tumoral par modulation antigénique et donc limiter les rechutes de LAL-B au décours des thérapies ciblées existantes (anti-CD19, anti-CD22).

Nous n'avons pas encore identifié de combinaison de cibles permettant d'obtenir, un effet synergique ou additif sur la lyse des cellules leucémiques *via* l'ADCC. Les deux combinaisons testées à ce jour (anti-CD22-CD24-CD268 et anti-CD24-CD47-CD123, combinaison par paires ou triple) ne permettaient pas d'obtenir une lyse tumorale plus élevée que lorsque le CD24 seul était ciblé. A l'exception de l'association anti-CD24-antiCD123, la combinaison de plusieurs Acs était même associée à une diminution de l'activité ADCC observée en ciblant le CD24 seul. Cette inhibition de l'activité ADCC n'était pas liée à un défaut de fixation des Acs purifiés, puisque leur révélation par un Acs secondaire a permis de vérifier leur fixation à la surface des cellules cibles.

Cette absence d'activité ADCC synergique pourrait s'expliquer par les nombreuses contraintes géométriques pouvant impacter l'ADCC. Comme préalablement décrit (voir partie 2.3), des paramètres physicochimiques à la fois de l'antigène et de l'Ac, influencent l'ADCC induite par la reconnaissance du fragment Fc par le CD16 (FCγRIIIa). En effet, le niveau d'expression de l'antigène cible à la surface de la cellule tumorale, mais également la distance entre l'épitope reconnu par l'Ac et la membrane cellulaire impactent fortement la lyse cellulaire induite. Plus le niveau d'expression de l'antigène à la surface de la cellule est élevé et plus le nombre de molécules d'Acs fixées est important. Cette densité élevée de Fc d'IgG induit une plus forte probabilité de dimérisation des récepteurs FCγRIIIa à la surface des cellules NK et donc une activité ADCC élevée. Plusieurs études ont, par ailleurs, rapporté que les Acs qui reconnaissent un épitope proche de la surface cellulaire sont associés à une ADCC plus importante (231,266). De plus, une fois l'Ac fixé sur son épitope, l'accessibilité du fragment Fc selon son orientation, impacte également sa reconnaissance par le

FcγRIIIa, et donc l'ADCC induite (231,269). Tous ces paramètres ne peuvent pas être anticipés pour chaque Ac et donc seuls des essais systématiques de combinaison d'Acs pourront permettre de trouver des combinaisons induisant des activités ADCC synergiques.

En 2006, l'équipe décrivait le concept d'augmenter le potentiel ADCC de patients traités par Acs monoclonaux grâce à un transfert adoptif de LT génétiquement modifiés pour exprimer le récepteur CD16γ. A partir de 2014, d'autres équipes ont développé le même type d'effecteurs cellulaires T-CD16 (voir partie 2.2.4). Dans tous les modèles *in vitro* et *in vivo* testés, les LT-CD16 étaient capables de s'activer et d'induire une lyse des cellules tumorales opsonisées avec un Ac monoclonal. Cependant, aucun effet synergique ou additif, obtenu en combinant plusieurs Acs monoclonaux n'a, à ce jour, été rapporté avec ces LT-CD16 (203,204,257,320). Toutefois de rares études en cancérologie et quelques études dans le domaine de la réponse humorale anti-virale rapportent de telles synergies. Ainsi, en 2002, L'équipe de Johan Lantto au Danemark, a montré l'intérêt d'associer plusieurs Acs monoclonaux dirigés contre les protéines de la famille Her (Her2/Her3/EGFR). En effet, la combinaison de 3 Acs, puis de 6 Acs (PanHer, Sym013, Symphogen) permettait d'obtenir une lyse tumorale plus importante qu'en présence de chaque Ac utilisé isolément, *in vitro* sur des lignées cellulaires, puis *in vivo* sur des modèles précliniques de cancers mammaires. Cette lyse tumorale, médiée par ADCC, permettait notamment de contourner des résistances aux Acs thérapeutiques existants (321,322). Par ailleurs, si très peu d'études présentent des effet synergiques ou additifs, en ADCC, dans des pathologies tumorales, plusieurs équipes ont montré des activité ADCC synergiques avec des Acs anti-viraux notamment anti-influenzae et anti-VIH (263,323–326).

En réponse à une infection, la réponse immunitaire physiologique repose sur la production d'Acs polyclonaux reconnaissant plusieurs antigènes viraux ou plusieurs épitopes à la surface d'un même antigène. En effet, les virus et les bactéries sont complexes (souches, facteurs de virulence, variabilité, etc.) et adoptent de nombreuses stratégies d'échappement. Reproduire la réponse immunitaire humorale polyclonale par une combinaison d'Acs thérapeutiques trouve donc tout son sens. Le développement clinique d'Acs monoclonaux a permis de mieux contrôler les propriétés pharmacologiques et la tolérance de ces molécules, mais s'éloigne de la réponse immunitaire physiologique. Ainsi, nous allons poursuivre nos travaux pour tester à la fois des combinaisons d'Acs de spécificité différente et des préparations d'Acs polyclonaux contre un même antigène exprimé à

la surface de LAL-B. Nous avons ainsi initié une collaboration avec l'équipe MOBIDIC (U1236, K Tarte, M Cogne) à Rennes pour tester en ADCC des Acs polyclonaux anti-CD24.

Une seconde stratégie, serait de combiner plusieurs modalités de reconnaissance des antigènes afin de contourner les contraintes géométriques imposées par l'ADCC. Une équipe du Minnesota a ainsi récemment développé des cellules NK dérivées de cellules pluripotentes, exprimant à la fois un CD16 non clivable de forte affinité pour le Fc, et un CAR anti-CD19. Ces cellules iDuo-NK étaient capables d'activité anti-tumorale sur des modèles *in vitro* ou pré-clinique d'hémopathie lymphoïdes B exprimant ou pas le CD19 (327,328). Ces premiers résultats montrent que la combinaison d'un CAR et d'un système de reconnaissance d'Acs monoclonaux pourrait permettre de limiter l'échappement tumoral. Nous avons ainsi programmé de produire des LT équipés d'un CAR anti-CD24 et du CD16.

5. Conclusion :

Les LAL-B en rechute ou réfractaires de l'enfant sont des pathologies de pronostic très péjoratif. Les thérapies ciblées actuellement utilisées en clinique (Acs anti-CD19 ou anti-CD22, cellules CAR-T anti-CD19) ont révolutionner la prise en charge de ces maladies de haut risque en permettant d'obtenir d'excellents taux de réponse précoces. Cependant, près d'un quart des maladies échappent à ces thérapies, par modulation antigénique. Les LT-mCD16⁺, développés dans l'équipe, capables d'ADCC, offrent une plateforme pour analyser la lyse induite en ciblant de multiples antigènes, seuls ou en combinaisons, grâce à des Acs murins combinés à ce support cellulaire unique. Nos travaux ont permis de réaliser une analyse étendue de l'expression membranaires des LAL-B pédiatriques. Nous avons pu, au sein des antigènes fortement exprimés, identifier des cibles d'intérêt. Ainsi, le CD24, et le CD156c semblent permettre une lyse cellulaire importante en ADCC. L'identification de combinaisons de cibles, visant à limiter l'échappement tumoral reposera sans doute sur l'utilisation d'Acs polyclonaux ou la combinaison de différentes modalités de reconnaissance qui seront testés dans les prochains mois.

REFERENCES :

1. Orphanet: Leucémie lymphoblastique aiguë [Internet]. [cité 11 juill 2024]. Disponible sur: <https://www.orpha.net/fr/disease/detail/513>
2. Siegel RL, Miller KD, Fuchs HE, Jemal A. Cancer statistics, 2022. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 2022;72(1):7-33.
3. Le Guyader-Peyrou S, Belot A, Maynadié M, Binder-Foucard F, Remontet L, Troussard X, et al. Cancer incidence in France over the 1980–2012 period: Hematological malignancies. *Revue d'Épidémiologie et de Santé Publique*. 1 avr 2016;64(2):103-12.
4. Hunger SP, Mullighan CG. Acute Lymphoblastic Leukemia in Children. *New England Journal of Medicine*. 15 oct 2015;373(16):1541-52.
5. Malard F, Mohty M. Acute lymphoblastic leukaemia. *The Lancet*. 4 avr 2020;395(10230):1146-62.
6. Buitenkamp TD, Izraeli S, Zimmermann M, Forestier E, Heerema NA, van den Heuvel-Eibrink MM, et al. Acute lymphoblastic leukemia in children with Down syndrome: a retrospective analysis from the Ponte di Legno study group. *Blood*. 2 janv 2014;123(1):70-7.
7. Zhang MY, Churpek JE, Keel SB, Walsh T, Lee MK, Loeb KR, et al. Germline ETV6 mutations in familial thrombocytopenia and hematologic malignancy. *Nat Genet*. févr 2015;47(2):180-5.
8. Shah S, Schrader KA, Waanders E, Timms AE, Vijai J, Miething C, et al. A recurrent germline PAX5 mutation confers susceptibility to pre-B cell acute lymphoblastic leukemia. *Nat Genet*. oct 2013;45(10):1226-31.
9. Inaba H, Mullighan CG. Pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica*. 10 sept 2020;105(11):2524-39.
10. Treviño LR, Yang W, French D, Hunger SP, Carroll WL, Devidas M, et al. Germline genomic variants associated with childhood acute lymphoblastic leukemia. *Nat Genet*. sept 2009;41(9):1001-5.
11. Gocho Y, Yang JJ. Genetic defects in hematopoietic transcription factors and predisposition to acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 5 sept 2019;134(10):793-7.
12. Ma Y, Dobbins SE, Sherborne AL, Chubb D, Galbiati M, Cazzaniga G, et al. Developmental timing of mutations revealed by whole-genome sequencing of twins with acute lymphoblastic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 30 avr 2013;110(18):7429-33.
13. Paulsson K, Lilljebjörn H, Biloglav A, Olsson L, Rissler M, Castor A, et al. The genomic landscape of high hyperdiploid childhood acute lymphoblastic leukemia. *Nat Genet*. juin 2015;47(6):672-6.
14. Enshaeh A, Vora A, Harrison CJ, Moppett J, Moorman AV. Defining low-risk high hyperdiploidy in patients with paediatric acute lymphoblastic leukaemia: a retrospective analysis of data from the UKALL97/99 and UKALL2003 clinical trials. *Lancet Haematol*. nov 2021;8(11):e828-39.
15. Holmfeldt L, Wei L, Diaz-Flores E, Walsh M, Zhang J, Ding L, et al. The genomic landscape of hypodiploid acute lymphoblastic leukemia. *Nat Genet*. mars 2013;45(3):242-52.
16. Moorman AV, Robinson H, Schwab C, Richards SM, Hancock J, Mitchell CD, et al. Risk-directed treatment intensification significantly reduces the risk of relapse among children and adolescents with acute lymphoblastic leukemia and intrachromosomal amplification of chromosome 21: a comparison of the MRC ALL97/99 and UKALL2003 trials. *J Clin Oncol*. 20 sept 2013;31(27):3389-96.
17. Østergaard A, Fiocco M, de Groot-Kruseman H, Moorman AV, Vora A, Zimmermann M, et al. ETV6::RUNX1 Acute Lymphoblastic Leukemia: how much therapy is needed for cure? *Leukemia*. 2024;38(7):1477-87.
18. Crist WM, Carroll AJ, Shuster JJ, Behm FG, Whitehead M, Vietti TJ, et al. Poor prognosis of children with pre-B acute lymphoblastic leukemia is associated with the t(1;19)(q23;p13): a Pediatric Oncology Group study. *Blood*. 1 juill 1990;76(1):117-22.
19. Górecki M, Koziół I, Kopystiecka A, Budzyńska J, Zawitkowska J, Lejman M. Updates in

KMT2A Gene Rearrangement in Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia. *Biomedicines*. 8 mars 2023;11(3):821.

20. Chiaretti S, Vitale A, Cazzaniga G, Orlando SM, Silvestri D, Fazi P, et al. Clinico-biological features of 5202 patients with acute lymphoblastic leukemia enrolled in the Italian AIEOP and GIMEMA protocols and stratified in age cohorts. *Haematologica*. nov 2013;98(11):1702-10.
21. Stanulla M, Dagdan E, Zaliouva M, Möricke A, Palmi C, Cazzaniga G, et al. IKZF1plus Defines a New Minimal Residual Disease-Dependent Very-Poor Prognostic Profile in Pediatric B-Cell Precursor Acute Lymphoblastic Leukemia. *J Clin Oncol*. 20 avr 2018;36(12):1240-9.
22. Biondi A, Schrappe M, De Lorenzo P, Castor A, Lucchini G, Gandemer V, et al. Imatinib after induction for treatment of children and adolescents with Philadelphia-chromosome-positive acute lymphoblastic leukaemia (EsPhALL): a randomised, open-label, intergroup study. *Lancet Oncol*. sept 2012;13(9):936-45.
23. Slayton WB, Schultz KR, Kairalla JA, Devidas M, Mi X, Pulsipher MA, et al. Dasatinib Plus Intensive Chemotherapy in Children, Adolescents, and Young Adults With Philadelphia Chromosome-Positive Acute Lymphoblastic Leukemia: Results of Children's Oncology Group Trial AALL0622. *J Clin Oncol*. 1 août 2018;36(22):2306-14.
24. Roberts KG, Mullighan CG. The Biology of B-Progenitor Acute Lymphoblastic Leukemia. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 1 juill 2020;10(7):a034835.
25. Den Boer ML, van Slegtenhorst M, De Menezes RX, Cheok MH, Buijs-Gladdines JGCAM, Peters STCJM, et al. A subtype of childhood acute lymphoblastic leukaemia with poor treatment outcome: a genome-wide classification study. *Lancet Oncol*. févr 2009;10(2):125-34.
26. Tanasi I, Ba I, Sirvent N, Braun T, Cuccuini W, Ballerini P, et al. Efficacy of tyrosine kinase inhibitors in Ph-like acute lymphoblastic leukemia harboring ABL-class rearrangements. *Blood*. 17 oct 2019;134(16):1351-5.
27. Gu Z, Churchman ML, Roberts KG, Moore I, Zhou X, Nakitandwe J, et al. PAX5-driven subtypes of B-progenitor acute lymphoblastic leukemia. *Nat Genet*. févr 2019;51(2):296-307.
28. Yasuda T, Tsuzuki S, Kawazu M, Hayakawa F, Kojima S, Ueno T, et al. Recurrent DUX4 fusions in B cell acute lymphoblastic leukemia of adolescents and young adults. *Nat Genet*. mai 2016;48(5):569-74.
29. Li JF, Dai YT, Lilljebjörn H, Shen SH, Cui BW, Bai L, et al. Transcriptional landscape of B cell precursor acute lymphoblastic leukemia based on an international study of 1,223 cases. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 11 déc 2018;115(50):E11711-20.
30. Griffith M, Griffith OL, Krysiak K, Skidmore ZL, Christopher MJ, Klco JM, et al. Comprehensive genomic analysis reveals FLT3 activation and a therapeutic strategy for a patient with relapsed adult B-lymphoblastic leukemia. *Exp Hematol*. juill 2016;44(7):603-13.
31. Oberley MJ, Gaynon PS, Bhojwani D, Pulsipher MA, Gardner RA, Hiemenz MC, et al. Myeloid lineage switch following chimeric antigen receptor T-cell therapy in a patient with TCF3-ZNF384 fusion-positive B-lymphoblastic leukemia. *Pediatr Blood Cancer*. sept 2018;65(9):e27265.
32. Gu Z, Churchman M, Roberts K, Li Y, Liu Y, Harvey RC, et al. Genomic analyses identify recurrent MEF2D fusions in acute lymphoblastic leukaemia. *Nat Commun*. 8 nov 2016;7:13331.
33. Gianni F, Beller L, Ferrando A. The Genetics and Mechanisms of T-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2 mars 2020;10(3):a035246.
34. Ma X, Edmonson M, Yergeau D, Muzny DM, Hampton OA, Rusch M, et al. Rise and fall of subclones from diagnosis to relapse in pediatric B-acute lymphoblastic leukaemia. *Nat Commun*. 19 mars 2015;6:6604.
35. Bene MC, Castoldi G, Knapp W, Ludwig WD, Matutes E, Orfao A, et al. Proposals for the immunological classification of acute leukemias. European Group for the Immunological Characterization of Leukemias (EGIL). *Leukemia*. oct 1995;9(10):1783-6.
36. Boris E, Theron A, Montagnon V, Rouquier N, Almeras M, Moreaux J, et al. Immunophenotypic portrait of leukemia-associated-phenotype markers in B acute lymphoblastic

leukemia. *Cytometry B Clin Cytom.* janv 2024;106(1):45-57.

37. Jj van D, L L, S B, J A, Vh van der V, J FM, et al. EuroFlow antibody panels for standardized n-dimensional flow cytometric immunophenotyping of normal, reactive and malignant leukocytes. *Leukemia* [Internet]. sept 2012 [cité 18 sept 2024];26(9). Disponible sur: <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.proxy.insermbiblio.inist.fr/22552007/>
38. Hrusák O, Porwit-MacDonald A. Antigen expression patterns reflecting genotype of acute leukemias. *Leukemia.* juill 2002;16(7):1233-58.
39. Fischer J, Paret C, El Malki K, Alt F, Wingerter A, Neu MA, et al. CD19 Isoforms Enabling Resistance to CART-19 Immunotherapy Are Expressed in B-ALL Patients at Initial Diagnosis. *J Immunother.* juin 2017;40(5):187-95.
40. Otero DC, Anzelon AN, Rickert RC. CD19 function in early and late B cell development: I. Maintenance of follicular and marginal zone B cells requires CD19-dependent survival signals. *J Immunol.* 1 janv 2003;170(1):73-83.
41. Otero DC, Rickert RC. CD19 function in early and late B cell development. II. CD19 facilitates the pro-B/pre-B transition. *J Immunol.* 1 déc 2003;171(11):5921-30.
42. Raponi S, De Propriis MS, Intoppa S, Milani ML, Vitale A, Elia L, et al. Flow cytometric study of potential target antigens (CD19, CD20, CD22, CD33) for antibody-based immunotherapy in acute lymphoblastic leukemia: analysis of 552 cases. *Leuk Lymphoma.* juin 2011;52(6):1098-107.
43. Tedder TF, Poe JC, Haas KM. CD22: a multifunctional receptor that regulates B lymphocyte survival and signal transduction. *Adv Immunol.* 2005;88:1-50.
44. Shah NN, Stevenson MS, Yuan CM, Richards K, Delbrook C, Kreitman RJ, et al. Characterization of CD22 expression in acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Blood Cancer.* juin 2015;62(6):964-9.
45. Thomas DA, O'Brien S, Jorgensen JL, Cortes J, Faderl S, Garcia-Manero G, et al. Prognostic significance of CD20 expression in adults with de novo precursor B-lineage acute lymphoblastic leukemia. *Blood.* 18 juin 2009;113(25):6330-7.
46. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ, Le Beau MM, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood.* 19 mai 2016;127(20):2391-405.
47. Pui CH. Acute leukemia in children. *Curr Opin Hematol.* juill 1996;3(4):249-58.
48. Ryan J, Quinn F, Meunier A, Boublikova L, Crampe M, Tewari P, et al. Minimal residual disease detection in childhood acute lymphoblastic leukaemia patients at multiple time-points reveals high levels of concordance between molecular and immunophenotypic approaches. *Br J Haematol.* janv 2009;144(1):107-15.
49. O'Connor D, Enshaie A, Bartram J, Hancock J, Harrison CJ, Hough R, et al. Genotype-Specific Minimal Residual Disease Interpretation Improves Stratification in Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia. *J Clin Oncol.* 1 janv 2018;36(1):34-43.
50. Möricke A, Zimmermann M, Valsecchi MG, Stanulla M, Biondi A, Mann G, et al. Dexamethasone vs prednisone in induction treatment of pediatric ALL: results of the randomized trial AIEOP-BFM ALL 2000. *Blood.* 28 avr 2016;127(17):2101-12.
51. Place AE, Stevenson KE, Vrooman LM, Harris MH, Hunt SK, O'Brien JE, et al. Intravenous pegylated asparaginase versus intramuscular native *Escherichia coli* L-asparaginase in newly diagnosed childhood acute lymphoblastic leukaemia (DFCI 05-001): a randomised, open-label phase 3 trial. *Lancet Oncol.* déc 2015;16(16):1677-90.
52. Larsen EC, Devidas M, Chen S, Salzer WL, Raetz EA, Loh ML, et al. Dexamethasone and High-Dose Methotrexate Improve Outcome for Children and Young Adults With High-Risk B-Acute Lymphoblastic Leukemia: A Report From Children's Oncology Group Study AALL0232. *J Clin Oncol.* 10 juill 2016;34(20):2380-8.
53. Conter V, Bartram CR, Valsecchi MG, Schrauder A, Panzer-Grümayer R, Möricke A, et al. Molecular response to treatment redefines all prognostic factors in children and adolescents with B-

cell precursor acute lymphoblastic leukemia: results in 3184 patients of the AIEOP-BFM ALL 2000 study. *Blood*. 22 avr 2010;115(16):3206-14.

54. Schrappe M, Bleckmann K, Zimmermann M, Biondi A, Möricke A, Locatelli F, et al. Reduced-Intensity Delayed Intensification in Standard-Risk Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia Defined by Undetectable Minimal Residual Disease: Results of an International Randomized Trial (AIEOP-BFM ALL 2000). *J Clin Oncol*. 20 janv 2018;36(3):244-53.

55. Graubner UB, Porzig S, Jorch N, Kolb R, Wessalowski R, Escherich G, et al. Impact of reduction of therapy on infectious complications in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Blood Cancer*. févr 2008;50(2):259-63.

56. Schmiegelow K, Forestier E, Hellebostad M, Heyman M, Kristinsson J, Söderhäll S, et al. Long-term results of NOPHO ALL-92 and ALL-2000 studies of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*. févr 2010;24(2):345-54.

57. Toft N, Birgens H, Abrahamsson J, Griškevičius L, Hallböök H, Heyman M, et al. Results of NOPHO ALL2008 treatment for patients aged 1-45 years with acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*. mars 2018;32(3):606-15.

58. Vora A, Goulden N, Wade R, Mitchell C, Hancock J, Hough R, et al. Treatment reduction for children and young adults with low-risk acute lymphoblastic leukaemia defined by minimal residual disease (UKALL 2003): a randomised controlled trial. *Lancet Oncol*. mars 2013;14(3):199-209.

59. Yeoh AEJ, Ariffin H, Chai ELL, Kwok CSN, Chan YH, Ponnudurai K, et al. Minimal residual disease-guided treatment deintensification for children with acute lymphoblastic leukemia: results from the Malaysia-Singapore acute lymphoblastic leukemia 2003 study. *J Clin Oncol*. 1 juill 2012;30(19):2384-92.

60. Pieters R, de Groot-Kruseman H, Van der Velden V, Fiocco M, van den Berg H, de Bont E, et al. Successful Therapy Reduction and Intensification for Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia Based on Minimal Residual Disease Monitoring: Study ALL10 From the Dutch Childhood Oncology Group. *J Clin Oncol*. 1 août 2016;34(22):2591-601.

61. Jackson RK, Liebich M, Berry P, Errington J, Liu J, Parker C, et al. Impact of dose and duration of therapy on dexamethasone pharmacokinetics in childhood acute lymphoblastic leukaemia-a report from the UKALL 2011 trial. *Eur J Cancer*. oct 2019;120:75-85.

62. Kato M, Ishimaru S, Seki M, Yoshida K, Shiraishi Y, Chiba K, et al. Long-term outcome of 6-month maintenance chemotherapy for acute lymphoblastic leukemia in children. *Leukemia*. mars 2017;31(3):580-4.

63. Nielsen SN, Grell K, Nersting J, Abrahamsson J, Lund B, Kanerva J, et al. DNA-thioguanine nucleotide concentration and relapse-free survival during maintenance therapy of childhood acute lymphoblastic leukaemia (NOPHO ALL2008): a prospective substudy of a phase 3 trial. *Lancet Oncol*. avr 2017;18(4):515-24.

64. Jeha S, Pei D, Choi J, Cheng C, Sandlund JT, Coustan-Smith E, et al. Improved CNS Control of Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia Without Cranial Irradiation: St Jude Total Therapy Study 16. *J Clin Oncol*. 10 déc 2019;37(35):3377-91.

65. Gaynon PS. Childhood acute lymphoblastic leukaemia and relapse. *Br J Haematol*. déc 2005;131(5):579-87.

66. Nguyen K, Devidas M, Cheng SC, La M, Raetz EA, Carroll WL, et al. Factors influencing survival after relapse from acute lymphoblastic leukemia: a Children's Oncology Group study. *Leukemia*. déc 2008;22(12):2142-50.

67. Oskarsson T, Söderhäll S, Arvidson J, Forestier E, Montgomery S, Bottai M, et al. Relapsed childhood acute lymphoblastic leukemia in the Nordic countries: prognostic factors, treatment and outcome. *Haematologica*. janv 2016;101(1):68-76.

68. Ko RH, Ji L, Barnette P, Bostrom B, Hutchinson R, Raetz E, et al. Outcome of Patients Treated for Relapsed or Refractory Acute Lymphoblastic Leukemia: A Therapeutic Advances in Childhood Leukemia Consortium Study. *J Clin Oncol*. 1 févr 2010;28(4):648-54.

69. Tallen G, Ratei R, Mann G, Kaspers G, Niggli F, Karachunsky A, et al. Long-term outcome in children with relapsed acute lymphoblastic leukemia after time-point and site-of-relapse stratification and intensified short-course multidrug chemotherapy: results of trial ALL-REZ BFM 90. *J Clin Oncol*. 10 mai 2010;28(14):2339-47.
70. Raetz EA, Borowitz MJ, Devidas M, Linda SB, Hunger SP, Winick NJ, et al. Reinduction platform for children with first marrow relapse of acute lymphoblastic Leukemia: A Children's Oncology Group Study[corrected]. *J Clin Oncol*. 20 août 2008;26(24):3971-8.
71. Freyer DR, Devidas M, La M, Carroll WL, Gaynon PS, Hunger SP, et al. Postrelapse survival in childhood acute lymphoblastic leukemia is independent of initial treatment intensity: a report from the Children's Oncology Group. *Blood*. 17 mars 2011;117(11):3010-5.
72. Peters C, Dalle JH, Locatelli F, Poetschger U, Sedlacek P, Buechner J, et al. Total Body Irradiation or Chemotherapy Conditioning in Childhood ALL: A Multinational, Randomized, Noninferiority Phase III Study. *J Clin Oncol*. 1 févr 2021;39(4):295-307.
73. Sun W, Malvar J, Sposto R, Verma A, Wilkes JJ, Dennis R, et al. Outcome of children with multiply relapsed B-cell acute lymphoblastic leukemia: a therapeutic advances in childhood leukemia & lymphoma study. *Leukemia*. 2018;32(11):2316-25.
74. Huang YH, Wan CL, Dai HP, Xue SL. Targeted therapy and immunotherapy for T cell acute lymphoblastic leukemia/lymphoma. *Ann Hematol*. août 2023;102(8):2001-13.
75. Maloney DG. Mechanism of action of rituximab. *Anticancer Drugs*. juin 2001;12 Suppl 2:S1-4.
76. Pp P, M A, A C, C L, S P, A G, et al. Surface antigens analysis reveals significant expression of candidate targets for immunotherapy in adult acute lymphoid leukemia. *Leukemia & lymphoma* [Internet]. févr 2011 [cité 18 sept 2024];52(2). Disponible sur: <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.proxy.insermbiblio.inist.fr/21077738/>
77. Maury S, Huguet F, Leguay T, Lacombe F, Maynadié M, Girard S, et al. Adverse prognostic significance of CD20 expression in adults with Philadelphia chromosome-negative B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica*. févr 2010;95(2):324-8.
78. Jeha S, Behm F, Pei D, Sandlund JT, Ribeiro RC, Razzouk BI, et al. Prognostic significance of CD20 expression in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 15 nov 2006;108(10):3302-4.
79. Borowitz MJ, Shuster J, Carroll AJ, Nash M, Look AT, Camitta B, et al. Prognostic Significance of Fluorescence Intensity of Surface Marker Expression in Childhood B-Precursor Acute Lymphoblastic Leukemia. A Pediatric Oncology Group Study. *Blood*. 1 juin 1997;89(11):3960-6.
80. Maury S, Chevret S, Thomas X, Heim D, Leguay T, Huguet F, et al. Rituximab in B-Lineage Adult Acute Lymphoblastic Leukemia. *N Engl J Med*. 15 sept 2016;375(11):1044-53.
81. Thomas DA, O'Brien S, Faderl S, Garcia-Manero G, Ferrajoli A, Wierda W, et al. Chemoimmunotherapy with a modified hyper-CVAD and rituximab regimen improves outcome in de novo Philadelphia chromosome-negative precursor B-lineage acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol*. 20 août 2010;28(24):3880-9.
82. Minard-Colin V, Aupérin A, Pillon M, Burke GAA, Barkauskas DA, Wheatley K, et al. Rituximab for High-Risk, Mature B-Cell Non-Hodgkin's Lymphoma in Children. *N Engl J Med*. 4 juin 2020;382(23):2207-19.
83. Löffler A, Kufer P, Lutterbüse R, Zettl F, Daniel PT, Schwenkenbecher JM, et al. A recombinant bispecific single-chain antibody, CD19 x CD3, induces rapid and high lymphoma-directed cytotoxicity by unstimulated T lymphocytes. *Blood*. 15 mars 2000;95(6):2098-103.
84. Nagorsen D, Kufer P, Baeuerle PA, Bargou R. Blinatumomab: a historical perspective. *Pharmacol Ther*. déc 2012;136(3):334-42.
85. Brandl C, Haas C, d'Argouges S, Fisch T, Kufer P, Brischwein K, et al. The effect of dexamethasone on polyclonal T cell activation and redirected target cell lysis as induced by a

CD19/CD3-bispecific single-chain antibody construct. *Cancer Immunol Immunother.* 1 oct 2007;56(10):1551-63.

86. Topp MS, Kufer P, Gökbuget N, Goebeler M, Klinger M, Neumann S, et al. Targeted therapy with the T-cell-engaging antibody blinatumomab of chemotherapy-refractory minimal residual disease in B-lineage acute lymphoblastic leukemia patients results in high response rate and prolonged leukemia-free survival. *J Clin Oncol.* 20 juin 2011;29(18):2493-8.

87. Topp MS, Gökbuget N, Zugmaier G, Degenhard E, Goebeler ME, Klinger M, et al. Long-term follow-up of hematologic relapse-free survival in a phase 2 study of blinatumomab in patients with MRD in B-lineage ALL. *Blood.* 20 déc 2012;120(26):5185-7.

88. Topp MS, Gökbuget N, Zugmaier G, Klappers P, Stelljes M, Neumann S, et al. Phase II trial of the anti-CD19 bispecific T cell-engager blinatumomab shows hematologic and molecular remissions in patients with relapsed or refractory B-precursor acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol.* 20 déc 2014;32(36):4134-40.

89. Topp MS, Gökbuget N, Stein AS, Zugmaier G, O'Brien S, Bargou RC, et al. Safety and activity of blinatumomab for adult patients with relapsed or refractory B-precursor acute lymphoblastic leukaemia: a multicentre, single-arm, phase 2 study. *Lancet Oncol.* janv 2015;16(1):57-66.

90. von Stackelberg A, Locatelli F, Zugmaier G, Handgretinger R, Trippett TM, Rizzari C, et al. Phase I/Phase II Study of Blinatumomab in Pediatric Patients With Relapsed/Refractory Acute Lymphoblastic Leukemia. *J Clin Oncol.* 20 déc 2016;34(36):4381-9.

91. Brown PA, Ji L, Xu X, Devidas M, Hogan LE, Borowitz MJ, et al. Effect of Postreinduction Therapy Consolidation With Blinatumomab vs Chemotherapy on Disease-Free Survival in Children, Adolescents, and Young Adults With First Relapse of B-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia: A Randomized Clinical Trial. *JAMA.* 2 mars 2021;325(9):833-42.

92. Kantarjian H, Stein A, Gökbuget N, Fielding AK, Schuh AC, Ribera JM, et al. Blinatumomab versus Chemotherapy for Advanced Acute Lymphoblastic Leukemia. *N Engl J Med.* 2 mars 2017;376(9):836-47.

93. DiJoseph JF, Armellino DC, Boghaert ER, Khandke K, Dougher MM, Sridharan L, et al. Antibody-targeted chemotherapy with CMC-544: a CD22-targeted immunoconjugate of calicheamicin for the treatment of B-lymphoid malignancies. *Blood.* 1 mars 2004;103(5):1807-14.

94. Shor B, Gerber HP, Sapra P. Preclinical and clinical development of inotuzumab-ozogamicin in hematological malignancies. *Mol Immunol.* oct 2015;67(2 Pt A):107-16.

95. DiJoseph JF, Dougher MM, Kalyandrug LB, Armellino DC, Boghaert ER, Hamann PR, et al. Antitumor efficacy of a combination of CMC-544 (inotuzumab ozogamicin), a CD22-targeted cytotoxic immunoconjugate of calicheamicin, and rituximab against non-Hodgkin's B-cell lymphoma. *Clin Cancer Res.* 1 janv 2006;12(1):242-9.

96. Advani A, Coiffier B, Czuczman MS, Dreyling M, Foran J, Gine E, et al. Safety, pharmacokinetics, and preliminary clinical activity of inotuzumab ozogamicin, a novel immunoconjugate for the treatment of B-cell non-Hodgkin's lymphoma: results of a phase I study. *J Clin Oncol.* 20 avr 2010;28(12):2085-93.

97. Kantarjian H, Thomas D, Jorgensen J, Jabbour E, Kebriaei P, Rytting M, et al. Inotuzumab ozogamicin, an anti-CD22-calicheamicin conjugate, for refractory and relapsed acute lymphocytic leukaemia: a phase 2 study. *Lancet Oncol.* avr 2012;13(4):403-11.

98. Kantarjian H, Thomas D, Jorgensen J, Kebriaei P, Jabbour E, Rytting M, et al. Results of inotuzumab ozogamicin, a CD22 monoclonal antibody, in refractory and relapsed acute lymphocytic leukemia. *Cancer.* 1 août 2013;119(15):2728-36.

99. Kantarjian HM, DeAngelo DJ, Stelljes M, Liedtke M, Stock W, Gökbuget N, et al. Inotuzumab ozogamicin versus standard of care in relapsed or refractory acute lymphoblastic leukemia: Final report and long-term survival follow-up from the randomized, phase 3 INO-VATE study. *Cancer.* 15 juill 2019;125(14):2474-87.

100. Kantarjian HM, DeAngelo DJ, Stelljes M, Martinelli G, Liedtke M, Stock W, et al. Inotuzumab Ozogamicin versus Standard Therapy for Acute Lymphoblastic Leukemia. *N Engl J Med*. 25 août 2016;375(8):740-53.
101. Jabbour E, Ravandi F, Kebriaei P, Huang X, Short NJ, Thomas D, et al. Salvage Chemoimmunotherapy With Inotuzumab Ozogamicin Combined With Mini-Hyper-CVD for Patients With Relapsed or Refractory Philadelphia Chromosome-Negative Acute Lymphoblastic Leukemia: A Phase 2 Clinical Trial. *JAMA Oncol*. 1 févr 2018;4(2):230-4.
102. Kantarjian H, Ravandi F, Short NJ, Huang X, Jain N, Sasaki K, et al. Inotuzumab ozogamicin in combination with low-intensity chemotherapy for older patients with Philadelphia chromosome-negative acute lymphoblastic leukaemia: a single-arm, phase 2 study. *Lancet Oncol*. févr 2018;19(2):240-8.
103. Bhojwani D, Sposto R, Shah NN, Rodriguez V, Yuan C, Stetler-Stevenson M, et al. Inotuzumab ozogamicin in pediatric patients with relapsed/refractory acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*. 2019;33(4):884-92.
104. Brivio E, Locatelli F, Lopez-Yurda M, Malone A, Díaz-de-Heredia C, Bielgorai B, et al. A phase 1 study of inotuzumab ozogamicin in pediatric relapsed/refractory acute lymphoblastic leukemia (ITCC-059 study). *Blood*. 25 mars 2021;137(12):1582-90.
105. Pennesi E, Brivio E, Ammerlaan ACJ, Jiang Y, Van der Velden VHJ, Beverloo HB, et al. Inotuzumab ozogamicin combined with chemotherapy in pediatric B-cell precursor CD22+ acute lymphoblastic leukemia: results of the phase IB ITCC-059 trial. *Haematologica*. 4 janv 2024;
106. Bhojwani D, Sposto R, Shah NN, Rodriguez V, Yuan C, Stetler-Stevenson M, et al. Inotuzumab ozogamicin in pediatric patients with relapsed/refractory acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*. 2019;33(4):884-92.
107. Mulé JJ, Shu S, Schwarz SL, Rosenberg SA. Adoptive immunotherapy of established pulmonary metastases with LAK cells and recombinant interleukin-2. *Science*. 28 sept 1984;225(4669):1487-9.
108. Rosenberg SA, Spiess P, Lafreniere R. A new approach to the adoptive immunotherapy of cancer with tumor-infiltrating lymphocytes. *Science*. 19 sept 1986;233(4770):1318-21.
109. Eshhar Z, Waks T, Gross G, Schindler DG. Specific activation and targeting of cytotoxic lymphocytes through chimeric single chains consisting of antibody-binding domains and the gamma or zeta subunits of the immunoglobulin and T-cell receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 15 janv 1993;90(2):720-4.
110. Friedmann-Morvinski D, Bendavid A, Waks T, Schindler D, Eshhar Z. Redirected primary T cells harboring a chimeric receptor require costimulation for their antigen-specific activation. *Blood*. 15 avr 2005;105(8):3087-93.
111. Hombach A, Wiczarkowicz A, Marquardt T, Heuser C, Usai L, Pohl C, et al. Tumor-specific T cell activation by recombinant immunoreceptors: CD3 zeta signaling and CD28 costimulation are simultaneously required for efficient IL-2 secretion and can be integrated into one combined CD28/CD3 zeta signaling receptor molecule. *J Immunol*. 1 déc 2001;167(11):6123-31.
112. Lee DW, Barrett DM, Mackall C, Orentas R, Grupp SA. The future is now: chimeric antigen receptors as new targeted therapies for childhood cancer. *Clin Cancer Res*. 15 mai 2012;18(10):2780-90.
113. Stamenkovic I, Seed B. CD19, the earliest differentiation antigen of the B cell lineage, bears three extracellular immunoglobulin-like domains and an Epstein-Barr virus-related cytoplasmic tail. *J Exp Med*. 1 sept 1988;168(3):1205-10.
114. Müschen M, Lee S, Zhou G, Feldhahn N, Barath VS, Chen J, et al. Molecular portraits of B cell lineage commitment. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 23 juill 2002;99(15):10014-9.
115. Naresh KN, Medeiros LJ, WHO Fifth Edition Classification Project. Introduction to the Fifth Edition of the World Health Organization Classification of Tumors of Hematopoietic and Lymphoid Tissues. *Mod Pathol*. déc 2023;36(12):100330.

116. Amorós-Pérez B, Rivas-Pardo B, Gómez del Moral M, Subiza JL, Martínez-Naves E. State of the Art in CAR-T Cell Therapy for Solid Tumors: Is There a Sweeter Future? *Cells*. 23 avr 2024;13(9):725.
117. Milone MC, Fish JD, Carpenito C, Carroll RG, Binder GK, Teachey D, et al. Chimeric receptors containing CD137 signal transduction domains mediate enhanced survival of T cells and increased antileukemic efficacy in vivo. *Mol Ther*. août 2009;17(8):1453-64.
118. Bachy E, Le Gouill S, Di Blasi R, Sesques P, Manson G, Cartron G, et al. A real-world comparison of tisagenlecleucel and axicabtagene ciloleucel CAR T cells in relapsed or refractory diffuse large B cell lymphoma. *Nat Med*. oct 2022;28(10):2145-54.
119. 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.
120. Kalos M, Levine BL, Porter DL, Katz S, Grupp SA, Bagg A, et al. T cells with chimeric antigen receptors have potent antitumor effects and can establish memory in patients with advanced leukemia. *Sci Transl Med*. 10 août 2011;3(95):95ra73.
121. Grupp SA, Kalos M, Barrett D, Aplenc R, Porter DL, Rheingold SR, et al. Chimeric antigen receptor-modified T cells for acute lymphoid leukemia. *N Engl J Med*. 18 avr 2013;368(16):1509-18.
122. 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.
123. Kochenderfer JN, Wilson WH, Janik JE, Dudley ME, Stetler-Stevenson M, Feldman SA, et al. Eradication of B-lineage cells and regression of lymphoma in a patient treated with autologous T cells genetically engineered to recognize CD19. *Blood*. 18 nov 2010;116(20):4099-102.
124. 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.
125. Lee DW, Kochenderfer JN, Stetler-Stevenson M, Cui YK, Delbrook C, Feldman SA, et al. T cells expressing CD19 chimeric antigen receptors for acute lymphoblastic leukaemia in children and young adults: a phase 1 dose-escalation trial. *Lancet*. 7 févr 2015;385(9967):517-28.
126. Maude SL, Teachey DT, Porter DL, Grupp SA. CD19-targeted chimeric antigen receptor T-cell therapy for acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 25 juin 2015;125(26):4017-23.
127. Maude SL, Laetsch TW, Buechner J, Rives S, Boyer M, Bittencourt H, et al. Tisagenlecleucel in Children and Young Adults with B-Cell Lymphoblastic Leukemia. *N Engl J Med*. 01 2018;378(5):439-48.
128. Lee DW, Santomasso BD, Locke FL, Ghobadi A, Turtle CJ, Brudno JN, et al. ASTCT Consensus Grading for Cytokine Release Syndrome and Neurologic Toxicity Associated with Immune Effector Cells. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2019;25(4):625-38.
129. Gauthier J, Turtle CJ. Insights into cytokine release syndrome and neurotoxicity after CD19-specific CAR-T cell therapy. *Curr Res Transl Med*. mai 2018;66(2):50-2.
130. Dourthe ME, Rabian F, Yakouben K, Chevillon F, Cabannes-Hamy A, Méchinaud F, et al. Determinants of CD19-positive vs CD19-negative relapse after tisagenlecleucel for B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*. déc 2021;35(12):3383-93.
131. Dourthe ME, Rabian F, Yakouben K, Cabannes A, Chevillon F, Chaillou D, et al. Safety and Efficacy of Tisagenlecleucel (CTL019) in B-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia in Children, Adolescents and Young Adults: The French Experience. *Blood*. 13 nov 2019;134(Supplement 1):3876-3876.
132. Laetsch TW, Maude SL, Rives S, Hiramatsu H, Bittencourt H, Bader P, et al. Three-Year Update of Tisagenlecleucel in Pediatric and Young Adult Patients With Relapsed/Refractory Acute Lymphoblastic Leukemia in the ELIANA Trial. *J Clin Oncol*. 20 mars 2023;41(9):1664-9.
133. Dourthe ME, Rabian F, Yakouben K, Chevillon F, Cabannes-Hamy A, Méchinaud F, et al. Determinants of CD19-positive vs CD19-negative relapse after tisagenlecleucel for B-cell acute

- lymphoblastic leukemia. *Leukemia*. déc 2021;35(12):3383-93.
134. Lamble AJ, Myers RM, Taraseviciute A, John S, Yates B, Steinberg SM, et al. Preinfusion factors impacting relapse immunophenotype following CD19 CAR T cells. *Blood Advances*. 20 févr 2023;7(4):575-85.
 135. Maude SL, Laetsch TW, Buechner J, Rives S, Boyer M, Bittencourt H, et al. Tisagenlecleucel in Children and Young Adults with B-Cell Lymphoblastic Leukemia. *N Engl J Med*. 01 2018;378(5):439-48.
 136. Stefanski HE, Eaton A, Baggott C, Rossoff J, Verneris MR, Prabhu S, et al. Higher doses of tisagenlecleucel are associated with improved outcomes: a report from the pediatric real-world CAR consortium. *Blood Adv*. 28 févr 2023;7(4):541-8.
 137. Liu Y, An L, Huang R, Xiong J, Yang H, Wang X, et al. Strategies to enhance CAR-T persistence. *Biomark Res*. 23 nov 2022;10(1):86.
 138. Bartoszewska E, Tota M, Kisielewska M, Skowron I, Sebastianka K, Stefaniak O, et al. Overcoming Antigen Escape and T-Cell Exhaustion in CAR-T Therapy for Leukemia. *Cells*. 23 sept 2024;13(18):1596.
 139. Hill JA, Li D, Turtle CJ. Infectious complications of CD19-targeted chimeric antigen receptor–modified T-cell immunotherapy. 2018;
 140. Hill JA, Giral S, Torgerson TR, Lazarus HM. CAR-T – and a side order of IgG, to go? – Immunoglobulin replacement in patients receiving CAR-T cell therapy. *Blood Reviews*. nov 2019;38:100596.
 141. Lickefett B, Chu L, Ortiz-Maldonado V, Warmuth L, Barba P, Doglio M, et al. Lymphodepletion – an essential but undervalued part of the chimeric antigen receptor T-cell therapy cycle. *Front Immunol*. 22 déc 2023;14:1303935.
 142. Kampouri E, Little JS, Rejeski K, Manuel O, Hammond SP, Hill JA. Infections after chimeric antigen receptor (CAR)-T-cell therapy for hematologic malignancies. *Transplant Infectious Dis*. nov 2023;25(S1):e14157.
 143. Wudhikarn K, Palomba ML, Pennisi M, Garcia-Recio M, Flynn JR, Devlin SM, et al. Infection during the first year in patients treated with CD19 CAR T cells for diffuse large B cell lymphoma. *Blood Cancer J*. 5 août 2020;10(8):79.
 144. Maude SL, Laetsch TW, Buechner J, Rives S, Boyer M, Bittencourt H, et al. Tisagenlecleucel in Children and Young Adults with B-Cell Lymphoblastic Leukemia. *N Engl J Med*. févr 2018;378(5):439-48.
 145. Yakoub-Agha I, Chabannon C, Bader P, Basak GW, Bonig H, Ciceri F, et al. Management of adults and children undergoing chimeric antigen receptor T-cell therapy: best practice recommendations of the European Society for Blood and Marrow Transplantation (EBMT) and the Joint Accreditation Committee of ISCT and EBMT (JACIE). *Haematologica*. févr 2020;105(2):297-316.
 146. Hill JA, Seo SK. How I prevent infections in patients receiving CD19-targeted chimeric antigen receptor T cells for B-cell malignancies. *Blood*. 20 août 2020;136(8):925-35.
 147. Reynolds G, Hall VG, Teh BW. Vaccine schedule recommendations and updates for patients with hematologic malignancy post-hematopoietic cell transplant or CAR T-cell therapy. *Transplant Infectious Dis*. nov 2023;25(S1):e14109.
 148. Walti CS, Krantz EM, Maalouf J, Boonyaratanakornkit J, Keane-Candib J, Joncas-Schronce L, et al. Antibodies to vaccine-preventable infections after CAR-T-cell therapy for B-cell malignancies. *JCI Insight* [Internet]. 29 avr 2021 [cité 3 nov 2023]; Disponible sur: <http://insight.jci.org/articles/view/146743>
 149. Bhoj VG, Arhontoulis D, Wertheim G, Capobianchi J, Callahan CA, Ellebrecht CT, et al. Persistence of long-lived plasma cells and humoral immunity in individuals responding to CD19-directed CAR T-cell therapy. *Blood*. 21 juill 2016;128(3):360-70.
 150. Mamani-Matsuda M, Cosma A, Weller S, Faili A, Staib C, Garçon L, et al. The human spleen

is a major reservoir for long-lived vaccinia virus-specific memory B cells. *Blood*. 1 mai 2008;111(9):4653-9.

151. Mahévas M, Michel M, Weill JC, Reynaud CA. Long-Lived Plasma Cells in Autoimmunity: Lessons from B-Cell Depleting Therapy. *Front Immunol* [Internet]. 2013 [cité 6 mai 2024];4. Disponible sur: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2013.00494/abstract>

152. Mahévas M, Patin P, Huetz F, Descatoire M, Cagnard N, Bole-Feysot C, et al. B cell depletion in immune thrombocytopenia reveals splenic long-lived plasma cells. *J Clin Invest*. 2 janv 2013;123(1):432-42.

153. Ge C, Du K, Luo M, Shen K, Zhou Y, Guo K, et al. Serologic response and safety of COVID-19 vaccination in HSCT or CAR T-cell recipients: a systematic review and meta-analysis. *Exp Hematol Oncol*. 16 août 2022;11(1):46.

154. Ram R, Hagin D, Kikozashvilli N, Freund T, Amit O, Bar-On Y, et al. Safety and Immunogenicity of the BNT162b2 mRNA COVID-19 Vaccine in Patients after Allogeneic HCT or CD19-based CART therapy-A Single-Center Prospective Cohort Study. *Transplant Cell Ther*. sept 2021;27(9):788-94.

155. Dhakal B, Abedin S, Fenske T, Chhabra S, Ledeboer N, Hari P, et al. Response to SARS-CoV-2 vaccination in patients after hematopoietic cell transplantation and CAR T-cell therapy. *Blood*. 7 oct 2021;138(14):1278-81.

156. Gastinne T, Le Bourgeois A, Coste-Burel M, Guillaume T, Peterlin P, Garnier A, et al. Safety and antibody response after one and/or two doses of BNT162b2 Anti-SARS-CoV-2 mRNA vaccine in patients treated by CAR T cells therapy. *Br J Haematol*. 2 sept 2021;

157. Greenberger LM, Saltzman LA, Senefeld JW, Johnson PW, DeGennaro LJ, Nichols GL. Antibody response to SARS-CoV-2 vaccines in patients with hematologic malignancies. *Cancer Cell*. août 2021;39(8):1031-3.

158. Lee D, Jordan AI, Menges MA, Lazaryan A, Nishihori T, Gaballa SR, et al. Pneumococcal Conjugate Vaccine Does Not Induce Humoral Response When Administrated Within the Six Months After CD19 CAR T-Cell Therapy. *Transplantation and Cellular Therapy*. avr 2023;29(4):277.e1-277.e9.

159. Walti CS, Loes AN, Shuey K, Krantz EM, Boonyaratanakornkit J, Keane-Candib J, et al. Humoral immunogenicity of the seasonal influenza vaccine before and after CAR-T-cell therapy: a prospective observational study. *J Immunother Cancer*. oct 2021;9(10):e003428.

160. Ram R, Hagin D, Kikozashvilli N, Freund T, Amit O, Bar-On Y, et al. Safety and Immunogenicity of the BNT162b2 mRNA COVID-19 Vaccine in Patients after Allogeneic HCT or CD19-based CART therapy—A Single-Center Prospective Cohort Study. *Transplantation and Cellular Therapy*. sept 2021;27(9):788-94.

161. Ram R, Freund T, Halperin T, Ben-Ami R, Amit O, Bar-On Y, et al. Immunogenicity of a Third Dose of the BNT162b2 mRNA Covid-19 Vaccine in Patients with Impaired B Cell Reconstitution After Cellular Therapy—A Single Center Prospective Cohort Study. *Transplantation and Cellular Therapy*. mai 2022;28(5):278.e1-278.e4.

162. Oh BLZ, Tan N, De Alwis R, Kunasegaran K, Chen Z, Poon M, et al. Enhanced BNT162b2 vaccine-induced cellular immunity in anti-CD19 CAR T cell-treated patients. *Blood*. 14 juill 2022;140(2):156-60.

163. Atanackovic D, Luetkens T, Omili D, Iraguha T, Lutfi F, Hardy NM, et al. Vaccine-induced T-cell responses against SARS-CoV-2 and its Omicron variant in patients with B cell-depleted lymphoma after CART therapy. *Blood*. 14 juill 2022;140(2):152-6.

164. Jarisch A, Wiercinska E, Huenecke S, Bremm M, Cappel C, Hauler J, et al. Immune Responses to SARS-CoV-2 Vaccination in Young Patients with Anti-CD19 Chimeric Antigen Receptor T Cell-Induced B Cell Aplasia. *Transplant Cell Ther*. juill 2022;28(7):366.e1-366.e7.

165. Fraietta JA, Nobles CL, Sammons MA, Lundh S, Carty SA, Reich TJ, et al. Disruption of TET2 promotes the therapeutic efficacy of CD19-targeted T cells. *Nature*. juin

2018;558(7709):307-12.

166. DHPC CAR T France VF_2.docx.pdf.

167. Verdun N, Marks P. Secondary Cancers after Chimeric Antigen Receptor T-Cell Therapy. *N Engl J Med*. 15 févr 2024;390(7):584-6.

168. Levine BL, Pasquini MC, Connolly JE, Porter DL, Gustafson MP, Boelens JJ, et al. Unanswered questions following reports of secondary malignancies after CAR-T cell therapy. *Nat Med*. févr 2024;30(2):338-41.

169. Ghilardi G, Fraietta JA, Gerson JN, Van Deerlin VM, Morrisette JJD, Caponetti GC, et al. T cell lymphoma and secondary primary malignancy risk after commercial CAR T cell therapy. *Nat Med*. avr 2024;30(4):984-9.

170. Lambie AJ, Schultz LM, Nguyen K, Hsieh EM, McNerney K, Rouce RH, et al. Risk of T-cell malignancy after CAR T-cell therapy in children, adolescents, and young adults. *Blood Advances*. 28 juin 2024;8(13):3544-8.

171. Sotillo E, Barrett DM, Black KL, Bagashev A, Oldridge D, Wu G, et al. Convergence of Acquired Mutations and Alternative Splicing of CD19 Enables Resistance to CART-19 Immunotherapy. *Cancer Discov*. déc 2015;5(12):1282-95.

172. Fischer J, Paret C, El Malki K, Alt F, Wingerter A, Neu MA, et al. CD19 Isoforms Enabling Resistance to CART-19 Immunotherapy Are Expressed in B-ALL Patients at Initial Diagnosis. *J Immunother*. 2017;40(5):187-95.

173. 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*. 2018;24(10):1504-6.

174. Gardner R, Wu D, Cherian S, Fang M, Hanafi LA, Finney O, et al. Acquisition of a CD19-negative myeloid phenotype allows immune escape of MLL-rearranged B-ALL from CD19 CAR-T-cell therapy. *Blood*. 19 2016;127(20):2406-10.

175. Rayes A, McMasters RL, O'Brien MM. Lineage Switch in MLL-Rearranged Infant Leukemia Following CD19-Directed Therapy. *Pediatric Blood & Cancer*. 2016;63(6):1113-5.

176. Grupp SA, Kalos M, Barrett D, Aplenc R, Porter DL, Rheingold SR, et al. Chimeric antigen receptor-modified T cells for acute lymphoid leukemia. *N Engl J Med*. 18 avr 2013;368(16):1509-18.

177. Haso W, Lee DW, Shah NN, Stetler-Stevenson M, Yuan CM, Pastan IH, et al. Anti-CD22-chimeric antigen receptors targeting B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 14 févr 2013;121(7):1165-74.

178. Fry TJ, Shah NN, Orentas RJ, Stetler-Stevenson M, Yuan CM, Ramakrishna S, et al. CD22-targeted CAR T cells induce remission in B-ALL that is naive or resistant to CD19-targeted CAR immunotherapy. *Nat Med*. 2018;24(1):20-8.

179. Cordoba S, Onuoha S, Thomas S, Pignataro DS, Hough R, Ghorashian S, et al. CAR T cells with dual targeting of CD19 and CD22 in pediatric and young adult patients with relapsed or refractory B cell acute lymphoblastic leukemia: a phase 1 trial. *Nat Med*. oct 2021;27(10):1797-805.

180. Ruella M, Barrett DM, Kenderian SS, Shestova O, Hofmann TJ, Perazzelli J, et al. Dual CD19 and CD123 targeting prevents antigen-loss relapses after CD19-directed immunotherapies. *J Clin Invest*. 126(10):3814-26.

181. Qin H, Ramakrishna S, Nguyen S, Fountaine TJ, Ponduri A, Stetler-Stevenson M, et al. Preclinical Development of Bivalent Chimeric Antigen Receptors Targeting Both CD19 and CD22. *Mol Ther Oncolytics*. 21 déc 2018;11:127-37.

182. Zah E, Lin MY, Silva-Benedict A, Jensen MC, Chen YY. T Cells Expressing CD19/CD20 Bispecific Chimeric Antigen Receptors Prevent Antigen Escape by Malignant B Cells. *Cancer Immunol Res*. 2016;4(6):498-508.

183. Ruella M, Maus MV. Catch me if you can: Leukemia Escape after CD19-Directed T Cell Immunotherapies. *Computational and Structural Biotechnology Journal*. 1 janv 2016;14:357-62.

184. Qin H, Ramakrishna S, Nguyen S, Fountaine TJ, Ponduri A, Stetler-Stevenson M, et al.

- Preclinical Development of Bivalent Chimeric Antigen Receptors Targeting Both CD19 and CD22. *Mol Ther Oncolytics*. 21 déc 2018;11:127-37.
185. Spiegel JY, Patel S, Muffly L, Hossain NM, Oak J, Baird JH, et al. CAR T cells with dual targeting of CD19 and CD22 in adult patients with recurrent or refractory B cell malignancies: a phase 1 trial. *Nat Med*. août 2021;27(8):1419-31.
 186. Ghorashian S, Lucchini G, Richardson R, Nguyen K, Terris C, Guvenel A, et al. CD19/CD22 targeting with cotransduced CAR T cells to prevent antigen-negative relapse after CAR T-cell therapy for B-cell ALL. *Blood*. 11 janv 2024;143(2):118-23.
 187. Wei J, Yang Y, Wang G, Liu M. Current landscape and future directions of bispecific antibodies in cancer immunotherapy. *Front Immunol*. 28 oct 2022;13:1035276.
 188. Zhao L, Li S, Wei X, Qi X, Liu D, Liu L, et al. A novel CD19/CD22/CD3 trispecific antibody enhances therapeutic efficacy and overcomes immune escape against B-ALL. *Blood*. 20 oct 2022;140(16):1790-802.
 189. Schubert I, Kellner C, Stein C, Kügler M, Schwenkert M, Saul D, et al. A single-chain triplebody with specificity for CD19 and CD33 mediates effective lysis of mixed lineage leukemia cells by dual targeting. *mAbs*. 1 janv 2011;3(1):21-30.
 190. Kügler M, Stein C, Kellner C, Mentz K, Saul D, Schwenkert M, et al. A recombinant trispecific single-chain Fv derivative directed against CD123 and CD33 mediates effective elimination of acute myeloid leukaemia cells by dual targeting. *Br J Haematol*. sept 2010;150(5):574-86.
 191. Darowski D, Kobold S, Jost C, Klein C. Combining the best of two worlds: highly flexible chimeric antigen receptor adaptor molecules (CAR-adaptors) for the recruitment of chimeric antigen receptor T cells. *MAbs*. 2019;11(4):621-31.
 192. Clémenceau B, Congy-Jolivet N, Gallot G, Vivien R, Gaschet J, Thibault G, et al. Antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) is mediated by genetically modified antigen-specific human T lymphocytes. *Blood*. 15 juin 2006;107(12):4669-77.
 193. Urbanska K, Lanitis E, Poussin M, Lynn RC, Gavin BP, Kelderman S, et al. A Universal Strategy for Adoptive Immunotherapy of Cancer through Use of a Novel T-cell Antigen Receptor. *Cancer Research*. 1 avr 2012;72(7):1844-52.
 194. Grote S, Mittelstaet J, Baden C, Chan KCH, Seitz C, Schlegel P, et al. Adapter chimeric antigen receptor (AdCAR)-engineered NK-92 cells: an off-the-shelf cellular therapeutic for universal tumor targeting. *Oncoimmunology*. 29 sept 2020;9(1):1825177.
 195. Seitz CM, Mittelstaet J, Atar D, Hau J, Reiter S, Illi C, et al. Novel adapter CAR-T cell technology for precisely controllable multiplex cancer targeting. *OncoImmunology*. 1 janv 2021;10(1):2003532.
 196. Atar D, Mast AS, Scheuermann S, Ruoff L, Seitz CM, Schlegel P. Adapter CAR T Cell Therapy for the Treatment of B-Lineage Lymphomas. *Biomedicines*. 28 sept 2022;10(10):2420.
 197. Cartellieri M, Feldmann A, Koristka S, Arndt C, Loff S, Ehninger A, et al. Switching CAR T cells on and off: a novel modular platform for retargeting of T cells to AML blasts. *Blood Cancer Journal*. août 2016;6(8):e458-e458.
 198. Rodgers DT, Mazagova M, Hampton EN, Cao Y, Ramadoss NS, Hardy IR, et al. Switch-mediated activation and retargeting of CAR-T cells for B-cell malignancies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2016;113(4):E459-68.
 199. Tamada K, Geng D, Sakoda Y, Bansal N, Srivastava R, Li Z, et al. Redirecting gene-modified T cells toward various cancer types using tagged antibodies. *Clinical Cancer Research*. 2012;18(23):6436-45.
 200. Cho JH, Collins JJ, Wong WW. Universal Chimeric Antigen Receptors for Multiplexed and Logical Control of T Cell Responses. *Cell*. 31 mai 2018;173(6):1426-1438.e11.
 201. Zhao J, Lin Q, Song Y, Liu D. Universal CARs, universal T cells, and universal CAR T cells. *J Hematol Oncol*. déc 2018;11(1):1-9.

202. Lohmueller JJ, Ham JD, Kvorjak M, Finn OJ. mSA2 affinity-enhanced biotin-binding CAR T cells for universal tumor targeting. *Oncoimmunology*. 2017;7(1):e1368604.
203. Kudo K, Imai C, Lorenzini P, Kamiya T, Kono K, Davidoff AM, et al. T lymphocytes expressing a CD16 signaling receptor exert antibody-dependent cancer cell killing. *Cancer Res*. 1 janv 2014;74(1):93-103.
204. Ochi F, Fujiwara H, Tanimoto K, Asai H, Miyazaki Y, Okamoto S, et al. Gene-modified human α/β -T cells expressing a chimeric CD16-CD3 ζ receptor as adoptively transferable effector cells for anticancer monoclonal antibody therapy. *Cancer Immunol Res*. mars 2014;2(3):249-62.
205. Edwards JP, Swers JS, Buonato JM, Zaritskaya L, Mu CJ, Gupta A, et al. Controlling CAR-T cell activity and specificity with synthetic SparX adapters. *Mol Ther*. 5 juin 2024;32(6):1835-48.
206. Rennert P, Su L, Dufort F, Birt A, Sanford T, Wu L, et al. A Novel CD19-Anti-CD20 Bridging Protein Prevents and Reverses CD19-Negative Relapse from CAR19 T Cell Treatment *In Vivo*. *Blood*. 13 nov 2019;134:252.
207. Minutolo NG, Sharma P, Poussin M, Shaw LC, Brown DP, Hollander EE, et al. Quantitative Control of Gene-Engineered T-Cell Activity through the Covalent Attachment of Targeting Ligands to a Universal Immune Receptor. *J Am Chem Soc*. 08 2020;142(14):6554-68.
208. Ruffo E, Butchy AA, Tivon Y, So V, Kvorjak M, Parikh A, et al. Post-translational covalent assembly of CAR and synNotch receptors for programmable antigen targeting. *Nat Commun*. 9 mai 2023;14(1):2463.
209. Urbanska K, Lynn RC, Stashwick C, Thakur A, Lum LG, Powell DJ. Targeted cancer immunotherapy via combination of designer bispecific antibody and novel gene-engineered T cells. *J Transl Med*. 13 déc 2014;12:347.
210. Karches CH, Benmebarek MR, Schmidbauer ML, Kurzay M, Klaus R, Geiger M, et al. Bispecific Antibodies Enable Synthetic Agonistic Receptor-Transduced T Cells for Tumor Immunotherapy. *Clin Cancer Res*. 1 oct 2019;25(19):5890-900.
211. Wermke M, Metzelder S, Kraus S, Sala E, Vucinic V, Fiedler W, et al. Updated Results from a Phase I Dose Escalation Study of the Rapidly-Switchable Universal CAR-T Therapy UniCAR-T-CD123 in Relapsed/Refractory AML. *Blood*. 2 nov 2023;142(Supplement 1):3465.
212. Stock S, Benmebarek MR, Kluever AK, Darowski D, Jost C, Stubenrauch KG, et al. Chimeric antigen receptor T cells engineered to recognize the P329G-mutated Fc part of effector-silenced tumor antigen-targeting human IgG1 antibodies enable modular targeting of solid tumors. *J Immunother Cancer*. juill 2022;10(7):e005054.
213. Flinn IW, Cohen JB, Akard LP, Jaglowski S, Vasconcelles M, Ranger A, et al. Preliminary Clinical Results of a Phase 1 Study Evaluating the Safety and Anti-Tumor Activity of ACTR707 in Combination with Rituximab in Subjects with Relapsed or Refractory CD20+ B-Cell Lymphoma. *Blood*. 29 nov 2018;132(Supplement 1):2966.
214. Munoz J, Flinn IW, Cohen JB, Sachs J, Exter B, Ranger A, et al. Results from a Phase 1 Study of ACTR707 in Combination with Rituximab in Patients with Relapsed or Refractory CD20+ B Cell Lymphoma. *Transplant Cell Ther*. févr 2024;30(2):241.e1-241.e8.
215. Nikolaenko L, Mulrone C, Riedell PA, Flinn IW, Cruz JC, Vaidya R, et al. First in Human Study of an on/Off Switchable CAR-T Cell Platform Targeting CD19 for B Cell Malignancies (CLBR001 + SWI019). *Blood*. 5 nov 2021;138(Supplement 1):2822.
216. Wermke M, Kraus S, Ehninger A, Bargou RC, Goebeler ME, Middeke JM, et al. Proof of concept for a rapidly switchable universal CAR-T platform with UniCAR-T-CD123 in relapsed/refractory AML. *Blood*. 3 juin 2021;137(22):3145-8.
217. Qin S, Tian W, Li M, Wei H, Sun L, Xie Q, et al. 1054P A phase Ia study to evaluate the safety, tolerability, pharmacokinetics and preliminary efficacy of a modular CLDN18.2-targeting PG CAR-T therapy (IBI345) in patients with CLDN18.2+ solid tumors. *Annals of Oncology*. 1 oct 2023;34:S638.
218. Savoy SKA, Boudreau JE. The Evolutionary Arms Race between Virus and NK Cells:

- Diversity Enables Population-Level Virus Control. *Viruses*. 17 oct 2019;11(10):959.
219. Kim S, Iizuka K, Aguila HL, Weissman IL, Yokoyama WM. In vivo natural killer cell activities revealed by natural killer cell-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 14 mars 2000;97(6):2731-6.
 220. Coënon L, Villalba M. From CD16a Biology to Antibody-Dependent Cell-Mediated Cytotoxicity Improvement. *Front Immunol*. 3 juin 2022;13:913215.
 221. Bruhns P, Iannascoli B, England P, Mancardi DA, Fernandez N, Jorieux S, et al. Specificity and affinity of human Fcγ receptors and their polymorphic variants for human IgG subclasses. *Blood*. 16 avr 2009;113(16):3716-25.
 222. Koene HR, Kleijer M, Algra J, Roos D, von dem Borne AE, de Haas M. Fc γ₃RIIIa-158V/F polymorphism influences the binding of IgG by natural killer cell Fc γ₃RIIIa, independently of the Fc γ₃RIIIa-48L/R/H phenotype. *Blood*. 1 août 1997;90(3):1109-14.
 223. de Haas M, Koene HR, Kleijer M, de Vries E, Simsek S, van Tol MJ, et al. A triallelic Fc γ₃ receptor type IIIA polymorphism influences the binding of human IgG by NK cell Fc γ₃RIIIa. *J Immunol*. 15 avr 1996;156(8):2948-55.
 224. Sondermann P, Huber R, Oosthuizen V, Jacob U. The 3.2-A crystal structure of the human IgG1 Fc fragment-Fc γ₃RIII complex. *Nature*. 20 juill 2000;406(6793):267-73.
 225. Sun Y, Izadi S, Callahan M, Deperalta G, Weeksler AT. Antibody-receptor interactions mediate antibody-dependent cellular cytotoxicity. *J Biol Chem*. juill 2021;297(1):100826.
 226. Deaglio S. Human CD38 and CD16 are functionally dependent and physically associated in natural killer cells. *Blood*. 1 avr 2002;99(7):2490-8.
 227. Anikeeva N, Steblyanko M, Fayngerts S, Kopylova N, Marshall DJ, Powers GD, et al. Integrin receptors on tumor cells facilitate NK cell-mediated antibody-dependent cytotoxicity: Cellular immune response. *Eur J Immunol*. août 2014;44(8):2331-9.
 228. Lanier LL, Yu G, Phillips JH. Co-association of CD3 zeta with a receptor (CD16) for IgG Fc on human natural killer cells. *Nature*. 14 déc 1989;342(6251):803-5.
 229. Wirthmueller U, Kurosaki T, Murakami MS, Ravetch JV. Signal transduction by Fc γ₃RIII (CD16) is mediated through the γ chain. *J Exp Med*. 1 mai 1992;175(5):1381-90.
 230. Vivier E, Rochet N, Kochan JP, Presky DH, Schlossman SF, Anderson P. Structural similarity between Fc receptors and T cell receptors. Expression of the γ-subunit of Fc ε₁RI in human T cells, natural killer cells and thymocytes. *J Immunol*. 15 déc 1991;147(12):4263-70.
 231. Murin CD. Considerations of Antibody Geometric Constraints on NK Cell Antibody Dependent Cellular Cytotoxicity. *Front Immunol*. 30 juill 2020;11:1635.
 232. Ting AT, Dick CJ, Schoon RA, Karnitz LM, Abraham RT, Leibson PJ. Interaction between lck and syk family tyrosine kinases in Fc γ₃ receptor-initiated activation of natural killer cells. *J Biol Chem*. 7 juill 1995;270(27):16415-21.
 233. Cassatella MA, Anegón I, Cuturi MC, Griskey P, Trinchieri G, Perussia B. Fc γ₃R(CD16) interaction with ligand induces Ca²⁺ mobilization and phosphoinositide turnover in human natural killer cells. Role of Ca²⁺ in Fc γ₃R(CD16)-induced transcription and expression of lymphokine genes. *J Exp Med*. 1 févr 1989;169(2):549-67.
 234. Lajoie L, Congy-Jolivet N, Bolzec A, Gouilleux-Gruart V, Sicard E, Sung HC, et al. ADAM17-mediated shedding of FcγRIIIA on human NK cells: identification of the cleavage site and relationship with activation. *J Immunol*. 15 janv 2014;192(2):741-51.
 235. Cecchetti S, Spadaro F, Lugini L, Podo F, Ramoni C. Functional role of phosphatidylcholine-specific phospholipase C in regulating CD16 membrane expression in natural killer cells. *Eur J Immunol*. oct 2007;37(10):2912-22.
 236. Liu JKH. The history of monoclonal antibody development - Progress, remaining challenges and future innovations. *Ann Med Surg (Lond)*. déc 2014;3(4):113-6.
 237. Richards JO, Karki S, Lazar GA, Chen H, Dang W, Desjarlais JR. Optimization of antibody binding to FcγRIIIa enhances macrophage phagocytosis of tumor cells. *Mol Cancer Ther*. août

2008;7(8):2517-27.

238. Stavenhagen JB, Gorlatov S, Tuaillon N, Rankin CT, Li H, Burke S, et al. Fc optimization of therapeutic antibodies enhances their ability to kill tumor cells in vitro and controls tumor expansion in vivo via low-affinity activating Fcγ receptors. *Cancer Res.* 15 sept 2007;67(18):8882-90.
239. Walker MR, Lund J, Thompson KM, Jefferis R. Aglycosylation of human IgG1 and IgG3 monoclonal antibodies can eliminate recognition by human cells expressing Fc γRI and/or Fc γRII receptors. *Biochem J.* 15 avr 1989;259(2):347-53.
240. Shields RL, Lai J, Keck R, O'Connell LY, Hong K, Meng YG, et al. Lack of fucose on human IgG1 N-linked oligosaccharide improves binding to human FcγRIII and antibody-dependent cellular toxicity. *J Biol Chem.* 26 juill 2002;277(30):26733-40.
241. Narvekar A, Pardeshi A, Jain R, Dandekar P. ADCC enhancement: A conundrum or a boon to mAb therapy? *Biologicals.* 1 sept 2022;79:10-8.
242. Dubois SP, Miljkovic MD, Fleisher TA, Pittaluga S, Hsu-Albert J, Bryant BR, et al. Short-course IL-15 given as a continuous infusion led to a massive expansion of effective NK cells: implications for combination therapy with antitumor antibodies. *J Immunother Cancer.* avr 2021;9(4):e002193.
243. Miyazaki T, Maiti M, Hennessy M, Chang T, Kuo P, Addepalli M, et al. NKTR-255, a novel polymer-conjugated rhIL-15 with potent antitumor efficacy. *J Immunother Cancer.* mai 2021;9(5):e002024.
244. Conlon K, Watson DC, Waldmann TA, Valentin A, Bergamaschi C, Felber BK, et al. Phase I study of single agent NIZ985, a recombinant heterodimeric IL-15 agonist, in adult patients with metastatic or unresectable solid tumors. *J Immunother Cancer.* nov 2021;9(11):e003388.
245. Treon SP, Hansen M, Branagan AR, Verselis S, Emmanouilides C, Kimby E, et al. Polymorphisms in FcγRIIIA (CD16) receptor expression are associated with clinical response to rituximab in Waldenström's macroglobulinemia. *J Clin Oncol.* 20 janv 2005;23(3):474-81.
246. Dall'Ozzo S, Tartas S, Painsaud G, Cartron G, Colombat P, Bardos P, et al. Rituximab-dependent cytotoxicity by natural killer cells: influence of FCGR3A polymorphism on the concentration-effect relationship. *Cancer Res.* 1 juill 2004;64(13):4664-9.
247. Clémenceau B, Congy-Jolivet N, Gallot G, Vivien R, Gaschet J, Thibault G, et al. Antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) is mediated by genetically modified antigen-specific human T lymphocytes. *Blood.* 15 juin 2006;107(12):4669-77.
248. Clémenceau B, Gallot G, Vivien R, Gaschet J, Campone M, Vié H. Long-term preservation of antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) of natural killer cells amplified in vitro from the peripheral blood of breast cancer patients after chemotherapy. *J Immunother.* 2006;29(1):53-60.
249. Bednarski JJ, Zimmerman C, Berrien-Elliott MM, Foltz JA, Becker-Hapak M, Neal CC, et al. Donor memory-like NK cells persist and induce remissions in pediatric patients with relapsed AML after transplant. *Blood.* 17 mars 2022;139(11):1670-83.
250. Romee R, Rosario M, Berrien-Elliott MM, Wagner JA, Jewell BA, Schappe T, et al. Cytokine-induced memory-like natural killer cells exhibit enhanced responses against myeloid leukemia. *Sci Transl Med.* 21 sept 2016;8(357):357ra123.
251. Lee SC, Shimasaki N, Lim JSJ, Wong A, Yadav K, Yong WP, et al. Phase I Trial of Expanded, Activated Autologous NK-cell Infusions with Trastuzumab in Patients with HER2-positive Cancers. *Clin Cancer Res.* 1 sept 2020;26(17):4494-502.
252. Vivier E, Rebuffet L, Narni-Mancinelli E, Cornen S, Igarashi RY, Fantin VR. Natural killer cell therapies. *Nature.* févr 2024;626(8000):727-36.
253. Clémenceau B, Valsesia-Wittmann S, Jallas AC, Vivien R, Rousseau R, Marabelle A, et al. In Vitro and In Vivo Comparison of Lymphocytes Transduced with a Human CD16 or with a Chimeric Antigen Receptor Reveals Potential Off-Target Interactions due to the IgG2 CH2-CH3 CAR-Spacer. *J Immunol Res.* 2015;2015:482089.
254. Oshimi K, Oshimi Y, Yamada O, Wada M, Hara T, Mizoguchi H. Cytotoxic T lymphocyte

triggering via CD16 is regulated by CD3 and CD8 antigens. Studies with T cell receptor (TCR)-alpha beta+/CD3+16+ and TCR-gamma delta+/CD3+16+ granular lymphocytes. *J Immunol.* 1 mai 1990;144(9):3312-7.

255. Engelhardt W, Matzke J, Schmidt RE. Activation-dependent expression of low affinity IgG receptors Fc gamma RII(CD32) and Fc gamma RIII(CD16) in subpopulations of human T lymphocytes. *Immunobiology.* avr 1995;192(5):297-320.

256. Rasoulouniriana D, Santana-Magal N, Gutwillig A, Farhat-Younis L, Wine Y, Saperia C, et al. A distinct subset of FcγRI-expressing Th1 cells exert antibody-mediated cytotoxic activity. *J Clin Invest.* 1 oct 2019;129(10):4151-64.

257. Rataj F, Jacobi SJ, Stoiber S, Asang F, Ogonek J, Tokarew N, et al. High-affinity CD16-polymorphism and Fc-engineered antibodies enable activity of CD16-chimeric antigen receptor-modified T cells for cancer therapy. *Br J Cancer.* janv 2019;120(1):79-87.

258. Rasoulouniriana D, Santana-Magal N, Gutwillig A, Farhat-Younis L, Tal L, Amar S, et al. T Cells Expressing a Modified FcγRI Exert Antibody-Dependent Cytotoxicity and Overcome the Limitations of CAR T-cell Therapy against Solid Tumors. *Cancer Immunol Res.* 2 juin 2023;11(6):792-809.

259. Loeff FC, van Egmond HME, Nijmeijer BA, Falkenburg JHF, Halkes CJ, Jedema I. Complement-dependent cytotoxicity induced by therapeutic antibodies in B-cell acute lymphoblastic leukemia is dictated by target antigen expression levels and augmented by loss of membrane-bound complement inhibitors. *Leuk Lymphoma.* sept 2017;58(9):1-14.

260. Derer S, Bauer P, Lohse S, Scheel AH, Berger S, Kellner C, et al. Impact of epidermal growth factor receptor (EGFR) cell surface expression levels on effector mechanisms of EGFR antibodies. *J Immunol.* 1 déc 2012;189(11):5230-9.

261. Collins DM, Madden SF, Gaynor N, AlSultan D, Le Gal M, Eustace AJ, et al. Effects of HER Family-targeting Tyrosine Kinase Inhibitors on Antibody-dependent Cell-mediated Cytotoxicity in HER2-expressing Breast Cancer. *Clin Cancer Res.* 1 févr 2021;27(3):807-18.

262. Velders MP, van Rhijn CM, Oskam E, Fleuren GJ, Warnaar SO, Litvinov SV. c. *Br J Cancer.* août 1998;78(4):478-83.

263. He W, Tan GS, Mullarkey CE, Lee AJ, Lam MMW, Krammer F, et al. Epitope specificity plays a critical role in regulating antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity against influenza A virus. *Proc Natl Acad Sci USA.* 18 oct 2016;113(42):11931-6.

264. Agus DB, Akita RW, Fox WD, Lewis GD, Higgins B, Pisacane PI, et al. Targeting ligand-activated ErbB2 signaling inhibits breast and prostate tumor growth. *Cancer Cell.* août 2002;2(2):127-37.

265. Shim H. One target, different effects: a comparison of distinct therapeutic antibodies against the same targets. *Exp Mol Med.* 31 oct 2011;43(10):539-49.

266. Cleary KLS, Chan HTC, James S, Glennie MJ, Cragg MS. Antibody Distance from the Cell Membrane Regulates Antibody Effector Mechanisms. *J.* 15 mai 2017;198(10):3999-4011.

267. Su B, Dispinseri S, Iannone V, Zhang T, Wu H, Carapito R, et al. Update on Fc-Mediated Antibody Functions Against HIV-1 Beyond Neutralization. *Front Immunol.* 2019;10:2968.

268. Bournazos S, DiLillo DJ, Goff AJ, Glass PJ, Ravetch JV. Differential requirements for FcγR engagement by protective antibodies against Ebola virus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1 oct 2019;116(40):20054-62.

269. Tolbert WD, Sherburn R, Gohain N, Ding S, Flinko R, Orlandi C, et al. Defining rules governing recognition and Fc-mediated effector functions to the HIV-1 co-receptor binding site. *BMC Biol.* 21 juill 2020;18(1):91.

270. Clémenceau B, Vivien R, Pellat C, Foss M, Thibault G, Vié H. The human natural killer cytotoxic cell line NK-92, once armed with a murine CD16 receptor, represents a convenient cellular tool for the screening of mouse mAbs according to their ADCC potential. *MAbs.* 1 juill 2013;5(4):587-94.

271. Ollier J, Kervarrec T, Samimi M, Benlalam H, Aumont P, Vivien R, et al. Merkel cell carcinoma and cellular cytotoxicity: sensitivity to cellular lysis and screening for potential target antigens suitable for antibody-dependent cellular cytotoxicity. *Cancer Immunology, Immunotherapy* : CII. août 2018;67(8):1209.
272. Rabia E, Garambois V, Dhommée C, Larbouret C, Lajoie L, Buscail Y, et al. Design and selection of optimal ErbB-targeting bispecific antibodies in pancreatic cancer. *Front Immunol*. 20 avr 2023;14:1168444.
273. Panagiotou E, Syrigos NK, Charpidou A, Kotteas E, Vathiotis IA. CD24: A Novel Target for Cancer Immunotherapy. *J Pers Med*. 28 juill 2022;12(8):1235.
274. Fang X, Zheng P, Tang J, Liu Y. CD24: from A to Z. *Cell Mol Immunol*. mars 2010;7(2):100-3.
275. Li O, Zheng P, Liu Y. CD24 expression on T cells is required for optimal T cell proliferation in lymphopenic host. *J Exp Med*. 18 oct 2004;200(8):1083-9.
276. Lu L, Chappel MS, Humphries RK, Osmond DG. Regulation of cell survival during B lymphopoiesis: increased pre-B cell apoptosis in CD24-transgenic mouse bone marrow. *Eur J Immunol*. sept 2000;30(9):2686-91.
277. Hunte BE, Capone M, Zlotnik A, Rennick D, Moore TA. Acquisition of CD24 expression by Lin-CD43+B220(low)ckit(hi) cells coincides with commitment to the B cell lineage. *Eur J Immunol*. nov 1998;28(11):3850-6.
278. Altevogt P, Sammar M, Hüser L, Kristiansen G. Novel insights into the function of CD24: A driving force in cancer. *Int J Cancer*. 1 févr 2021;148(3):546-59.
279. Gross Even-Zohar N, Pick M, Hofstetter L, Shaulov A, Nachmias B, Lebel E, et al. CD24 Is a Prognostic Marker for Multiple Myeloma Progression and Survival. *J Clin Med*. 20 mai 2022;11(10):2913.
280. Kristiansen G, Sammar M, Altevogt P. Tumour biological aspects of CD24, a mucin-like adhesion molecule. *J Mol Histol*. mars 2004;35(3):255-62.
281. Eyvazi S, Kazemi B, Dastmalchi S, Bandehpour M. Involvement of CD24 in Multiple Cancer Related Pathways Makes It an Interesting New Target for Cancer Therapy. *Curr Cancer Drug Targets*. 2018;18(4):328-36.
282. Baumann P, Cremers N, Kroese F, Orend G, Chiquet-Ehrismann R, Uede T, et al. CD24 expression causes the acquisition of multiple cellular properties associated with tumor growth and metastasis. *Cancer Res*. 1 déc 2005;65(23):10783-93.
283. Barkal AA, Brewer RE, Markovic M, Kowarsky M, Barkal SA, Zaro BW, et al. CD24 signalling through macrophage Siglec-10 is a target for cancer immunotherapy. *Nature*. août 2019;572(7769):392-6.
284. Li S, Chen D, Guo H, Yang Y, Liu D, Yang C, et al. IMM47, a humanized monoclonal antibody that targets CD24, exhibits exceptional anti-tumor efficacy by blocking the CD24/Siglec-10 interaction and can be used as monotherapy or in combination with anti-PD1 antibodies for cancer immunotherapy. *Antib Ther*. oct 2023;6(4):240-52.
285. Maliar A, Servais C, Waks T, Chmielewski M, Lavy R, Altevogt P, et al. Redirected T cells that target pancreatic adenocarcinoma antigens eliminate tumors and metastases in mice. *Gastroenterology*. nov 2012;143(5):1375-1384.e5.
286. Fischer A, Blanche S, Le Bidois J, Bordigoni P, Garnier JL, Niaudet P, et al. Anti-B-cell monoclonal antibodies in the treatment of severe B-cell lymphoproliferative syndrome following bone marrow and organ transplantation. *N Engl J Med*. 23 mai 1991;324(21):1451-6.
287. Benkerrou M, Jais JP, Leblond V, Durandy A, Sutton L, Bordigoni P, et al. Anti-B-cell monoclonal antibody treatment of severe posttransplant B-lymphoproliferative disorder: prognostic factors and long-term outcome. *Blood*. 1 nov 1998;92(9):3137-47.
288. Xu K, Meng Z, Mu X, Sun B, Chai Y. One Single Site Clinical Study: To Evaluate the Safety and Efficacy of Immunotherapy With Autologous Dendritic Cells, Cytokine-Induced Killer Cells in

Primary Hepatocellular Carcinoma Patients. *Front Oncol.* 2020;10:581270.

289. Iqbal N, Iqbal N. Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (HER2) in Cancers: Overexpression and Therapeutic Implications. *Mol Biol Int.* 2014;2014:852748.

290. Muller WJ, Sinn E, Pattengale PK, Wallace R, Leder P. Single-step induction of mammary adenocarcinoma in transgenic mice bearing the activated c-neu oncogene. *Cell.* 1 juill 1988;54(1):105-15.

291. Burstein HJ. The distinctive nature of HER2-positive breast cancers. *N Engl J Med.* 20 oct 2005;353(16):1652-4.

292. Vranić S, Bešlija S, Gatalica Z. Targeting HER2 expression in cancer: New drugs and new indications. *Bosn J Basic Med Sci.* 1 févr 2021;21(1):1-4.

293. Mercogliano MF, Bruni S, Mauro FL, Schillaci R. Emerging Targeted Therapies for HER2-Positive Breast Cancer. *Cancers (Basel).* 26 mars 2023;15(7):1987.

294. Stancovski I, Schindler DG, Waks T, Yarden Y, Sela M, Eshhar Z. Targeting of T lymphocytes to Neu/HER2-expressing cells using chimeric single chain Fv receptors. *J Immunol.* 1 déc 1993;151(11):6577-82.

295. Liu X, Zhang N, Shi H. Driving better and safer HER2-specific CARs for cancer therapy. *Oncotarget.* 22 sept 2017;8(37):62730-41.

296. Xie G, Dong H, Liang Y, Ham JD, Rizwan R, Chen J. CAR-NK cells: A promising cellular immunotherapy for cancer. *EBioMedicine.* sept 2020;59:102975.

297. Daldrup-Link HE, Meier R, Rudelius M, Piontek G, Piert M, Metz S, et al. In vivo tracking of genetically engineered, anti-HER2/neu directed natural killer cells to HER2/neu positive mammary tumors with magnetic resonance imaging. *Eur Radiol.* janv 2005;15(1):4-13.

298. Schönfeld K, Sahm C, Zhang C, Naundorf S, Brendel C, Odendahl M, et al. Selective inhibition of tumor growth by clonal NK cells expressing an ErbB2/HER2-specific chimeric antigen receptor. *Mol Ther.* févr 2015;23(2):330-8.

299. Chevallier P, Robillard N, Wuilleme-Toumi S, Méchinaud F, Harousseau JL, Avet-Loiseau H. Overexpression of Her2/neu is observed in one third of adult acute lymphoblastic leukemia patients and is associated with chemoresistance in these patients. *Haematologica.* nov 2004;89(11):1399-401.

300. Camuset M, Huault A, Grain A, Clémenceau B, Rialland F, Thomas C, et al. Therapeutic targets in childhood B-acute lymphoblastic leukemia: what about HER2/neu? *Hematological Oncology.* 17 sept 2020;hon.2799.

301. Chevallier P, Robillard N, Houille G, Ayari S, Guillaume T, Delaunay J, et al. Simultaneous study of five candidate target antigens (CD20, CD22, CD33, CD52, HER2) for antibody-based immunotherapy in B-ALL: a monocentric study of 44 cases. *Leukemia.* avr 2009;23(4):806-7.

302. Chevallier P, Robillard N, Charbonnier A, Raffoux E, Maury S, Carras S, et al. Trastuzumab for treatment of refractory/relapsed HER2-positive adult B-ALL: results of a phase 2 GRAALL study. *Blood.* 15 mars 2012;119(11):2474-7.

303. Musolino A, Gradishar WJ, Rugo HS, Nordstrom JL, Rock EP, Arnaldez F, et al. Role of Fcγ receptors in HER2-targeted breast cancer therapy. *J Immunother Cancer.* janv 2022;10(1):e003171.

304. Clemenceau B, Guillaume T, Robillard N, Vivien R, Peterlin P, Garnier A, et al. In Vitro Comparison of ADCC and CAR Sensitivity of Adult HER-2+ B-ALL Using the NK-92 Human Cell Line Transduced with a Human CD16 (ADCC) or an Anti-HER2 Chimeric Antigen Receptor (CAR). *Blood.* 2 déc 2016;128(22):5193-5193.

305. Duffy MJ, Mullooly M, O'Donovan N, Sukor S, Crown J, Pierce A, et al. The ADAMs family of proteases: new biomarkers and therapeutic targets for cancer? *Clin Proteomics.* 9 juin 2011;8(1):9.

306. Waldhauer I, Goehlsdorf D, Gieseke F, Weinschenk T, Wittenbrink M, Ludwig A, et al. Tumor-associated MICA is shed by ADAM proteases. *Cancer Res.* 1 août 2008;68(15):6368-76.

307. Saftig P, Reiss K. The « A Disintegrin And Metalloproteases » ADAM10 and ADAM17: novel drug targets with therapeutic potential? *Eur J Cell Biol.* 2011;90(6-7):527-35.

308. Kopan R, Ilagan MXG. The canonical Notch signaling pathway: unfolding the activation mechanism. *Cell*. 17 avr 2009;137(2):216-33.
309. Carney WP, Neumann R, Lipton A, Leitzel K, Ali S, Price CP. Potential clinical utility of serum HER-2/neu oncoprotein concentrations in patients with breast cancer. *Clin Chem*. oct 2003;49(10):1579-98.
310. Liu PCC, Liu X, Li Y, Covington M, Wynn R, Huber R, et al. Identification of ADAM10 as a major source of HER2 ectodomain sheddase activity in HER2 overexpressing breast cancer cells. *Cancer Biology & Therapy*. 1 juin 2006;5(6):657-64.
311. Tosetti F, Venè R, Camodeca C, Nuti E, Rossello A, D'Arrigo C, et al. Specific ADAM10 inhibitors localize in exosome-like vesicles released by Hodgkin lymphoma and stromal cells and prevent sheddase activity carried to bystander cells. *Oncoimmunology*. 2018;7(5):e1421889.
312. Zocchi MR, Camodeca C, Nuti E, Rossello A, Venè R, Tosetti F, et al. ADAM10 new selective inhibitors reduce NKG2D ligand release sensitizing Hodgkin lymphoma cells to NKG2D-mediated killing. *Oncoimmunology*. mai 2016;5(5):e1123367.
313. Eichenauer DA, Simhadri VL, von Strandmann EP, Ludwig A, Matthews V, Reiners KS, et al. ADAM10 inhibition of human CD30 shedding increases specificity of targeted immunotherapy in vitro. *Cancer Res*. 1 janv 2007;67(1):332-8.
314. Wu E, Croucher PI, McKie N. Expression of members of the novel membrane linked metalloproteinase family ADAM in cells derived from a range of haematological malignancies. *Biochem Biophys Res Commun*. 18 juin 1997;235(2):437-42.
315. Witters L, Scherle P, Friedman S, Fridman J, Caulder E, Newton R, et al. Synergistic inhibition with a dual epidermal growth factor receptor/HER-2/neu tyrosine kinase inhibitor and a disintegrin and metalloprotease inhibitor. *Cancer Res*. 1 sept 2008;68(17):7083-9.
316. Janes PW, Saha N, Barton WA, Kolev MV, Wimmer-Kleikamp SH, Nievergall E, et al. Adam meets Eph: an ADAM substrate recognition module acts as a molecular switch for ephrin cleavage in trans. *Cell*. 21 oct 2005;123(2):291-304.
317. Atapattu L, Saha N, Chheang C, Eissman MF, Xu K, Vail ME, et al. An activated form of ADAM10 is tumor selective and regulates cancer stem-like cells and tumor growth. *J Exp Med*. 22 août 2016;213(9):1741-57.
318. Yan H, Vail ME, Hii L, Guo N, McMurrick PJ, Oliva K, et al. Preferential Antibody and Drug Conjugate Targeting of the ADAM10 Metalloprotease in Tumours. *Cancers (Basel)*. 28 juin 2022;14(13):3171.
319. Saha N, Baek DS, Mendoza RP, Robev D, Xu Y, Goldgur Y, et al. Fully human monoclonal antibody targeting activated ADAM10 on colorectal cancer cells. *Biomed Pharmacother*. mai 2023;161:114494.
320. D'Aloia MM, Caratelli S, Palumbo C, Battella S, Arriga R, Lauro D, et al. T lymphocytes engineered to express a CD16-chimeric antigen receptor redirect T-cell immune responses against immunoglobulin G-opsonized target cells. *Cytotherapy*. févr 2016;18(2):278-90.
321. Jacobsen HJ, Poulsen TT, Dahlman A, Kjær I, Koefoed K, Sen JW, et al. Pan-HER, an Antibody Mixture Simultaneously Targeting EGFR, HER2, and HER3, Effectively Overcomes Tumor Heterogeneity and Plasticity. *Clin Cancer Res*. 15 sept 2015;21(18):4110-22.
322. Spiridon CI, Ghetie MA, Uhr J, Marches R, Li JL, Shen GL, et al. Targeting Multiple Her-2 Epitopes with Monoclonal Antibodies Results in Improved Antigrowth Activity of a Human Breast Cancer Cell Line in Vitro and in Vivo1. :12.
323. Zhai L, Zhang L, Jiang Y, Li B, Yang M, Victorovich KV, et al. Broadly neutralizing antibodies recognizing different antigenic epitopes act synergistically against the influenza B virus. *J Med Virol*. janv 2023;95(1):e28106.
324. Ramirez Valdez KP, Kuwata T, Maruta Y, Tanaka K, Alam M, Yoshimura K, et al. Complementary and synergistic activities of anti-V3, CD4bs and CD4i antibodies derived from a single individual can cover a wide range of HIV-1 strains. *Virology*. 15 janv 2015;475:187-203.

325. Yaffe ZA, Ding S, Sung K, Chohan V, Marchitto L, Doepker L, et al. Reconstruction of a polyclonal ADCC antibody repertoire from an HIV-1 non-transmitting mother. *iScience*. 19 mai 2023;26(5):106762.
326. Pollara J, Bonsignori M, Moody MA, Liu P, Alam SM, Hwang KK, et al. HIV-1 vaccine-induced C1 and V2 Env-specific antibodies synergize for increased antiviral activities. *J Virol*. juill 2014;88(14):7715-26.
327. Woan KV, Kim H, Bjordahl R, Davis ZB, Gaidarova S, Goulding J, et al. Harnessing features of adaptive NK cells to generate iPSC-derived NK cells for enhanced immunotherapy. *Cell Stem Cell*. 2 déc 2021;28(12):2062-2075.e5.
328. Cichocki F, Goodridge JP, Bjordahl R, Mahmood S, Davis ZB, Gaidarova S, et al. Dual antigen-targeted off-the-shelf NK cells show durable response and prevent antigen escape in lymphoma and leukemia. *Blood*. 8 déc 2022;140(23):2451-62.

ANNEXE : Liste des publications réalisées pendant le doctorat

Publications scientifiques en rapport avec les travaux de recherche :

- **Grain A**, Ollier J, Guillaume T, Chevallier P, Le Calvez B, Eveillard M, Clémenceau B. Two Ways of Targeting a CD19 Positive Relapse of Acute Lymphoblastic Leukaemia after Anti-CD19 CAR-T Cells. *Biomedicines*. 2023 Jan 25;11(2):345. doi: 10.3390/biomedicines11020345. PMID: 36830882; PMCID: PMC9953531.

Liste des publications scientifique au sein de l'équipe de recherche :

- Clémenceau B, Guillaume T, Coste-Burel M, Peterlin P, Garnier A, Le Bourgeois A, Jullien M, Ollier J, **Grain A**, Béné MC, Vié H, Chevallier P. SARS-CoV-2 T-Cell Responses in Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Recipients following Two Doses of BNT162b2 mRNA Vaccine. *Vaccines (Basel)*. 2022 Mar 14;10(3):448. doi: 10.3390/vaccines10030448. PMID: 35335079; PMCID: PMC8950166.
- Clémenceau B, Le Bourgeois A, Guillaume T, Coste-Burel M, Peterlin P, Garnier A, Jullien M, Ollier J, **Grain A**, Béné MC, Chevallier P. Strong SARS-CoV-2 T-Cell Responses after One or Two COVID-19 Vaccine Boosters in Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Recipients. *Cells*. 2022 Sep 27;11(19):3010. doi: 10.3390/cells11193010. PMID: 36230971; PMCID: PMC9563037.
- Jullien M, Coste-Burel M, Clémenceau B, Letailleur V, Guillaume T, Peterlin P, Garnier A, Bourgeois AL, Imbert BM, Ollier J, **Grain A**, Touzeau C, Moreau P, Béné MC, Vié H, Chevallier P. Anti-SARS-CoV-2 vaccines in recipient and/or donor before allotransplant. *EJHaem*. 2022 Feb 17;3(2):484-487. doi: 10.1002/jha2.398. PMID: 35313664; PMCID: PMC8924852.
- Le Guen C, **Grain A**, Le Calvez B, Saiagh S, Vrignaud F, Eveillard M, Clémenceau B, Zahar MB. Les structures académiques peuvent-elles permettre une amélioration de l'accessibilité aux CAR-T cells ? [Can academic structures improve access to CAR-T cells?]. *Bull Cancer*. 2024 Jan;111(1):62-72. French. doi: 10.1016/j.bulcan.2023.10.005. Epub 2023 Nov 28. PMID: 38030508.

Liste des publications premier ou dernier auteur sur le temps du doctorat :

- Delafoy M, Dalle JH, Pondarre C, Andrieu GP, Fahd M, Yakouben K, Castelle M, Koehl B, Neven B, **Grain A**; Société Francophone de Greffe de Moelle et de Thérapie Cellulaire. Assessing acute toxicity profiles of HLA-identical hematopoietic stem cell transplantation in pediatric patients with sickle cell anemia: A comprehensive analysis on behalf of the SFGM-TC. *Am J Hematol*. 2024 Dec;99(12):2406-2410. doi: 10.1002/ajh.27486. Epub 2024 Sep 24. PMID: 39315757.
- Le Calvez B, Jullien M, Dalle JH, Renard C, Jubert C, Sterin A, Paillard C, Huynh A, Guenounou S, Bruno B, Gandemer V, Buchbinder N, Simon P, Pochon C, Sirvent A, Plantaz D, Kanold J, Béné MC, Rialland F, **Grain A**; Société Francophone de Greffe de Moelle et de Thérapie Cellulaire (SFGM-TC). Childhood myelodysplastic syndromes: Is cytoreductive therapy useful before allogeneic hematopoietic stem cell transplantation? *Hemasphere*. 2024 Jul 8;8(7):e120. doi: 10.1002/hem3.120. PMID: 38978638; PMCID: PMC11229429.
- **Grain A**, Camuset M, Gras-Leguen C, Hardouin JB, Scherdel P, Caldari D. Taste and smell alterations affect nutritional status in children under chemotherapy. *Acta Paediatr*. 2023 Oct;112(10):2231-2238. doi: 10.1111/apa.16889. Epub 2023 Jul 12. PMID: 37376794.
- **Grain A**, Rialland-Battisti F, Chevallier P, Blin N, Dalle JH, Michel G, Dhédin N, Peffault de Latour R, Pochon C, Yakoub-Agha I, Bertrand Y, Sirvent A, Jubert C, Forcade E, Berceanu A, Gandemer V, Schneider P, Bay JO, Rohrlach PS, Brissot E, Paillard C, Plantaz D, Nguyen Quoc S, Gonzales F, Maillard N, Planche L, Baruchel A. Hematopoietic stem cell transplantation for acute lymphoblastic leukemia: why do adolescents and young adults outcomes differ from those of children? A retrospective study on behalf of the Francophone Society of Stem Cell Transplantation and Cellular Therapy (SFGM-TC). *J Cancer Res Clin Oncol*. 2023 Apr;149(4):1473-1483. doi: 10.1007/s00432-022-04021-1. Epub 2022 May 4. PMID: 35507103.
- Le Calvez B, Samarji B, Hubert G, Lagrue E, Eveillard M, Thomas C, **Grain A**. Pediatric post-transplant lymphoproliferative disorder: Do not overlook digestive involvement. *Pediatr Blood Cancer*. 2023 Apr 19:e30353. doi: 10.1002/pbc.30353. Epub ahead of print. PMID: 37073610.

Titre : Recherche de cibles antigéniques d'intérêt dans les leucémies aigües lymphoblastique B de l'enfant

Mots clés : Leucémie aigüe Lymphoblastique B – Thérapie ciblée - ADCC

Résumé : Contexte : Les anticorps monoclonaux ou les cellules CAR-T anti-CD19 autologues ont révolutionné le traitement des leucémies aigües lymphoblastique B (LAL-B) réfractaires ou en rechute. Cependant, au décours de ces thérapies ciblées, près de la moitié des patients rechutent par échappement tumoral *via* une modulation antigénique. Des stratégies de ciblage de plusieurs antigènes simultanément doivent être développées. Il est donc urgent d'identifier et de valider de nouvelles cibles.

Méthodes : Un immunophénotypage large a été réalisé sur 13 échantillons de moelle provenant de patients pédiatriques atteints de LAL-B à l'aide du Biolegend® Human Cell Surface Marker Screening Kit. Des tests de cytotoxicité sur 24h, réalisés avec des LT équipés du CD16 développés au laboratoire, ont été menés afin de déterminer si la reconnaissance des antigènes sélectionnés, par des anticorps monoclonaux murins, pouvait conduire à la lyse des cellules leucémiques par cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps (ADCC),

Résultats : 13 antigènes fortement exprimés ont été sélectionnés. Seuls quelques-uns d'entre eux induisent une lyse par ADCC une fois reconnus par les anticorps murins et les LT-CD16. Pour la majorité des LAL-B testées, la lyse la plus importante a été observée en ciblant CD24 et CD156c. Les tests d'ADCC en multiciblage ont révélé que le double ciblage de CD24-CD123 pouvait induire une ADCC parfois plus efficace. De manière surprenante, le triple ciblage a été associé à une réduction de l'activité ADCC.

Conclusion : Le CD24 est apparu comme une cible d'intérêt dans la LAL-B, et la combinaison du CD24 et du CD123 comme une stratégie de double ciblage potentiellement efficace. La combinaison de différentes modalités de reconnaissance (par exemple, un récepteur d'antigène chimérique et le CD16) devrait être testée pour déterminer si elle fournit une activité cytotoxique synergique en triple ciblage.

Title : Identification of new antigenic targets of interest in pediatric B-cell progenitor acute lymphoblastic leukemia

Keywords : B-Acute lymphoblastic leukemia – Targeted therapy – ADCC

Abstract : Background: Monoclonal antibodies or autologous anti-CD19 CAR-T cells have revolutionized the treatment of relapsed or refractory B-acute lymphoblastic leukemia (BCP-ALL). However, after these mono-antigen targeting immunotherapies, tumor escape through antigenic modulation accounts for almost 40% of relapses. Multi-antigens targeting strategies should be developed and it is therefore urgent to identify and validate new targets.

Methods: Extensive immunophenotyping of 13 marrow samples from pediatric patients with BCP-ALL was performed using the Biolegend® Human Cell Surface Marker Screening Kit. Long-term killing assays were performed, by using human T cells genetically modified to express the murine CD16, previously developed in the laboratory, to assess whether targeting each antigen alone or in combination

with murine monoclonal antibodies could lead to leukemic cell lysis by antibody dependant cellular cytotoxicity (ADCC).

Results: Thirteen highly expressed antigens were selected. Of these, only a few lead to ADCC mediated lysis when targeted. For the majority of BCP-ALL tested, the most significant lysis was observed by targeting CD24 and CD156c. Multi-targeting ADCC assays revealed that double targeting of CD24-CD123 appeared to be even more effective. Surprisingly triple targeting was associated with a reduction in ADCC activity.

Conclusion: CD24 emerged as an effective target in BCP-ALL, and the combination of CD24 and CD123 as a potential effective double-targeting strategy. The combination of different recognition modalities (e.g. a chimeric antigen receptor and CD16) should be tested to determine whether it provides synergistic cytotoxic activity in triple targeting strategies.