



Université de Montréal

**« Therapeutic Inducers of Natural Killer cell Killing » : une nouvelle thérapie cellulaire adoptive sécuritaire dans le contexte de la greffe allogénique de cellules souches hématopoïétiques**

Par  
Nicolas Poirier

Département de Microbiologie et Immunologie  
Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté de Médecine  
en vue de l'obtention du grade de M. Sc.  
en Microbiologie et Immunologie

Décembre, 2020

©, Nicolas Poirier, 2020

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Ce mémoire intitulé :

**« Therapeutic Inducers of Natural Killer cell Killing » : une nouvelle thérapie cellulaire adoptive sécuritaire dans le contexte de la greffe allogénique de cellules souches hématopoïétiques**

Présenté par :  
Nicolas Poirier

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :  
Jean-Sébastien Delisle, président-rapporteur  
Michel Duval, directeur de recherche  
Simon Turcotte, membre du jury

## Résumé

Malgré les progrès en matière de greffe de cellules souches hématopoïétique (GCSH), environ 40% des enfants atteints d'une leucémie aigüe lymphoblastique (LAL) réfractaire à la chimiothérapie ne peuvent être guéris. Notre laboratoire a démontré que l'effet précoce de greffe contre leucémie (GvL) est significativement augmenté par les cellules Natural Killer (NK) stimulées par des cellules plasmacytoïdes dendritiques (pDC). Une nouvelle thérapie cellulaire adoptive basée sur la stimulation des cellules NK par les pDC a été développée et son efficacité a été démontrée dans un modèle de souris humanisées. Des cellules hautement spécialisées appelées « Therapeutic Inducers of Natural Killer cell Killing » (ThINKK), analogues des pDC, sont produites à partir de cellules souches hématopoïétiques de sang de cordon. Afin d'amener les ThINKK vers un usage clinique, ce projet avait comme objectif d'en compléter la caractérisation, d'investiguer leurs effets secondaires potentiels après transfert adoptif dans le contexte de transplantation hématopoïétique allogénique et d'évaluer l'impact d'un régime prophylactique immunosuppresseur sur l'axe ThINKK/cellules NK.

L'identité cellulaire des ThINKK a été déterminée par cytométrie de flux et par analyse unicellulaire du transcriptome (scRNA-seq). Pour déterminer si la présence des ThINKK pourrait augmenter l'activation et la prolifération des cellules T allogéniques, nous avons utilisé des réactions lymphocytaires mixtes (MLR) dans lesquelles les cellules T et les ThINKK ont été cultivées en présence de cellules présentatrices d'antigènes. Un modèle murin de réaction de greffe contre l'hôte (xéno-GvHD) nous a permis de déterminer l'impact du transfert adoptif de ThINKK sur la GvHD *in vivo*. Finalement, nous avons testé l'effet d'immunosuppresseurs sur la cytotoxicité des cellules NK activées par ThINKK contre des cellules LAL.

Nos résultats démontrent que les ThINKK n'expriment pas les marqueurs associés aux cellules présentatrices d'antigènes, mais expriment les marqueurs des cellules plasmacytoïdes dendritiques. L'analyse des résultats de scRNA-seq démontre la présence d'une sous-population cellulaire mineure exprimant le récepteur AXL, sans toutefois exprimer les autres marqueurs conventionnels des cellules présentatrices d'antigènes. Les ThINKK, incluant la sous-population AXL-positives, n'exacerbent pas

l'activation ou la prolifération des cellules T allogéniques *in vitro* ou *in vivo*. Finalement, des cinq immunosuppresseurs testés, seules la cyclosporine A et de la méthylprednisolone diminuaient l'activation et la cytotoxicité des cellules NK induites par les ThINKK.

Nos résultats suggèrent qu'une immunothérapie par transfert adoptif de ThINKK serait sécuritaire chez les patients ayant reçu une greffe allogénique. L'utilisation d'un régime prophylactique immunosuppresseur est également possible sans affecter l'efficacité de cette nouvelle immunothérapie post-transplantation.

**Mots clés :** *Therapeutic Inducers of Natural Killer cell Killing*, Leucémie Aiguë Lymphoblastique, Greffe de cellules souches hématopoïétiques, Immunothérapie du cancer, Immunothérapie par transfert adoptif, cellules *Natural Killer*, Maladie de greffe contre l'hôte, Immunosuppresseurs.

## Abstract

The survival outcomes of children with relapsed acute lymphoblastic leukemia (ALL) remain dismal despite progress in hematopoietic stem cell transplantation. In the past, our team has demonstrated that the stimulation of Natural Killer (NK) cells with a subset of plasmacytoid dendritic cells (pDCs) called Therapeutic Inducers of Natural Killer cell Killing (ThINKK) improved the early graft-versus-leukemia effect and controlled ALL development in humanized mice. ThINKK are expanded from cord blood hematopoietic stem cell progenitors for adoptive post-transplant immunotherapy. To translate these findings into the clinic, the main objectives of this project was to further characterize the ThINKK phenotype, to investigate the potential adverse effects of ThINKK in the context of allogeneic hematopoietic transplantation, and to evaluate the functional impact of the post-transplant prophylactic immunosuppressive regimen on the ThINKK/NK cell axis.

The cellular identity of ThINKK was assessed using flow cytometry and single-cell RNA sequencing. To assess the potential exacerbation of T-cell activation and proliferation by ThINKK, allogeneic T cells and ThINKK were co-cultured with or without antigen-presenting cells in mixed lymphocyte reactions (MLR). We used a xenograft mouse model to evaluate the efficacy and potential side effects of an adoptive transfer of ThINKK on graft-versus-host reactions *in vivo*. Finally, we tested the effect of immunosuppressive drugs on ThINKK-induced NK cell cytotoxicity against ALL cells.

We found that ThINKK cells did not express antigen-presenting cell markers but expressed pDCs lineage markers. Single-cell RNA sequencing analysis revealed the presence of a minor cell subset expressing the AXL receptor gene, but lacking expression of other conventional dendritic cell marker genes. Importantly, ThINKK including the AXL<sup>+</sup> subset did not exacerbate allogeneic T-cell activation and proliferation *in vitro* and *in vivo*. Finally, out of the five immunosuppressive drugs tested, only cyclosporine A and methylprednisolone decreased ThINKK-induced NK cell activation and cytotoxicity.

Our results support that ThINKK cell transfer immunotherapy could be safe in transplanted subjects even in allogeneic settings and that a prophylactic immunosuppressive regimen may be used without affecting the efficacy of this novel post-transplant immunotherapy.

**Key words:** Therapeutic Inducers of Natural Killer cell Killing, Acute Lymphoblastic Leukemia, Hematopoietic Stem Cell Transplant, Cancer immunotherapy, adoptive cell transfer immunotherapy, Natural Killer cell, Graft versus Host Disease, Immunosuppressive drugs.

## Table des matières

Résumé.....	i
Abstract.....	iii
Liste des tableaux.....	vii
Liste des figures.....	viii
Liste des abréviations.....	ix
Remerciements.....	xi
Introduction.....	1
1.1 Leucémie aigüe lymphoblastique.....	1
1.1.1 Définition.....	1
1.1.2 Traitements.....	2
1.2 La greffe de cellules souches hématopoïétiques.....	2
1.2.1 L'effet GvL.....	3
1.2.2 Les cellules Natural Killer.....	3
1.2.3 Les cellules T.....	5
1.2.4 La GvHD.....	6
1.2.5 Prophylaxie de la GvHD.....	6
1.3 Alternatives thérapeutiques pour traiter les rechutes de leucémie.....	7
1.3.1 Thérapie basée sur l'infusion de cellules T génétiquement modifiées.....	7
1.3.2 Thérapie basée sur l'infusion de cellules NK génétiquement modifiées.....	8
1.3.3 Thérapie basée sur l'infusion de cellules NK.....	8
1.3.4 Thérapies basées sur l'injection d'anticorps monoclonaux.....	9
1.3.5 Anticorps bi- & trispécifiques.....	10
1.4 L'axe pDC/NK.....	11
1.4.1 Les cellules dendritiques.....	12
1.4.2 Les cellules plasmacytoïdes dendritiques.....	12
1.4.3 Activation des cellules NK par les pDC.....	13
1.5 Les Therapeutic Inducers of Natural Killers' cell Killing (ThINKK).....	13
1.6 Avantages des ThINKK en opposition aux approches antigènes spécifiques.....	13
1.7 Translation vers un essai clinique de Phase I.....	14
Projet de recherche.....	16
2.1 Hypothèses.....	16
2.2 Objectifs.....	16
Matériels et Méthodes.....	18



Résultats.....	20
Manuscrit .....	21
INTRODUCTION .....	25
MATERIALS AND METHODS.....	28
RESULTS .....	32
DISCUSSION .....	37
FIGURES.....	41
Figure 1. Unbiased clustering of HLA-DR+ CD123+ ThINKK cells expanded from CD34+ cord blood progenitors .....	41
Figure 2. Flow cytometry analysis of ThINKK phenotype.....	42
Figure 3. ThINKK and allogeneic T-cell proliferation .....	43
Figure 4. ThINKK transfer and GvHD .....	44
Figure 5. Effect of immunosuppressive drugs on ThINKK-induced NK cell cytotoxicity against ALL cells .....	45
Supplementary Figure S1. Flow cytometry analysis of the HLA-DR/CD-123 of ThINKK.....	47
Supplementary Figure S2. Unbiased clustering of HLA-DR+ CD123+ ThINKK expanded from CD34+ cord blood progenitors for sample BRC1801409.....	48
Supplementary Figure S3. Flow cytometry analysis of TRAIL expression on ThINKK-activated NK cells in immunosuppressive environments.....	49
Supplementary Figure S4. Immunosuppressive drugs effects on polyclonal T-cell proliferation in vitro .....	50
REFERENCES .....	51
Conclusion .....	55
Références.....	57

## Liste des tableaux

**Tableau 1.** Récepteurs activateurs et inhibiteurs des NK humains et leurs ligands

## Liste des figures

### Introduction

**Figure 1.** Différenciation des cellules souches hématopoïétiques

**Figure 2.** Reconstitution du système immunitaire post-greffe

**Figure 3.** Différenciation des cellules dendritiques

### Article

**Figure 1.** Unbiased clustering of HLA-DR<sup>+</sup> CD123<sup>+</sup> ThINKK cells expanded from CD34<sup>+</sup> cord blood progenitors

**Figure 2.** Flow cytometry analysis of ThINKK phenotype

**Figure 3.** ThINKK and allogeneic T-cell proliferation

**Figure 4.** ThINKK transfer and GvHD

**Figure 5.** Effect of immunosuppressive drugs on ThINKK-induced NK cell cytotoxicity against ALL cells

**Supplementary Figure S1.** Flow cytometry analysis of the HLA-DR/CD-123 of ThINKK

**Supplementary Figure S2.** Unbiased clustering of HLA-DR<sup>+</sup> CD123<sup>+</sup> ThINKK expanded from CD34<sup>+</sup> cord blood progenitors for sample BRC1801409

**Supplementary Figure S3.** Flow cytometry analysis of TRAIL expression on ThINKK-activated NK cells in immunosuppressive environments

**Supplementary Figure S4.** Immunosuppressive drugs effects on polyclonal T-cell proliferation in vitro

## Liste des abréviations

### A

ADCC : Cytotoxicité médiée par les anticorps ; *Antibody-dependent cellular cytotoxicity*

AHR : Récepteur d'aryl d'hydrocarbure ; *Aryl hydrocarbon receptor*

allo-GSCH : Greffe de cellules souches hématopoïétiques allogénique

APC : Cellule présentatrice d'antigène ; *Antigen-presenting cell*

### B

BiKEs : Anticorps bispécifiques engageant les cellules NK

BiTEs : Anticorps bispécifiques engageant les cellules T

### C

CAR : Récepteur à l'antigène chimérique ; *Chimeric antigen receptor*

CDC : Cytotoxicité complément-dépendante ; *Complement dependent cytotoxicity*

CMH : Complexe majeur d'histocompatibilité

CspA : Cyclosporine A

### F

FKBP : Protéine d'attachement FK-506 ; *FK506-binding protein*

### G

GMP : Guanosine-5-monophosphate

GSCH : Greffe de cellules souches hématopoïétiques

GvHD : Maladie de greffe contre l'hôte ; *Graft vs host disease*

GvL : Greffe contre Leucémie ; *Graft vs leukemia*

### H

HLA : Antigène de leucocytes humain ; *Human leukocytes antigen*

### I

IFN : Interféron

IL : Interleukine

IMPDH : Inosine Monophosphate Déshydrogénase

### K

KIR : Récepteurs killer-cell immunoglobulin-like ; *Killer Immunoglobulin-Like Receptors*

## **L**

LAL : Leucémie aigüe lymphoblastique

LMA : Leucémie myéloïde aigüe

## **M**

m-Pred : Methyl-prednisolone

MLR : Réaction de lymphocytaire mixte ; *Mixed lymphocytes reaction*

MPA : Acide mycophénolique ; *Mycophenolic acid*

MRD : Maladie résiduelle minimale ; *Minimal residual disease*

## **N**

NCR : Récepteurs naturels de cytotoxicité ; *Natural cytotoxicity receptor*

NF-ATc : Facteur nucléaire des cellules T activées ; *Nuclear factor of activated T-cells*

NK : Natural Killer

## **P**

pDC : Cellules plasmacytoïdes dendritiques ; *Plasmacytoid dendritic cells*

PBMC : Cellules mononuclées du sang périphérique ; *Peripheral blood mononucleated cell*

## **S**

scRNA-seq : Séquençage des ARN messagers sur cellules uniques ; *Single cell RNA sequencing*

Siro : Sirolimus

SRC : Syndrome de relâche de cytokines

## **T**

Tacro : Tacrolimus

TCR : Récepteurs des lymphocytes T

ThINKK : Therapeutic Inducers of Natural Killer cell Killing

TLR : Récepteur de type Toll-like ; *Toll-like receptor*

TNF : Facteur de necrose tumorale ; *Tumor necrosis factor*

TRAIL : *TNF-related apoptosis-inducing ligand*

TRAIL-R : *TNF-related apoptosis-inducing ligand receptors*

TriKEs : Anticorps trispécifique engageant les cellules NK

## Remerciements

J'aimerais remercier toutes les personnes m'ayant soutenu dans la réalisation de ce mémoire.

J'aimerais tout d'abord remercier mon directeur de recherche D<sup>r</sup> Michel Duval pour m'avoir offert la chance de travailler sur ce projet. Votre constant positivisme a été un atout important tout au long de mon projet.

Également, un remerciement particulier à Sabine. Merci d'avoir été là pour me guider et me faire part de tes connaissances. Tes conseils et ton expertise furent très appréciés durant les deux dernières années.

Paulo, merci d'avoir été toujours là avec une réponse à mes questions, autant théoriques que pratiques. Tu m'as permis de sauver de nombreuses heures de travail en venant à ma rescousse quand le FACS se sentait capricieux.

Mathieu, merci de m'avoir rendu la vie facile en étant toujours disponible pour un prélèvement. Tu m'as permis d'économiser plusieurs heures de logistique. J'ai été chanceux de trouver un collègue avec un horaire aussi tardif que le mien.

Merci à Marina et Émilie pour votre compagnie au laboratoire. J'ai été content de toujours pouvoir compter sur vous.

Finalement, merci à ma famille qui m'a épaulé et soutenu dans mes deux ans de recherche, et à Caroline qui a su à maintes et maintes reprises me redonner le sourire dans les moments les plus difficiles.

## Introduction

### 1.1 Leucémie aigüe lymphoblastique

#### 1.1.1 Définitions

La leucémie est un cancer du sang affectant le développement des cellules issues de l'hématopoïèse (1). Il existe plusieurs types de leucémies différentes classifiées selon leur vitesse de progression (chronique ou aiguë) et le type de cellules affectées (myéloïde ou lymphoblastique). La leucémie aigüe lymphoblastique (2) représente près de 75% de toutes les leucémies pédiatriques, avec la plus forte majorité des cas affectant les enfants de 2 à 5 ans (1). Différents types de LAL sont définis par le type cellulaire dont le développement est affecté, soit les lymphocytes T, B et les cellules Natural Killer (NK). Les leucémies LAL T sont moins fréquentes que les LAL B et représentent 10 à 15% des leucémies (3). Les LAL NK sont encore plus rares et comptent pour moins de 1% de la totalité des leucémies diagnostiquées (4). Les leucémies de type B sont les plus fréquentes à 85%. Une leucémie survient lorsque l'un des progéniteurs de ces trois défenseurs de l'immunité demeure à un stade immature. On désigne ces cellules comme blastes. Dans le cas d'une LAL, les blastes se répliquent rapidement et envahissent la moelle osseuse et les organes lymphoïdes périphériques en quelques semaines en l'absence de traitement.

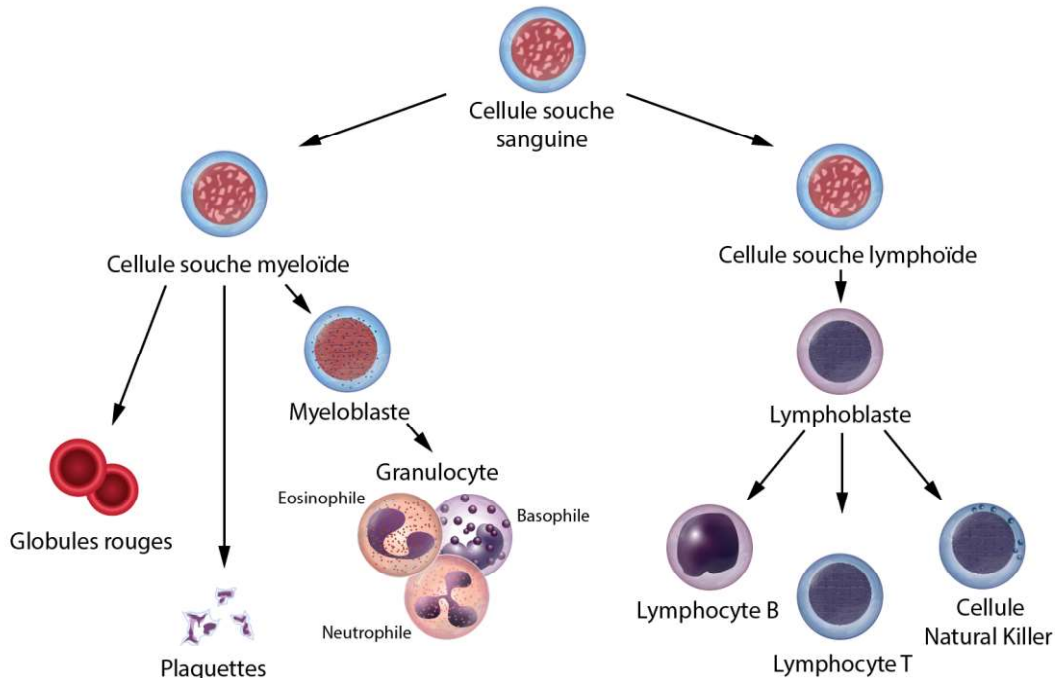


Figure 1. Différenciation des cellules souches hématopoïétiques figure adaptée (5)

La LAL est le cancer le plus commun chez les enfants de moins de 15 ans représentant environ 25% de tous les cancers pédiatriques diagnostiqués (6).

### **1.1.2 Traitements**

La première ligne de traitement des patients souffrant de LAL est la chimiothérapie systémique. Le traitement se divise en 2 phases : l'induction et la consolidation/intensification. L'induction est une phase rapide qui vise la rémission du patient. Son efficacité repose sur l'administration des agents chimiothérapeutiques L-asparaginase et Vincristine qui inhibent la division cellulaire en privant la cellule d'asparagine et en bloquant la polymérisation des microtubules, respectivement. Un stéroïde, par exemple la dexaméthasone, est également administré à titre d'immunosuppresseur. Pour les cas plus sévères, on ajoute un troisième agent chimiothérapeutique, l'anthracycline, un agent intercalant visant à déstabiliser l'ADN des cellules à réplication rapide. Une fois en rémission, habituellement après environ 30 jours d'induction, la phase de consolidation/intensification prend place pour 4 à 8 semaines. La chimiothérapie y gagne en intensité et on administre plusieurs types de chimiothérapies pour éviter l'apparition de résistances et éliminer une quantité maximale de cellules leucémiques résiduelles. Malgré l'amélioration des traitements chimiothérapeutiques, 15 à 20% des patients présentent une rechute de LAL et environ 40% de ces enfants succomberont à la maladie, classant ainsi la LAL comme l'une des premières causes de mortalité par cancer chez l'enfant (5).

## **1.2 La greffe de cellules souches hématopoïétiques**

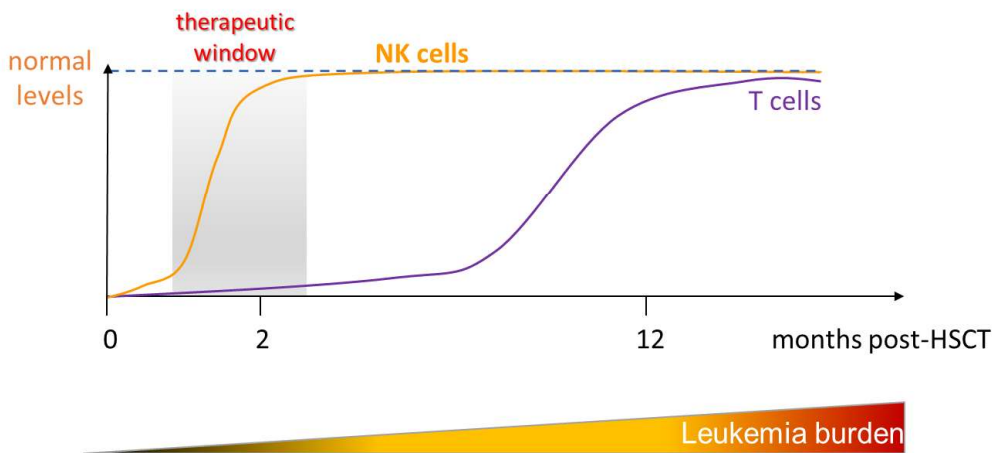
Pour les enfants réfractaires à la chimiothérapie ou après une rechute, la seconde ligne de traitement est la greffe de cellules souches hématopoïétiques (GSCH). Il existe trois types de greffes distinctes déterminées par l'origine des cellules souches : provenant du patient lui-même (greffe autologue), d'un donneur exprimant des Human Leukocytes Antigen (HLA) compatibles avec le greffé (greffe allogénique), ou d'un parent semi-compatible (haplo-identique). La greffe autologue est une approche plus sécuritaire puisque les cellules proviennent directement du greffé. Il n'y a pas de risque de maladie du greffon contre l'hôte (GvHD), l'une des principales complications de la greffe (7). Toutefois, elle comporte plusieurs points faibles, notamment le risque de réintroduire des cellules cancéreuses si celles-ci sont présentes dans le prélèvement des cellules souches (8). De plus, les cellules cancéreuses précédemment capables d'échapper au système immunitaire du patient risquent de ne pas être reconnues par la greffe non plus. C'est pourquoi dans le contexte de LAL, la greffe allogénique a démontré des résultats plus prometteurs (9). Dans la greffe allogénique, les cellules hématopoïétiques multipotentes sont prélevées de la moelle osseuse, du sang périphérique ou encore isolées à partir de sang de cordon ombilical d'un donneur apparenté ou non. Le



principal avantage de cette approche est l'induction d'un fort effet de greffe contre leucémie (GvL). Toutefois, celui-ci vient au coût du risque de la GvHD. La greffe haplo-identique est une autre forme de greffe allogénique. Le terme haplo-identique détermine habituellement un greffon où l'on retrouve 50% ou plus des sous-types de HLA présent chez le patient. Plus la compatibilité est grande, plus la greffe a de chance d'être acceptée par l'hôte. Il a été démontré dans plusieurs contextes de greffe qu'une compatibilité par exemple des sous-unités HLA-A, HLA-B et HLA-DR peut aider à diminuer le rejet de greffe. Ces individus sont généralement des parents ou enfants du patient et constituent habituellement une bonne source de cellules pour la greffe dans le cas où un autre donneur allogénique apparenté n'est pas disponible. Les greffes haplo-identiques sont associées à une plus forte réaction de GvHD (10). Les progrès dans le contrôle de la GvHD rendent néanmoins cette option plus intéressante et sécuritaire.

### 1.2.1 L'effet GvL

L'effet GvL est médié par les effecteurs immunitaires issus de la différenciation des cellules souches du donneur. Les cellules immunitaires reconnaissent les antigènes tumoraux et les antigènes mineurs ou majeurs d'histocompatibilité et éliminent les cellules cancéreuses résiduelles (11). Les systèmes immunitaires inné et adaptatif sont impliqués dans cet effet. Étant donné que la reconstitution du système immunitaire adaptatif (en particulier les lymphocytes T) n'est effective que 9 à 12 mois après la greffe, l'effet GvL précoce, soit dans les premiers mois post-greffe, est médié par les effecteurs du système immunitaire inné, tout particulièrement par les cellules Natural Killer (NK) (12).



**Figure 2. Reconstitution du système immunitaire post-greffe**

### 1.2.2 Les cellules Natural Killer

Les NK sont des cellules immunitaires de la lignée lymphoïde. Elles sont les principaux effecteurs du système immunitaire inné et assurent notre défense contre les virus et les cancers. Ces dernières

caractéristiques ont suscité beaucoup d'intérêt en recherche depuis leur découverte dans les années 70 (13-16). Les cellules NK se développent principalement dans la moelle osseuse et peuvent représenter de 5 à 20% des cellules mononucléées du sang périphérique (PBMC). Durant leur maturation, les cellules NK acquièrent la capacité de reconnaître le « soi ». Cette reconnaissance est médiée par les récepteurs killer-cell immunoglobulin-like (KIR) (17). Ces récepteurs inhibiteurs reconnaissent le CMH de classe I. Au stade mature, on identifie deux populations majeures de cellules NK : les CD56<sup>bright</sup> et les CD56<sup>dim</sup>. La majorité des cellules NK CD56<sup>bright</sup> sont présentes dans les tissus lymphoïdes secondaires, comme les amygdales et les ganglions, et présentent une grande capacité de production de cytokines accompagnée d'une faible cytotoxicité. Les cellules NK CD56<sup>dim</sup> sont localisées dans le foie et dans le sang. À l'inverse des cellules NK CD56<sup>bright</sup>, ces dernières sont cytotoxiques et prolifèrent peu (18).

**Tableau 1. Récepteurs activateurs et inhibiteurs des NK humains et leurs ligands**

Récepteurs		Ligands
Activateurs		
Récepteurs naturels de cytotoxicité (NCR)	NKp30	B7-H6
	NKp44	NKp44L
	NKp46	Héparine sulfate
DNAM-1	Nectin-2 (CD112), PVR (CD155)	
CD16 (FcyRIIA)	Frangment Fc d'anticorps	
NKG2D	MICA/B, ULBPs	
Inhibiteurs		
KIR3DL2	HLA-A3, HLA-A11	
KIR2DL2/3	HLA-C1	
KIR2DL1	HLA-C2	
KIR3DL1	HLA-Bw4	
NKG2A/CD94	HLA-E	
CD96	CD155	
TIGIT	CD155	

L'activité des cellules NK est finement régulée par une combinaison de récepteurs activateurs et inhibiteurs (Tableau 1). Les récepteurs activateurs permettent la reconnaissance des cellules infectées ou transformées. Lorsque couplés à leurs ligands, les récepteurs déclenchent une cascade intracellulaire qui conduira à la relâche des granules cytotoxiques, permettant ainsi aux cellules NK de lyser les cellules cibles.

- Les récepteurs NCRs sont primordiaux pour la reconnaissance des cellules cancéreuses (19, 20). Une surexpression des ligands B7-H6 et NKp44l a été observée sur ces cellules.
- DNAM-1 permet la lyse de certaines cellules cancéreuses ou en stress qui surexpriment les ligands PVR et Nectin-2 (21)

- Tout comme les ligands des NCR, MICA/B et ULBPs sont surexprimés par certaines cellules cancéreuses. La reconnaissance de ces ligands par NKG2D permet la lyse de ces cellules (22)

Pour leur part, les récepteurs inhibiteurs sont responsables de la reconnaissance du « soi ». Les Killer Immunoglobulin-like Receptors (KIR) sont les principaux récepteurs de cette classe. L'expression des différents KIR est variable et propre à chaque individu. Chaque sous-classe de KIR reconnaît une sous-classe de molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH), soit les antigènes de leucocytes humains (HLA). C'est par ce mécanisme de reconnaissance que la fonction cytotoxique des cellules NK est inhibée et empêche la lyse des cellules saines (23).

Lorsque l'inhibition des cellules NK est altérée, par exemple par une expression diminuée du CMH de classe I par les cellules cancéreuses, les cellules NK s'activent. Deux mécanismes distincts induisent la lyse par les cellules NK. Le premier mécanisme implique l'activation des récepteurs de mort cellulaire de la cible, soit TNF-related apoptosis-inducing ligand receptors (TRAIL-R) et Fas (CD95) (2, 24). En réponse à leur interaction avec leurs ligands exprimés à la surface des cellules NK (TRAIL et Fas-Ligand), la machinerie apoptotique de la cellule est activée et la cible est lysée via l'activation des caspases 8 et 10. Toutefois, le mécanisme principal de lyse des cellules NK demeure la relâche de granules cytotoxiques. Les molécules contenues dans ces granules cytotoxiques sont relâchées dans la cellule cible à travers la synapse immunologique (2). Ces granules contiennent des perforine, granzymes B, Fas-ligand, TRAIL et granulysine. Le granzyme joue un rôle crucial dans l'induction de l'apoptose, par des voies dépendante et indépendante des caspases : en clivant la caspase 7 et 3 (voie dépendante) et en induisant le relargage du cytochrome C des mitochondries par le clivage de la protéine BID (voie indépendante).

Dans le contexte de la GSCH allogénique (allo-GSCH), il est possible de tirer profit de la balance des signaux activateurs et inhibiteurs des cellules NK pour augmenter leur cytotoxicité et secondairement l'effet GvL. Il a été démontré qu'en absence d'inhibition par l'intermédiaire des KIR, les cellules NK sont davantage cytotoxiques vis-à-vis des blastes leucémiques (25). Il est ainsi possible de contrôler cette inhibition en sélectionnant un donneur exprimant des KIR pour lesquelles le patient n'exprime pas les HLA correspondants. On détermine cette incompatibilité partielle comme un « KIR-HLA mismatch ». Plusieurs études soutiennent que le KIR-HLA mismatch augmente l'effet GvL de la greffe, notamment pour les leucémies myéloïdes (26-28). Les LAL sont plus résistantes à la lyse par les cellules NK et le KIR-HLA mismatch ne réduit pas significativement le risque de rechute après la greffe (29).

### **1.2.3 Les cellules T**

Les cellules T, ou lymphocytes T, sont des cellules immunitaires de la lignée lymphoïde. Elles jouent un rôle primordial dans l'immunité acquise en reconnaissant les antigènes étrangers présentés sous forme de peptides par le CMH à la surface des cellules nucléées. Ces antigènes sont notamment présents sur les

cellules infectées par un virus, certaines cellules tumorales ou encore chez des cellules étrangères à l'hôte. Lors de leur maturation, les cellules T acquièrent la capacité de reconnaître les cellules du soi par le processus d'éducation thymique (30, 31). C'est cette dernière caractéristique essentielle au fonctionnement adéquat du système immunitaire d'une personne saine qui devient néfaste dans le contexte de la greffe. En effet, la reconnaissance du soi par les cellules T est médiée par la reconnaissance du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) par le récepteur des cellules T (TCR). Chaque individu possède des HLA qui lui sont propres (32). Ainsi, lorsque les cellules T allogéniques font face aux cellules étrangères du receveur, elles s'activent, prolifèrent et peuvent détruire les cellules saines du patient. Cette réaction s'appelle la maladie du greffon contre l'hôte ou GvHD (33). Si cette réaction n'est pas traitée ou prévenue par un traitement prophylactique, elle s'intensifie et peut être létale pour le patient.

#### **1.2.4 La GvHD**

Alors que les cellules souches du greffon permettent la reconstitution du système immunitaire du patient et ainsi l'effet GvL, la greffe peut également introduire des cellules T cytotoxiques matures. Ces cellules sont responsables de l'apparition de la GvHD. Étant matures à leur arrivée dans le système du patient, ces cellules T ne passent pas par l'éducation thymique comme leur contrepartie reconstituée depuis les cellules souches greffées. Ainsi, elles ne reconnaîtront pas les cellules saines de leur nouvel hôte comme faisant partie du soi et s'y attaqueront. On observe cette réaction adverse dans 50% à 70% des greffes allogéniques (34). Sans contrôle, ces cellules T allogéniques induiront des dommages tissulaires ainsi qu'une forte sécrétion de cytokines inflammatoires, éventuellement fatals pour les patients. Il devient ainsi important de contrôler la prolifération des cellules T dans les premiers mois suivant la greffe pour limiter l'apparition de la GvHD. Pour ce faire, tous les patients de greffe allogénique reçoivent une prophylaxie d'immunosuppresseurs qui réduit l'activation des cellules T.

#### **1.2.5 Prophylaxie de la GvHD**

Quatre classes d'immunosuppresseurs sont utilisées en clinique pour prévenir la GvHD : les inhibiteurs de calcineurine (cyclosporine (CspA) et tacrolimus (Tacro)), les inhibiteurs de la voie mTOR (sirolimus (Siro)), les inhibiteurs de synthèse de nucléotides (mycophenolic acid (MPA) et methotrexate (MTX)) et les corticostéroïdes (methyl-prednisolone (m-Pred)) (35). Ces médicaments peuvent être utilisés seuls ou en combinaison pour la prévention de la GvHD et le traitement des symptômes.

- La CspA et le Tacro forment un complexe avec les cyclophilines et les FKBP12, respectivement. Dans un mécanisme très similaire, les complexes CspA/cyclophiline et Tacro/FKBP12 interagissent et inhibent la calcineurine, l'empêchant de déphosphoryler le facteur de transcription NF-AT, bloquant sa translocation vers le noyau et l'induction de la transcription du gène de

l'interleukine (IL)-2. L'inhibition de la production de l'IL-2 a pour conséquence de diminuer les fonctions effectrices des cellules T (cytotoxicité et production de cytokines) (36).

- Le sirolimus, également connu sous le nom de rapamycine, agit en formant un complexe avec l'immunophiline FK506, FKBP12 ou le Tacro ce qui inhibe la voie mTOR et la prolifération cellulaire. En absence d'activité mTOR, S6K1 et 4EBP1 ne sont pas phosphorylés, réduisant la synthèse protéique, diminuant l'expression de cyclin D1 et augmentant celle de p27. Ces altérations se traduisent par un arrêt du cycle cellulaire en phase G1/S (37).
- Le MPA empêche la production *de novo* de purine en interagissant avec IMPDH, une enzyme clé pour la synthèse de guanosine-5-monphosphate (GMP). Alors que la plupart des cellules s'approvisionnent en purine par une combinaison de synthèse *de novo* et de recyclage, les lymphocytes dépendent entièrement de la synthèse *de novo* et leur prolifération se voit donc sélectivement inhibée (38).
- Finalement, les corticostéroïdes comme m-Pred affectent de façon plus générale la synthèse protéique en s'introduisant dans la cellule et en liant à des récepteurs cytoplasmiques spécifiques. On les utilise préférentiellement pour traiter les symptômes de la GvHD car leur effet non spécifique peut diminuer l'effet GvL de la greffe (39).

### **1.3 Alternatives thérapeutiques pour traiter les rechutes de leucémie**

Au cours des 15 dernières années, l'immunothérapie s'est révélée efficace pour traiter les cancers réfractaires à la chimiothérapie (40). De nouvelles approches ont été développées pour traiter les rechutes de LAL chez les enfants, en remplacement ou en complément de l'allo-HSCT.

#### **1.3.1 Thérapie basée sur l'infusion de cellules T génétiquement modifiées**

La thérapie basée l'infusion de cellules T génétiquement modifiées est une thérapie autologue les cellules T du patient sont transduites pour exprimer à leur surface un récepteur d'antigène chimérique (CAR). Celui-ci est composé d'un anticorps extracellulaire à chaîne unique (scFV) relié aux protéines de signalisation et d'activation d'un TCR. Ce récepteur permet d'induire la prolifération et la cytotoxicité des cellules T contre une protéine de surface de la cible, contrairement au TCR qui reconnaît un peptide présenté par une molécule d'HLA (41, 42). Cette thérapie très personnalisée est proposée en remplacement de l'HSCT. Toutefois, la longue phase de production requise pour obtenir les cellules CAR-T, leur commercialisation actuelle et les contraintes qu'elles entraînent en font un produit très coûteux. Au cours de la production des CAR-T, la leucémie peut progresser entraînant le décès du patient avant qu'il ne reçoive son traitement. De plus, une toxicité générale a été observée en raison de la libération importante de cytokines pro-inflammatoires par les cellules T activées. Ce syndrome de relâche de cytokines est d'autant plus sévère

que la charge leucémique du patient est importante et peut causer des dysfonctions organiques sévères, potentiellement létales. Enfin, l'efficacité du traitement est liée à la persistance des cellules CAR-T chez le patient (43). On observe parfois un défaut de persistance lié à l'épuisement des cellules T suractivées au cours de leur expansion *ex-vivo*. En résumé, bien que cette approche soit très prometteuse, la toxicité, le long processus requis pour passer de la collecte à l'infusion, ainsi que le coût associé à ce traitement nuisent à l'application universelle de cette thérapie et créer un besoin pour des traitements efficaces pouvant être appliqués plus rapidement à des coûts moindres.

### **1.3.2 Thérapie basée sur l'infusion de cellules NK génétiquement modifiées**

Les cellules CAR-NK sont des cellules NK génétiquement modifiées pour exprimer un récepteur d'antigène chimérique semblable à ceux développés pour la modification génétique des lymphocytes T. Plus récentes que les cellules CAR-T, les CAR-NK visent à répondre aux problèmes rencontrés au cours des essais cliniques des CAR-T. Plusieurs défis doivent encore être relevés pour mieux maîtriser le potentiel thérapeutique des CAR-NK (44, 45). La sensibilité des cellules NK à la congélation-décongélation affecte leur utilisation pratique. Cependant, des travaux indiquent qu'une stimulation à l'IL-2 post-décongélation pourrait rétablir leur activité (46). Contrairement aux CAR-T, les CAR-NK sont différenciées de cellules de sang de cordon ombilical. Elles offrent ainsi un potentiel de production accrue, pouvant être produite pour plus d'un patient HLA-compatible à la fois. Cet aspect pourrait également permettre une production anticipative des CAR-NK dans le but d'établir une banque de CAR-NK congelées, prêtes à l'utilisation. Les difficultés de transduction des cellules NK posent aussi un défi technique. Des méthodes alternatives ont été proposées pour augmenter l'efficacité d'expression du transgène dans les cellules NK telles que l'électroporation d'ARNm, la transduction à l'aide de lentivirus ou un système de transposon *Sleeping Beauty* (47). Une haute efficacité de transduction a récemment été obtenue avec des lentivirus portant une protéine d'enveloppe modifiée, mais seule une sous-population de cellules NK exprimant les marqueurs CD56<sup>bright</sup>, CD16<sup>dim</sup>, TRAIL<sup>high</sup>, and CX3CR1<sup>neg</sup> sont transfectables et expriment le transgène (48, 49). Par ailleurs, des doses élevées de cytokines sont nécessaires pour la prolifération *ex vivo* des cellules NK. Elles peuvent acquérir un phénotype de cellules épuisées favorisant l'apoptose *in vivo*, à moins d'administrer des cytokines au patient, ce qui peut être toxique.

### **1.3.3 Thérapie basée sur l'infusion de cellules NK**

Les cellules NK sont d'importants médiateurs de l'effet GvL dans les premiers mois suivant la GSCH. Il a été observé qu'une meilleure reconstitution des cellules NK 30 jours post-greffe peut être associée à une plus grande chance de survie (50). Ainsi, plusieurs essais cliniques tentent présentement de démontrer le potentiel d'une thérapie basée sur l'infusion de cellules NK du donneur. Il a été démontré que l'infusion de

cellules NK haplo-identiques alloréactives présentant un KIR-HLA mismatch avec les cellules du patient était bien tolérée dans un contexte d'AML chez l'enfant (51). Lors de leur infusion sans préstimulation à l'IL-2 chez 29 patients souffrant de leucémies réfractaires ALL et AML (17 et 12 patients, respectivement), seulement 9 patients ont survécu (52). Bien que décevant, ces résultats sont comparables aux chances de survie d'une cohorte recevant le même traitement sans infusion de cellules NK, où seulement 2 des 15 patients traités ont survécu (53). Les bénéfices de cette approche semblent limités, mais elle est toutefois très bien tolérée par les patients et ne semble pas induire d'effets secondaires dangereux pour les patients des cohortes observées. Notons que beaucoup de facteurs peuvent influencer la réponse clinique de la thérapie, notamment la préparation des NK (activé ou non *ex-vivo*), la dose et le moment de l'infusion. L'optimisation de ces paramètres pourrait permettre d'améliorer l'efficacité de la thérapie (54, 55).

### **1.3.4 Thérapies basées sur l'injection d'anticorps monoclonaux**

L'administration d'anticorps monoclonaux dirigés contre des antigènes spécifiquement exprimés par les cellules leucémiques permet d'induire des mécanismes de cytotoxicité médiée par les anticorps (ADCC) ou par le complément (CDC), ou l'induction directe de l'apoptose des cellules cibles.

L'expression du récepteur CD20 est associée à de plus grands risques de rechute et ce récepteur est présent sur 30 à 50% des précurseurs lymphoblastiques de type B. L'administration de l'anticorps chimérique anti-CD20 *rituximab* au cours des quatre premiers cycles de chimiothérapie a permis d'allonger la durée de rémission et d'améliorer la survie générale des patients atteints de leucémie pre-B ALL (56). De nouvelles générations d'anticorps anti-CD20 ont par la suite été produites comme l'*ofatumumab* et l'*obinutuzumab*, tous deux capables d'induire de façon plus agressive les mécanismes d'ADCC et de CDC (57).

Le récepteur CD22 a été détecté sur les blastes leucémiques de plus de 90% des patients souffrants de LAL (58). L'efficacité de l'anti-CD22 *epratuzumab* a été étudiée dans le contexte d'un essai de phase I/II chez des patients pédiatriques réfractaires de LAL de type B (59). Le couplage d'*epratuzumab* avec un régime chimiothérapique préétabli n'a pas eu d'impact sur le taux de secondes rémissions induites par le traitement, de 65%. Ce taux est similaire à celui observé en absence du médicament. Les auteurs de l'étude notent toutefois une amélioration non significative de la maladie résiduelle minimale (MRD). Le couplage des anticorps monoclonaux anti-CD22 avec des molécules cytotoxiques est également une voie intéressante puisque le CD22 s'internalise rapidement à la suite de son interaction avec l'anticorps. L'*inotuzumab ozogamicin* couple à un anti-CD22 la calicheamicin, une molécule cytotoxique qui endommage l'ADN et induit l'apoptose (60).

### 1.3.5 Anticorps bi- & trispécifiques

Les anticorps à double et triple spécificités provoquent l'interaction entre les cellules immunitaires effectrices avec leurs cibles. Les anticorps bispécifiques engageant les cellules T (BiTEs) sont composés de deux fragments variables simple brin reconnaissant, d'une part le CD3 des lymphocytes T et de l'autre un antigène tumoral. Cette double réactivité permet de mettre en contact les lymphocytes T et les blastes leucémiques de façon indépendante du CMH, formant une synapse immunitaire lytique. Les cellules cibles sont éliminées par le relargage des granules cytotoxiques contenant la perforine et le granzyme B par les cellules T. Le *blinatumomab* fait partie de cette classe de BiTE. Il cible le récepteur CD19 présent sur 90% des cellules pre-B et de LAL mature et le CD3 des cellules T cytotoxiques (61, 62). Son utilisation en tandem de la chimiothérapie a permis d'augmenter la survie des patients réfractaires de LAL Ph-négative. Des effets secondaires importants ont toutefois été associés à son utilisation tels que le syndrome de relâche de cytokines (SRC).

Les anticorps bispécifiques engageant les cellules NK (BiKEs), comme l'indique leur nom, induisent pour leur part l'interaction des cellules NK avec leur cellule cible. Par exemple, les BiKEs 1633, développés par l'équipe de Wiernik et al. (63), ont permis de surmonter l'inhibition des KIR résultants en une activation des cellules NK et une lyse accrue de blastes AML *in vitro*. Les BiKEs 1633 sont spécifiques au CD16 des cellules NK, ainsi qu'au CD33 des cellules d'AML.

Les anticorps trispécifiques engageant les cellules NK (TriKEs) sont une version améliorée des BiKEs. Les TriKEs possèdent une troisième spécificité leur permettant, en plus d'induire la liaison des cellules NK avec les blastes leucémiques, de stimuler l'expansion des cellules NK. Par exemple, l'interaction avec le récepteur NK de l'IL-15 permet d'augmenter l'activation, l'expansion et la survie des cellules NK. Les TriKEs démontrent une lyse accrue des blastes leucémiques en comparaison au BiKEs (64, 65).

Bien que prometteuse, l'approche par thérapies ciblées possède ses limites. De par leur nature, ces thérapies sont spécifiques à un antigène, et offrent ainsi un potentiel d'évasion immunitaire. On désigne par évasion immunitaire les mécanismes utilisés par les cellules cancéreuses afin d'échapper au système immunitaire de l'hôte. Ces mécanismes se séparent habituellement en deux groupes : les mécanismes d'évasion innés et adaptatifs. Dans le contexte d'une thérapie antigène spécifique, le mécanisme adaptatif de régulation à la baisse de l'antigène permet aux cellules leucémiques de réduire l'expression des récepteurs ciblés par les anticorps de la thérapie (66, 67). De récents travaux ont d'ailleurs démontré une corrélation entre les rechutes suite à une thérapie CAR-T cell ciblant l'antigène CD19 et la présence de clone CD19<sup>neg</sup> de LAL-B chez le patient (68).



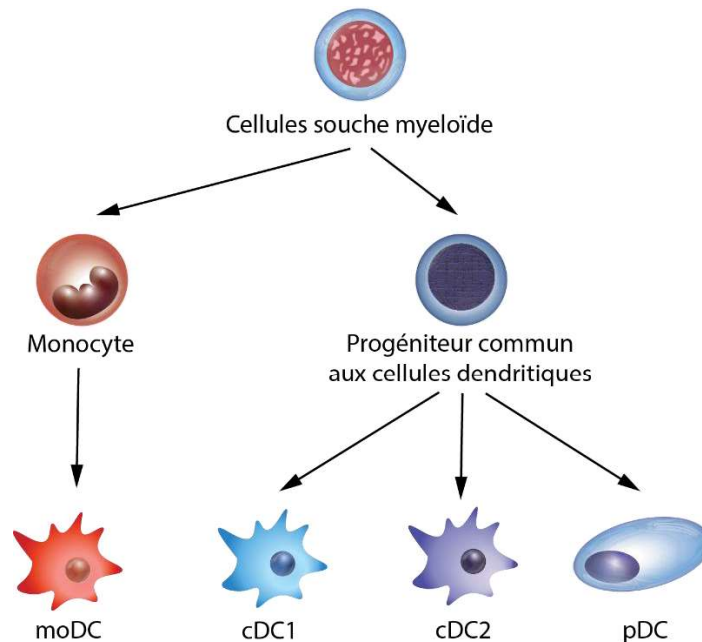
On observe également beaucoup d'effets secondaires lors de l'administration de ces thérapies, notamment la destruction des lymphocytes B normaux observée dans les thérapies anti-CD19, CD20 et CD22, ou encore le SRC comme mentionné ci-haut. C'est pourquoi nous croyons que l'amélioration de l'HSCT constitue une approche intéressante pouvant adresser ces limites. Une immunothérapie basée sur l'activation des cellules NK permettrait de renforcer l'effet GvL de la greffe sans toutefois induire la GvHD.

## **1.4 L'axe pDC/NK**

Lors d'une infection, une cascade complexe d'activation se répand à travers les cellules du système immunitaire pour assurer une réponse adaptée à la nature de l'attaque. Lorsque cette infection est de nature virale, l'immunité innée constitue la première ligne de défense. Plusieurs acteurs sont sollicités pour défendre l'hôte, notamment les cellules plasmacytoïdes dendritiques (pDC) et les cellules NK. La thérapie cellulaire proposée par notre laboratoire se base sur les propriétés de l'axe pDC/NK pour accroître l'effet GvL chez les patients atteints de LAL en rechute ou réfractaires à la chimiothérapie. Il s'agit donc d'une immunothérapie post allo-HSCT.

### **1.4.1 Les cellules dendritiques**

Les cellules dendritiques sont des cellules très spécialisées qui permettent de détecter les pathogènes lors d'une infection (virale, bactérienne ou parasitaire) et d'initier les réponses immunitaires innée et adaptative (69, 70). En réponse à un pathogène, les cellules dendritiques sécrètent de grandes quantités de cytokines et de chimiokines qui permettent le recrutement et l'activation des effecteurs du système immunitaire au site de l'infection. Il en existe plusieurs sous-types distincts de cellules dendritiques, notamment les cellules dendritiques classiques (cDC), les cellules dendritiques monocytaires (moDC) et les cellules plasmacytoïdes dendritiques (pDC). Les cDC et les moDC possèdent la capacité de capturer les antigènes issus de pathogènes étrangers présents dans l'hôte et de les présenter aux effecteurs du système immunitaire adaptative tels que les lymphocytes T. Les cDC englobent deux sous-types différents, soit les cDC1, la forme la plus commune des cDC et sont activatrice de l'immunité de type 1, donc de l'activation de cellules T CD8<sup>+</sup> et des cellules T régulatrices (Treg), et les cDC2, en charge de l'immunité de type deux contre les parasites par la stimulation de cellules T helper de type 2 et 17 (Th2 et Th17). (71, 72). Pour leur part, les moDC sont des cellules dendritiques issues d'un précurseur monocyttaire. Elles sont également en mesure d'activer les cellules T CD8<sup>+</sup> dans un contexte d'infection par présentation d'antigène (73). Les pDC se distinguent des autres types de cellules dendritiques par le fait qu'elles ne sont pas présentatrices d'antigène. De récents travaux utilisant des nouvelles technologies de séquençage des ARN messagers sur cellule unique (scRNA-seq) ont permis de clarifier l'identité et le rôle des pDC et de les définir comme cellules productrices d'interféron de type I, tel qu'elles avaient initialement décrites (74, 75)



**Figure 3. Différenciation des cellules dendritiques** forme adaptée (76)

### 1.4.2 Les cellules plasmacytoïdes dendritiques

Les pDC sont un sous-type de cellules dendritiques que l'on retrouve en très faible quantité dans le sang périphérique (0.01% à 0.1% des PBMC). Ces cellules se caractérisent par l'expression des marqueurs BDCA2, BDCA4, CD123 et HLA-DR. Elles expriment également les récepteurs de type Toll-like (TLR) 7 et 9. Ces derniers s'activent en présence d'ARN viral et d'ADN bactérien. En réponse à cette stimulation, les pDC produisent de très grandes quantités d'interféron (IFN) de type I et de type III, soit de 100 à 1000 fois plus élevées que les quantités produites par les autres types cellulaires. Les pDC produisent également de nombreuses chimiokines (CXCL10, CCL2, CCL3, CCL4, CCL5 & IL-8) et des cytokines pro-inflammatoires (IL-6 & TNF- $\alpha$ ).

Certains travaux ont mis en évidence la capacité des pDC à présenter les antigènes et à activer la prolifération des lymphocytes T (77, 78). Cependant, ces travaux ont été récemment infirmés par les études indépendantes de Villani et al et de See et al. qui ont montré que ces propriétés étaient liées à la présence de précurseurs de cellules dendritiques exprimant les marqueurs de surface des pDC (CD123 et BDCA2). Ces cellules appelées pre-DC ou AS DC ou DC5 sont caractérisées par l'expression du récepteur tyrosine kinase AXL à leur surface (74).

Une hétérogénéité fonctionnelle des pDC a également été décrite en réponse à une stimulation des TLR (79). En effet, l'équipe du Dr. Soumelis a identifié trois sous-populations de pDC qui se distinguent par leur expression des marqueurs PD-L1 et CD80 en réponse à une stimulation du TLR7 ou du TLR9. La

population PD-L1<sup>+</sup>CD80<sup>-</sup> (P1) correspond aux cellules productrices d'IFN de type I, la population PD-L1<sup>-</sup>CD80<sup>+</sup> (P3) est composée de cellules ayant la capacité de présenter les antigènes aux LT et d'induire l'expansion et l'activation des LT, enfin la population PD-L1<sup>+</sup>CD80<sup>+</sup> (P2) est composée de cellules intermédiaires qui sécrètent peu d'IFN et stimulent peu les LT (80).

### **1.4.3 Activation des cellules NK par les pDC**

Les pDC sont les inducteurs naturels de l'activité cytotoxique des cellules NK. En réponse à une stimulation TLR, les pDC produisent des IFN de type I et de type III. Les IFN de type I (IFN- $\alpha$  et l'IFN- $\beta$ ) interagissent avec les récepteurs IFNAR1/2 des cellules NK, activant la voie Jak-Stat. Cette stimulation se traduit par une augmentation de l'expression des protéines de surface TRAIL et CD69. Cette activation permet notamment d'induire la cytotoxicité de NK *in vitro* envers de lignées de cellules leucémiques autrement résistantes (81). Notre équipe a démontré que l'activation des cellules NK permet de contrôler le développement de la LAL dans un modèle *in vivo* de souris humanisées (82, 83). L'augmentation de la capacité de lyse des NK est également transposable dans un contexte de neuroblastome, où l'augmentation de TRAIL et de CD69 sur les NK semble également se traduire par une cytotoxicité accrue vis-à-vis des cellules du neuroblastome (84, 85).

### **1.5 Les Therapeutic Inducers of Natural Killers' cell Killing (ThINKK)**

Dans l'intérêt de mettre sur pied une thérapie cellulaire efficace et accessible, notre laboratoire a développé une méthode de production de pDC hautement spécialisées identifiées comme ThINKK. Les ThINKK sont produites à partir de cellules CD34<sup>+</sup> isolées de sang de cordon. Les cellules CD34<sup>+</sup> sont différenciées pendant deux semaines *in vitro*. Il est possible de congeler les ThINKK pendant leur stade de différenciation sans affecter leur survie ou leur propriété activatrices. La co-culture des ThINKK avec des cellules NK allogéniques induit l'activation des cellules NK et l'augmentation de leurs propriétés cytotoxiques vis-à-vis des cellules leucémiques. Les cellules NK activées par les ThINKK acquièrent un phénotype unique caractérisé par une forte augmentation de TRAIL et CD69 (82). Ce phénotype n'est pas reproduit par l'utilisation de l'IFN- $\alpha$  seul.

### **1.6 Avantages des ThINKK par opposition aux approches antigènes spécifiques**

Tel que discuté dans la section 1.3, plusieurs approches ciblant des antigènes spécifiques sont en développement pour améliorer la survie des patients atteints de leucémie réfractaire à la chimiothérapie ou en rechute. Ces approches, bien que prometteuses, comportent des désavantages importants, tels que le coût, la faisabilité chez certains les patients, mais aussi de nombreux effets toxiques, tels que le relargage

cytokinique, de toxicité neurologique ou la destruction des cellules normales (lymphocytes B) portant l'antigène ciblé. Une majorité des rechutes peuvent être associées aux mécanismes d'évasion immunitaire discutés au paragraphe 1.3.5, soit par régulation à la baisse de l'antigène sur les cellules leucémiques ou par l'émergence de clones négatifs présents au diagnostic.

Notre approche basée sur la stimulation des cellules NK après la GSCH permet d'augmenter l'effet GvL sans viser une cible en particulier. En effet, l'activité cytotoxique des cellules NK passe par différentes voies de lyse de la cible, ce qui limite l'échappement immunitaire. De plus, l'activation des cellules NK ne s'accompagne pas d'un relargage de cytokines et le SCR n'est donc pas un effet secondaire à craindre dans cette approche. Enfin, le transfert adoptif de cellules activatrices des cellules NK nécessite 10 fois moins de cellules puisque le ratio efficace pDC:NK est de 1:10. Ceci réduit les coûts de production du produit thérapeutique cellulaire.

Enfin, contrairement aux CAR-T ou CAR-NK, la production de ThINKK ne nécessite pas de transduction des cellules ni de collecte de cellules du patient ou du donneur. Les ThINKK sont produits par expansion et différenciation des précurseurs hématopoïétiques du sang de cordon et ne nécessitent pas d'être compatibles avec les HLA du donneur ou patient recevant la GSCH. Il s'agit donc d'un produit cellulaire thérapeutique immédiatement disponible quand le patient en a besoin.

## **1.7 Translation vers un essai clinique de phase I**

À travers ses récentes publications (82, 83), notre laboratoire a démontré l'efficacité de l'activation ThINKK en termes d'induction de la cytotoxicité des NK contre la leucémie. Ainsi, un essai clinique de phase I est en préparation pour amener ses résultats aux patients.

Nous optimisons présentement notre méthode de production des ThINKK à partir de cellules CD34<sup>+</sup> isolées de sang de cordon. Nous avons précédemment démontré qu'il était possible d'augmenter drastiquement notre rendement par l'utilisation de StemRegenin 1, un antagoniste du récepteur d'aryl d'hydrocarbure (AHR). Des recherches sont présentement en cours pour mieux tirer profit de l'inhibition d'AHR et ainsi augmenter davantage le rendement de production des ThINKK. Nous souhaitons diminuer la fréquence de la population AXL<sup>+</sup> retrouvée dans nos produits de différenciation par l'inhibition de cette même voie. Nous avons établi un protocole de congélation des ThINKK qui permet de préserver leur nombre, leur viabilité et leurs fonctions activatrices de cellules NK. Ceci nous permet d'envisager une production clinique à grande échelle et d'offrir un produit cellulaire « off-the-shelf », disponible très rapidement pour les patients greffés.

Nous sommes également en collaboration avec l'équipe clinique du CHU Sainte-Justine pour la rédaction d'un protocole clinique détaillant la fréquence d'injection de ThINKK ainsi que la quantité optimale de cellules à injecter pour un effet bénéfique de notre thérapie.

À cet effet, des études de toxicité générale sont présentement en cours. Le travail de recherche présenté à travers ce mémoire vise également à répondre à ce questionnement quant à la sécurité de notre thérapie.

## **Projet de recherche**

Il est primordial d'assurer la sécurité et l'efficacité de notre immunothérapie avant la mise en place d'un essai clinique. Le présent travail vise à répondre à ces exigences.

La translation des résultats précliniques vers une utilisation clinique des ThINKK chez les patients à risque de rechute après une GSCH nécessite une étude approfondie de la toxicité potentielle des ThINKK. De plus, nous devons vérifier l'efficacité des ThINKK dans un environnement immunosuppresseur tel que celui induit par le traitement prophylactique anti-GvHD que reçoivent les patients après une greffe allogénique.

### **2.1 Hypothèses**

Nous faisons l'hypothèse que les ThINKK sont principalement des cellules activatrices des fonctions cytotoxiques des cellules NK et ont peu de propriétés activatrices des cellules T allogéniques. Cette propriété rendra l'utilisation des ThINKK sécuritaire dans un contexte de GSCH allogénique.

De plus, nous faisons l'hypothèse que les médicaments administrés aux patients pour prévenir la GvHD (immunosuppresseurs) ne diminuent pas l'efficacité des ThINKK ou l'activité cytotoxique des cellules NK. Ce résultat permettra d'envisager d'utiliser les ThINKK dans les premiers mois après la greffe, lorsque les patients reçoivent leur traitement prophylactique anti-GvHD.

### **2.2 Objectifs**

Les objectifs de notre travail sont :

- 1) Établir l'identité cellulaire des ThINKK afin de caractériser leur nature et leurs fonctions.
- 2) Vérifier que les ThINKK n'induisent pas l'activation et la prolifération des lymphocytes T allogéniques, *in vitro* et *in vivo*.
- 3) Établir l'effet des médicaments immunosuppresseurs les plus communément utilisés sur l'axe d'activation ThINKK/NK

## **MATÉRIELS ET MÉTHODE**

## **Matériels et Méthodes**

La section Matériels et Méthodes est incluse dans l'article.



## **Résultats**

## **Résultats**

La section Résultats est incluse dans l'article.

**Manuscrit**

**Safety and efficacy of Therapeutic Inducers of Natural Killer cell Killing-based immunotherapy in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation settings**

Nicolas Poirier<sup>1,2</sup>, Valérie Paquin<sup>1,2</sup>, Paulo Cordeiro<sup>1</sup>, Séverine Leclerc<sup>3</sup>, Hicham Affia<sup>3</sup>, Elie Haddad<sup>1,4</sup>, Yves Théorêt<sup>1,5</sup>, Gregor Andelfinger<sup>3,4</sup>, Sabine Herblot<sup>1,4,\*</sup>, and Michel Duval<sup>1,2,4</sup>

Affiliations:

<sup>1</sup> CHU Ste-Justine research center, Charles-Bruneau cancerology and immunology research center, Montreal, Quebec, Canada.

<sup>2</sup> Department of microbiology, infectiology and immunology, University of Montreal, Montreal, Quebec, Canada.

<sup>3</sup> Cardiovascular Genetics, Department of Pediatrics, CHU Ste-Justine research centre, University of Montreal, Montreal, Quebec, Canada.

<sup>4</sup> Department of pediatrics, University of Montreal, Montreal, Quebec, Canada.

<sup>5</sup> Department of pharmacology, University of Montreal, Montreal, Quebec, Canada.

\*Corresponding author: Sabine Herblot, PhD

CHU Sainte-Justine

Centre de cancérologie Charles-Bruneau

3175, côte Sainte-Catherine

Montréal (Québec) H3T 1C5, Canada

Email: [sabine.herblot@umontreal.ca](mailto:sabine.herblot@umontreal.ca)

Phone: 514-345-4931 Ext. 3910

**ABSTRACT**

**Background.** The outcome of children with relapsed acute lymphoblastic leukemia (ALL) remains dismal despite progress in hematopoietic stem cell transplantation. Therapeutic Inducers of Natural Killer cell Killing (ThINKK), derived from plasmacytoid dendritic cells, can improve the early graft-versus-leukemia effect and control ALL development through NK cell stimulation in humanized mice. ThINKK are expanded from cord blood hematopoietic stem cell progenitors for adoptive post-transplant immunotherapy. To translate these findings into the clinic, we investigated the potential adverse effects of ThINKK in the context of allogeneic hematopoietic transplantation and whether post-transplant prophylactic immunosuppressive regimen impaired the effect of ThINKK on NK cells.

**Methods.** The cellular identity of ThINKK was assessed using flow cytometry and single-cell RNA sequencing. T-cell activation and proliferation by ThINKK was investigated by mixed lymphocyte reactions (MLR) in which allogeneic T cells and ThINKK were co-cultured with or without antigen-presenting cells. We used a xenograft mouse model to evaluate the toxicity and side effects of an adoptive transfer of ThINKK on graft-versus-host reactions *in vivo*. We tested the effect of immunosuppressive drugs on the ThINKK-induced NK cell cytotoxicity against ALL cells *in vitro*.

**Results.** ThINKK did not express antigen presenting cell markers but expressed plasmacytoid dendritic cell markers. Single-cell RNA sequencing analysis revealed the presence of a minor subset expressing AXL receptor gene but lacking expression of other conventional dendritic cell markers. Importantly, ThINKK including the AXL<sup>+</sup> subset did not exacerbate allogeneic T-cell activation and proliferation *in vitro* and *in vivo*. Finally, commonly used immunosuppressive drugs did not decrease ThINKK-induced NK cell activation and cytotoxicity, except for cyclosporine A and methyl-prednisolone.

**Conclusion.** Our results support that ThINKK immunotherapy should be safe in stem cell transplanted patients even in the allogeneic setting, and that a prophylactic immunosuppressive regimen may not impair the efficacy of this novel post-transplant immunotherapy.

**Key words:** Therapeutic Inducers of Natural Killer Killing, Acute Lymphoblastic Leukemia, Hematopoietic Stem Cell Transplant, Cancer immunotherapy, Natural Killer cell, Graft versus Host Disease, Immunosuppressive drugs.

## INTRODUCTION

Acute lymphoblastic leukemia (ALL) is the most common cancer in children under the age of 15 (1). Despite the constant improvement and innovation in treatment, about 15-20% of children with ALL relapse after chemotherapy and about 40% of these patients die from their disease, making ALL one of the leading causes of death by cancer in children (2, 3). For these chemotherapy refractory patients, immunotherapy is the only hope of cure and allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) has been considered as the first established immunotherapy (4). Indeed, the graft-versus-leukemia (GvL) effect is the immune cognition and killing of cancer cells by donor-derived immune effectors. Reinforcing the GvL effect is therefore a promising avenue to reduce the risk of relapse and improve the outcome of transplanted patients with high-risk ALL (5).

As the first reconstituted donor-derived immune effectors, Natural killer (NK) cells play a major role in controlling early relapse and infections after HSCT (6) (7-11). NK cells recognize and eliminate cancer cells without prior sensitization in a major histocompatibility complex (MHC) independent manner. NK cell cytotoxic activity is regulated by a balance of both activating and inhibiting signals (12). Activating receptors such as NKP30, NKP46, DNAM1, NKG2D recognize molecules absent at the surface of healthy tissues but expressed by infected and rapidly proliferating cells such as tumor cells (13). On the opposite, inhibiting receptors such as NKG2A and Killer-cell immunoglobulin-like receptor (KIR) recognize self-receptors expressed by normal cells such as HLA molecules (14, 15). The integration of signals provided by this set of receptors acts as a rheostat to control NK cell cytolytic functions (16). When NK cells become activated to kill target cells, multiple cytotoxic pathways are involved including the release of cytotoxic granules, antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC), death receptor induced apoptosis, and cytokine production such as interferon (IFN)- $\gamma$  and tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  (17). Resistance to NK cell mediated killing occurs when activating signals are lacking and/or inhibitory signals predominate (18). In the context of allogeneic HSCT, a mismatch between the donor KIR and the recipient HLA molecules tilted the scale in favor of NK cell activation and reduced the risk of relapse in patients with AML (19, 20). However, other hematopoietic malignancies such as chemoresistant ALL are more resistant to NK cell mediated killing and a KIR-HLA mismatch is not sufficient to improve the outcome of transplanted patients (20-

22). For these patients, current promising strategies are in development including adoptive transfers of expanded NK cells, antibody, cytokine or dendritic cell-induced NK cell stimulation, all of them aiming to improve the GvL effect and to decrease the risk of ALL relapse (23).

Plasmacytoid dendritic cells (pDC) are the sentinel of the innate immunity and the natural activators of NK cells (24). Indeed, pDC sense viral and bacterial pathogens via their Toll-like receptors (TLR) and produce large amount of type I and III interferons (IFN) as well as other cytokines and chemokines in response to stimulation. We demonstrated that following TLR-9 stimulation, pDC induce a unique NK cell phenotype not achievable using IFN- $\alpha$  alone. This phenotype is characterized by a high expression of TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) at the cell surface and an increased cytolytic activity against human ALL and other tumor cells (25-27). Since pDC are rare in blood and their reconstitution is delayed after HSCT, we designed a method to produce TLR activated pDC from CD34+ cord blood progenitors (25)(28). We named these *in vitro* expanded and differentiated pDC Therapeutic Inducers of Natural Killer cell Killing (ThINKK) (29). We further showed that weekly injections of ThINKK cure humanized mice bearing human ALL while 90% of control mice died from leukemia (25). These results support the clinical use of ThINKK in transplanted patients to improve the early GvL effect mediated by donor-derived NK cells.

The major concern of post-transplant immunotherapy is the potential exacerbation of the graft-versus-host disease (GvHD), the main complication of allogeneic HSCT (30). GvHD results from the activation of donor's mature T cells recognizing patient's antigens expressed on normal cells usually HLA molecules and minor histocompatibility antigens. Harnessing NK cell cytolytic activity against cancer cells have not been associated with increased risk of GvHD. On the opposite, in some clinical settings, activated NK cells decrease the incidence or severity of GvHD by eliminating the antigen presenting cells responsible for T cell activation. However, the impact of ThINKK in transplanted patients need to be investigated and in particular the potential of ThINKK to induce or exacerbate allogeneic T cell proliferation and activation.

To prevent acute GvHD, all transplanted patients receive a prophylactic regimen of immunosuppressive drugs targeting T cell proliferation and other immunological pathways (31). Calcineurin inhibitors such as Cyclosporine A and Tacrolimus, mTOR inhibitors such as Rapamycine and the inosine monophosphate dehydrogenase



(IMPDH) blocker Mycophenolic Acid (32) are the most frequently used prophylactic drugs. Corticosteroids such as methyl-prednisolone are mainly used to treat overt GvHD. These drugs have low impact on NK cell activation and function although their influence on the ThINKK/NK cell axis remains to be established.

The safety and efficiency of ThINKK immunotherapy depends on the risk of exacerbating GvHD and the potential down regulation of its activity by the anti-GvHD prophylaxis regimen. Here we show that ThINKK do not exacerbate T cell proliferation *in vitro* and in a mouse model of xeno-GvHD. We further define the prophylaxis regimen that could be used in transplanted patients receiving ThINKK immunotherapy.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Peripheral blood samples**

Peripheral blood samples were obtained from healthy volunteers after written informed consent was obtained in accordance with the Declaration of Helsinki and CHU Sainte Justine Institutional Review Board (IRB) approval. Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated by density gradient centrifugation using Ficoll-Paque Plus (GE Healthcare Bio-Science AB, Uppsala, Sweden). Human PBMC were used for T, NK and CD14<sup>+</sup> cell selections as well as for the induction of xeno-GvHD in NSG mice.

### **ThINKK expansion and differentiation from cord blood CD34<sup>+</sup> cells**

ThINKK were expanded and differentiated from purified cord blood CD34<sup>+</sup> as previously described (29). Briefly, cord blood units were obtained from the CHU Sainte-Justine Research Center cord blood bank with the approval from the IRB. Mononuclear cells were isolated by gradient centrifugation on Ficoll Paque and CD34<sup>+</sup> cells were purified using positive selection magnetic beads according to manufacturer's instructions (Miltenyi Biotec, San Diego, CA). CD34<sup>+</sup> were seeded in culture for two weeks in Stem Span serum free medium (Stem Cell Technologies, Vancouver, BC) containing cytokines (Miltenyi Biotec), and Stem Regenin1 (Sigma Aldrich, St-Louis, MO). ThINKK were then sorted by flow cytometry according to their expression of HLA-DR, CD123 and AXL surface expression. Purity was checked after each sort and was greater than 98%.

### **Single-cell RNA sequencing and data analysis**

ThINKK cells were sorted by flow cytometry according to their expression of HLA-DR and CD123, viability and purity was assessed by flow cytometry and were  $\geq 98\%$  (Supplemental Figure S1). We used the 10X Genomics platform to sequence 10,000-isolated ThINKK from two independent cultures of cord blood progenitors according to manufacturer's instructions. cDNA libraries and RNA sequencing were performed as according to manufacturer's protocol (Chromium Single Cell 3' reagent kit v2). The library was quantified using Agilent Bioanalyser 2100. Next generation sequencing was performed on Illumina

HiSeq 2500 system (Illumina, San Diego, CA) at CHU Ste-Justine research center. Bio-informatics data analysis was performed using the Seurat package (v3) in R (v4.0.3). specify reference genome

### **In vitro moDC differentiation**

CD14<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup> cells were isolated from human PBMC using magnetic beads (EasySep™ Human Monocyte Isolation Kit, StemCell Technologies). Cells were then cultured at a concentration of  $0.5 \times 10^6$  cell/mL for 7 days in RPMI 10% FBS containing 500 UI/mL Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor (GM-CSF), 100 UI/mL Interleukin-4 (IL-4) and streptomycin, penicillin and fungizone (Fisher Scientific, CA, USA). Cultures were refreshed every 2 days and, on day 5, 1 µg/mL LPS was added. Purity and differentiation state were assessed by flow cytometry at day 6 using CD14 and CD1a markers.

### **Proliferation assay**

T cells were negatively selected from human PBMC using magnetic bead selection kit (EasySep™ Human T Cell Enrichment Kit, StemCell Technologies). Purified T cells were labeled using 5 µM of carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE; Life Technologies by Thermo Fisher Scientific, CA, USA). Labeled T cells were co-cultured with in vitro differentiated moDC and/or ThINKK for 6 days. On day 6, T cells were stained for CD4 and CD8. CFSE dye dilution was assessed by flow cytometry using Canto or Fortessa cytometers (BD Biosciences, San Jose, CA). Cytometry data were further analysed using FlowJo software (BD Biosciences).

### **Xeno-GvHD in NSG mice**

NOD-scid IL2Rgamma<sup>null</sup> (NSG) mice were obtained from the Jackson Laboratory. Mice were bred in the CHU Ste-Justine research center animal care facility according to our in-house animal care ethic committee. A moderate GvHD was induced by injecting  $10^6$  human PBMC in 7-9 week-old irradiated (1 Gy) NSG mice as previously described (86). Clinical signs of GvHD were blindly evaluated three times a week using a GvHD assessment scale including scores for weight, posture, activity, fur texture and skin integrity (33). Mice were sacrificed when the clinical endpoints were reached (GvHD score of 7 or higher). Blood from each mouse were sampled weekly. After centrifugation plasma samples were stored at -80°C for further IFN-γ dosage. Blood cells were resuspended in red blood cell lysis buffer (BD Pharm Lyse™, BD

Biosciences) and washed in PBS containing 2 mM EDTA and 0.5% bovine serum albumin. Nucleated cells were stained using conjugated antibodies against mouse CD45, human CD45, and CD3. Dead cells were excluded using 7AAD vital dye. Samples were analyzed by flow cytometry on FACS Canto cytometer and FlowJo software was used for data analysis (BD Biosciences).

### **IFN- $\alpha$ intracellular staining**

ThINKK were cultured for 4 hours in the presence or the absence of a TLR9 agonist, CpG oligonucleotide 2216 (ODN 2216, 10  $\mu$ g/mL, Invivogen). Golgi Stop (BD Biosciences) was then added and cells were further incubated at 37°C, 5% CO<sub>2</sub> for 10 hours. Unstimulated and stimulated cells were harvested, washed once in PBS and fixed/permeabilized using the Cytofix/Cytoperm™ Plus Fixation/Permeabilization Kit from BD Biosciences. Intracellular IFN- $\alpha$  was stained using a FITC-conjugated anti-human IFN- $\alpha$  specific antibody (Miltenyi Biotec). Samples were analyzed by flow cytometry on Canto cytometer and FlowJo software was used for data analysis (BD Biosciences).

### **NK cell cytotoxicity assays**

NK cells were then negatively selected from human PBMC samples using the EasySep™ Human NK Cell Enrichment Kit (Stemcell Technologies). Isolated NK cells were co-cultured with CpG-activated ThINKK at a ratio of 10:1 in RPMI medium supplemented with 10% FBS. Sub-therapeutic, therapeutic and supra-therapeutic concentrations of immunosuppressive drugs were added in the culture medium. We tested cyclosporine A (166.6, 500.0 and 1500.0 ng/mL), tacrolimus (6.6, 20.0 and 60.0 ng/mL), rapamycin (5.0, 15.0 and 45.0 ng/mL) and mycophenolic acid (1000.0, 3000.0 and 9000.0 ng/mL). methyl-prednisolone was also used as a positive control at therapeutic concentration (500 ng/mL). Drug concentrations in culture supernatant were verified by MS/HPLC (Cyclosporine A, Tacrolimus and Rapamycin) or MS/MS (32). NK cells were then incubated for 2 hours with GFP expressing REH cells at 10:1, 5:1 and 1:1 effector to target (E:T) ratios in triplicates. Specific lysis of target cells was calculated by quantification of live GFP<sup>+</sup> cells excluding dead cells using propidium iodide dye. Samples were analyzed by flow cytometry on a Fortessa cytometer (BD Biosciences). FlowJo software was used for data analysis.

**Luminex assay**

NK cell/ThINKK co-culture supernatants were collected and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until use. The concentrations of IFN- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-6, IL-8 and RANTES were assessed using MILLIPLEX<sup>®</sup> Human/Chemokine/Growth Factor Panel A luminex assay from Millipore Sigma Aldrich according to the supplier's instructions.

**Statistics**

Two-way ANOVA tests were used for multiple group comparisons of paired data, and paired t tests were used for single data comparisons. The log-rank test was used to compare survival curves. A value of  $p < 0.05$  (\*) was considered significant with a confidence interval of 99% (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

## RESULTS

### **ThINKK are type I interferon producing cells and do not express cDC markers.**

We aimed to characterize ThINKK at the single cell levels to assess the heterogeneity and the cellular identity of our *in vitro* expanded cell product. We expanded ThINKK from cord blood CD34<sup>+</sup> cells and, then, sorted them by flow cytometry according to their high expression of HLA-DR and CD123 markers (Supplemental Figure S1). We performed single-cell RNA sequencing of 10,000 sorted ThINKK from two independent cord blood units using the 10X Genomics platform. Unbiased clustering revealed 5 clusters with a major homogeneous cluster expressing pDC markers such as BDCA2 (CLEC4C), GZMB and IRF7 (cluster 1) (Figure 1 and Supplemental Figure S2). Cluster 2 exhibited the same transcriptomic profile as cluster 1 with higher expression levels of pDC genes and may be considered as more mature pDC as cluster 1. A minor cluster representing 1-5 % of total cells distinguished by its proliferative status and may be considered as progenitors of clusters 1 and 2. We also identify a cluster expressing AXL tyrosine kinase receptor (cluster 4) but lacking mature conventional DC makers such as CD11c, CD1c and CD141. To further confirm the identity of ThINKK, we calculated the mean expression of reference gene lists described by Villani et al. across the 5 ThINKK clusters (34). This analysis revealed that clusters 1 and 2, representing more than 80% of total ThINKK, were highly homologous to blood DC6 (pDC), while cluster 4 shared low homology with DC5 and other cDC subsets (Figure 1B).

We confirmed the high expression of BDCA2 pDC marker and the low expression or the absence of expression of cDC markers by ThINKK at the protein level using flow cytometry (Figure 2A-D). cCD11c (cDC marker) was expressed by less than 5% of ThINKK while CD141 (cDC1) and CLEC10A (cDC2) were expressed by less than 10% of ThINKK. We observed a variable percentage of ThINKK expressing AXL surface marker (2 and 17%) depending on cord blood sample. Importantly, in response to TLR-9 stimulation, more than 80% of ThINKK secrete IFN- $\alpha$  as assessed by intracellular staining. In addition, surface staining with anti-PDL1 and anti-CD80 antibodies revealed that ThINKK expressed PDL1 but not CD80 following TLR-9 stimulation, corresponding to P1 population as identified by Alculumbre et al. (35)

(Figure 2E-F). PDL1<sup>+</sup> CD80<sup>-</sup> has been shown to be IFN expressing cells as opposed to PDL1<sup>-</sup>CD80<sup>+</sup> (P3) activated pDC that have been identified as antigen presenting cells. About 20% of TLR-stimulated ThINKK exhibited a P2 phenotype (PDL1<sup>+</sup> CD80<sup>+</sup>) corresponding to cells with mixed functional activities.

Collectively, these results indicate that ThINKK are mainly IFN producing cells and do not exhibit antigen presenting cell (APC) features.

### **ThINKK do not induce allogeneic T cell proliferation**

We then aimed to confirm that ThINKK are not APC using functional assays. We performed mixed lymphocytes reaction (MLR) with allogeneic T cells and ThINKK or bona-fide APC, i.e. monocytes-derived dendritic cell (moDC). Peripheral blood T cells were isolated from healthy volunteers, moDC were *in vitro* differentiated from CD14<sup>+</sup> CD16<sup>-</sup> peripheral blood monocytes and ThINKK were differentiated from cord blood CD34<sup>+</sup> cells as described (36)(25). We used a polyclonal CD3/CD28 T-cell stimulation as a positive control in each experiment. As expected, moDC induced the proliferation of  $6.8 \pm 3.1\%$  and  $3.1 \pm 0.88\%$  of CD4 and CD8 allogeneic T cell respectively, corresponding to the proportions of allogeneic T cell clones between two individuals. On the opposite, ThINKK induced the proliferation of  $1.3 \pm 0.3\%$  and  $1.2 \pm 0.47\%$  of allogeneic CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells respectively, demonstrating that ThINKK have low APC capacity (Figure 3A-B). Importantly, when T cells were co-cultured with ThINKK and moDC, the presence of ThINKK did not exacerbated the T cell proliferation induced by moDC ( $4.7 \pm 2.45\%$  versus  $6.8 \pm 3.1\%$  for CD4 T cells and  $3.1 \pm 0.88\%$  versus  $2.5 \pm 0.62\%$  of CD8 T cells) (Figure 3B).

Since we had identified a subset of AXL<sup>+</sup> ThINKK expressing some features of cDC, we further investigated the potential of this population to induce *in vitro* T cell proliferation. We sorted AXL<sup>+</sup> and AXL<sup>-</sup> ThINKK subsets using flow cytometry and co-cultured them with allogeneic T cells in the presence or the absence of moDC. We observed that AXL<sup>-</sup> ThINKK induced the proliferation of  $0.36 \pm 0.33\%$  and  $0.09 \pm 0.09\%$  of allogeneic CD4 and CD8 T cells respectively, while AXL<sup>+</sup> ThINKK induced the proliferation of  $2.3 \pm 0.8\%$  and  $1 \pm 1\%$  of allogeneic CD4 and CD8 T cells respectively. Therefore, the low APC feature of ThINKK previously observed with ThINKK (Figure 3B) seemed to rely on the potential

APC features of AXL<sup>+</sup> ThINKK. Nonetheless, the presence of ThINKK, either AXL<sup>-</sup> or AXL<sup>+</sup>, in moDC / T cell co-cultures did not increase CD4<sup>+</sup> nor CD8<sup>+</sup> T cell proliferation induced by moDC (Figure 3C). On the opposite, we observed a tendency to decreased allogeneic T-cell proliferation in the presence of ThINKK, although was not statistically significant.

Collectively, these results indicated that ThINKK displayed low APC properties and did not promote allogeneic T-cell proliferation induced by *bona fide* APC such as moDC. This suggested that ThINKK transfer after transplant would not exacerbate GvH reactions in allo-HSCT settings.

### **ThINKK injections do not exacerbate *in vivo* xeno-GvHD**

We then used an *in vivo* mouse model of xeno-GvHD that reproduces the clinical settings of allo-HSCT to confirm our *in vitro* data and verify that ThINKK will not worsen the GvH reactions. As described previously, the injection of human PBMC in immune-deficient mice induced a xeno-GvHD characterized by the proliferation of human activated CD3<sup>+</sup> T cells, the increase of blood human IFN- $\gamma$  and clinical signs of GvHD (skin alteration, decreased activity, loss of weight) (37). We injected 10<sup>6</sup> human PBMC in NSG mice followed by 5-weekly injections of 10<sup>5</sup> ThINKK or saline solution in control mice. Of note, ThINKK were not selected based on AXL expression for these *in vivo* experiments. After selection, CD123<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup> ThINKK were *in vitro* stimulated with a TLR-9 ligand for 4 hours and then washed before the injection. Mice were evaluated in a blinded fashion every other day using a GvHD assessment scale and weekly blood analysis (33). Mice were sacrificed when GvHD clinical scores reached 7 out of 10. Xeno-GvHD developed with in the same kinetic in ThINKK treated mice and in controls from day 30 to day 90 with no significant difference in survival curves (Figure 4A). In addition, we did not observe significant difference in blood CD3<sup>+</sup> T cell counts and IFN- $\gamma$  serum concentrations between the two groups (Figure 4B-C).

Collectively, these results corroborated our *in vitro* data and demonstrated that the injection of ThINKK may not exacerbate GvHD in transplanted patients.



**Immunosuppressive regimen does not decrease ThINKK-induced NK cell cytotoxicity against ALL cells, except for Cyclosporin A and methyl-prednisolone**

In allogeneic transplantation settings, all patients received a GvHD prophylactic regimen composed of immunosuppressive drugs that control allogeneic T cell activation and proliferation. We therefore tested the ThINKK/NK cell axis the presence of the most commonly used immunosuppressive drugs. ThINKK were sorted according to their high expression of HLA-DR and CD123 and they were stimulated for 4 hours with a TLR-9 ligand. Activated ThINKK were then co-cultured with peripheral blood NK cells in the presence or the absence of Cyclosporin A, Tacrolimus, Sirolimus, MPA or methyl-prednisolone as a positive control. We tested sub-therapeutic, therapeutic, and supra-therapeutic doses for each drug, corresponding to the residual, efficient, and peak plasmatic concentrations in patients. We confirmed the *in vitro* dosages of each drugs using MS/HPLC or MS/MS dosages in culture supernatants. We also verified that these immunosuppressive drugs inhibited *in vitro* CD3-CD28-induced polyclonal T cell proliferation (Supplementary Figure S3). We first assessed ThINKK viability using flow cytometry and observed that none of the drug tested decreased ThINKK viability, except for methyl-prednisolone (Figure 5A). In addition, CsA, Tacrolimus, Sirolimus and MPA did not affect the production of IFN- $\alpha$ , IL-6 and IL-8, as assessed by multiplex luminex dosages of these cytokines in the supernatants of ThINKK/NK cell co-cultures (Figure 5B). These results indicate that ThINKK will remain viable and functional in an immunosuppressive environment such as in patients after allo-HSCT.

We then assessed the NK cell response to ThINKK stimulation in an immunosuppressive environment. We showed that TRAIL up-regulation in response to ThINKK stimulation was decreased by half on NK cell surface in the presence of CsA and methyl-prednisolone, but and was not affected by the other drugs (Supplementary Figure S4). We performed NK cell cytotoxic assays against REH ALL cell line with NK cells unstimulated or ThINKK stimulated in the presence or the absence of immunosuppressive drugs. We showed that the presence of Tacrolimus, Sirolimus and MPA did not decrease NK cell cytotoxicity against ALL cells, while CsA and corticosteroids significantly decreased ALL lysis by ThINKK-activated NK cells

(Figure 5C). Finally, immunosuppressive drugs did not decrease the production of IFN- $\gamma$  by ThINKK-activated NK cells, except for methyl-prednisolone (Figure 5D).

Collectively, these data indicate that the ThINKK/NK cell axis is functional in an immunosuppressive environment, but the prophylactic anti-GvHD regimen should not include CsA.

## DISCUSSION

Our data showed that ThINKK are mainly IFN-producing cells with low antigen presentation properties. Consequently, ThINKK do not exacerbate allogeneic T-cell proliferation and activation and do not worsen *in vivo* GvHD reactions. We also demonstrated that commonly used immunosuppressive drugs do not decrease ThINKK-induced NK cell cytotoxicity against ALL. Collectively, these results indicate that ThINKK immunotherapy will be safe and effective in transplanted patients, even in allogeneic settings.

Harnessing innate immune responses and in particular NK cell cytolytic activity to fight cancer cells aims to reinforce the early GvL effect of HSCT without worsening GvHD in allogeneic transplanted patients with high-risk leukemia or solid cancers. Although TLR agonist administration has been proposed to stimulate endogenous pDC (38, 39), the efficacy of these approaches could be limited by the late reconstitution of pDC after bone marrow transplantation and side effects associated with systemic TLR stimulation (28, 40)REF. We therefore have developed a unique method of ThINKK expansion and differentiation from cord blood progenitors that allows for the production of sufficient amount of *in vitro* differentiated pDC for adoptive immunotherapy in humans. Before first in human clinical use of ThINKK we need to establish their safety profile and in particular their cellular identity to evaluate the risk of potential side effects in transplanted patients. Indeed, recent reports have established that CD123<sup>+</sup> BDCA2<sup>+</sup> blood pDC are composed of two distinct DC subsets, one with IFN production features triggering innate immune responses, and one with antigen presentation capability that may stimulate adaptive immunity responses and induce or exacerbate GvHD reactions in allo-HSCT settings (34, 41). In addition, Alculumbre et al. recently demonstrated activation-induced pDC diversification and functional specialization even with homogeneous blood pDC (35). Our analysis confirmed that ThINKK express low levels of cDC markers and express type I IFN producing cell phenotype. Moreover, more than 80% of ThINKK produce IFN in response to TLR stimulation and express the P1 (PDL1<sup>+</sup>CD80<sup>-</sup>) phenotype characterizing the IFN producing pDC subtype (35). Our unbiased single cell RNA sequencing analysis further revealed that 80-90% of ThINKK share a strong homology with peripheral blood pDC (DC6) that have been shown to be

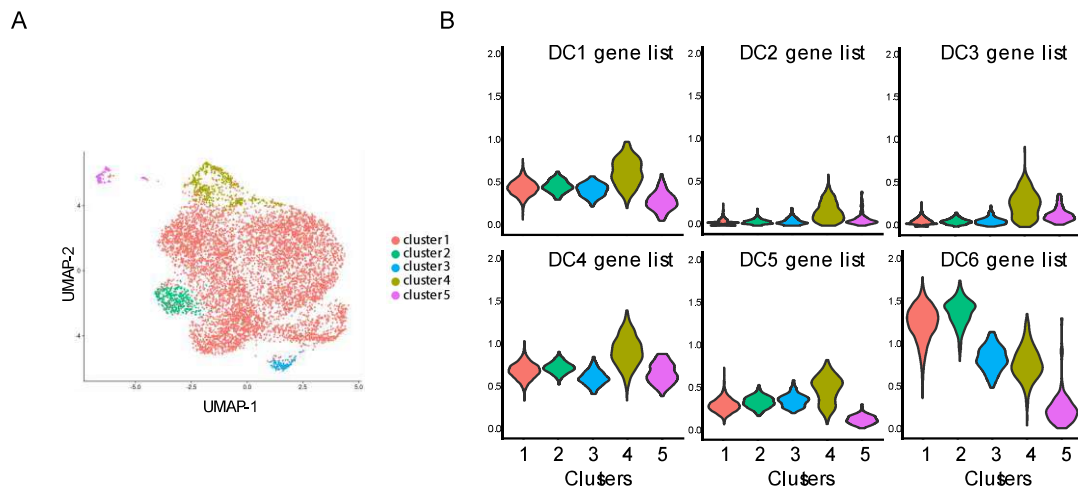
IFN producing cells with low capacity of inducing T cell activation and proliferation (34). Collectively, these results suggest that upon adoptive transfers, ThINKK will stimulate innate immunity and in particular, NK cells via the production of type I IFN and other cytokines, but will not induce adverse allogeneic T cell activation. We although noticed that the majority of ThINKK (cluster 1) expressed the pDC gene signature at a lower level as compared to blood pDC and cluster 2. These results are reminiscent of those published by Laustsen et al. showing that *in vitro* differentiated pDC are immature precursors of peripheral blood pDC (42). The authors have shown that interferon signaling is required for pDC maturation *in vitro*. Nonetheless, our functional *in vitro* and *in vivo* data demonstrated that ThINKK are strong NK cell activators even if they express lower levels of pDC genes and produce lower level of type I IFN as compared with blood pDC (25). We further identified a subset of ThINKK expressing the AXL tyrosine kinase receptor reminiscent of the AS DC population described by Villani et al. (34). AS DC have been described as an intermediate DC subset expressing both pDC and cDC gene signatures. We found that AXL<sup>+</sup> ThINKK express some cDC genes associated with DC5 and other cDC subsets, but not SIGLEC6, CD1c or CD11c suggesting that these cells may not have an exact natural counterpart in blood. Further investigations are on going to better characterize this AXL<sup>+</sup> CD123<sup>+</sup> HLA-DR<sup>+</sup> population. In addition, we were able to reduce the proportion of this subset in the final therapeutic product by recent optimization of the culture conditions. The major potential side effect of post-HSCT immunotherapy is the aggravation of GvHD reactions in which donor-derived T cells recognize allo-antigens presented by recipient's APC, get activated and kill healthy recipient's cells leading to life-threatening lesions (43). Although the gene signature of ThINKK is reminiscent to DC6 (pDC), we functionally investigated the capacity of ThINKK to induce T cell activation and to exacerbate APC-induced allogeneic T cell activation and proliferation. Our results confirmed that ThINKK has low antigen presentation capacity. In addition, ThINKK, including the AXL<sup>+</sup> subset, did not worsen allogeneic T cell proliferation induced by bona-fide APC. On the opposite, we observed a tendency to a reduced proliferation of allogeneic T cells cultured in the presence of moDC when ThINKK were present in the culture. This result is reminiscent of previous reports showing that type I IFN is able to reduce

CD8<sup>+</sup> T cell proliferation (44). In good agreement with our *in vitro* results, adoptive transfers of ThINKK in a mouse model of xeno-GvHD did not increase T cell proliferation nor significantly accelerate GvHD reactions. Although, the absence of NK cell engraftment in our xeno-GvHD model did not allow us to evaluate the effect of NK cell activation on GvHD *in vivo*, we can anticipate that activated NK cells may reduce GvHD in transplanted patients as proposed by previous reports (45). Indeed, numerous studies in humans suggested that higher numbers of NK cells and the presence of NK cell alloreactivity reduce GvHD development (46, 47). Activated NK cells by their own have not been shown to induce GvHD nor cytokine release syndrome as it is the case with adoptive transfers of CAR-T therapy. Consequently, post-transplant NK cell activation with ThINKK represents a promising safe therapeutic strategy to increase the GvL effect without worsening GvHD in transplanted patients with allogeneic graft.

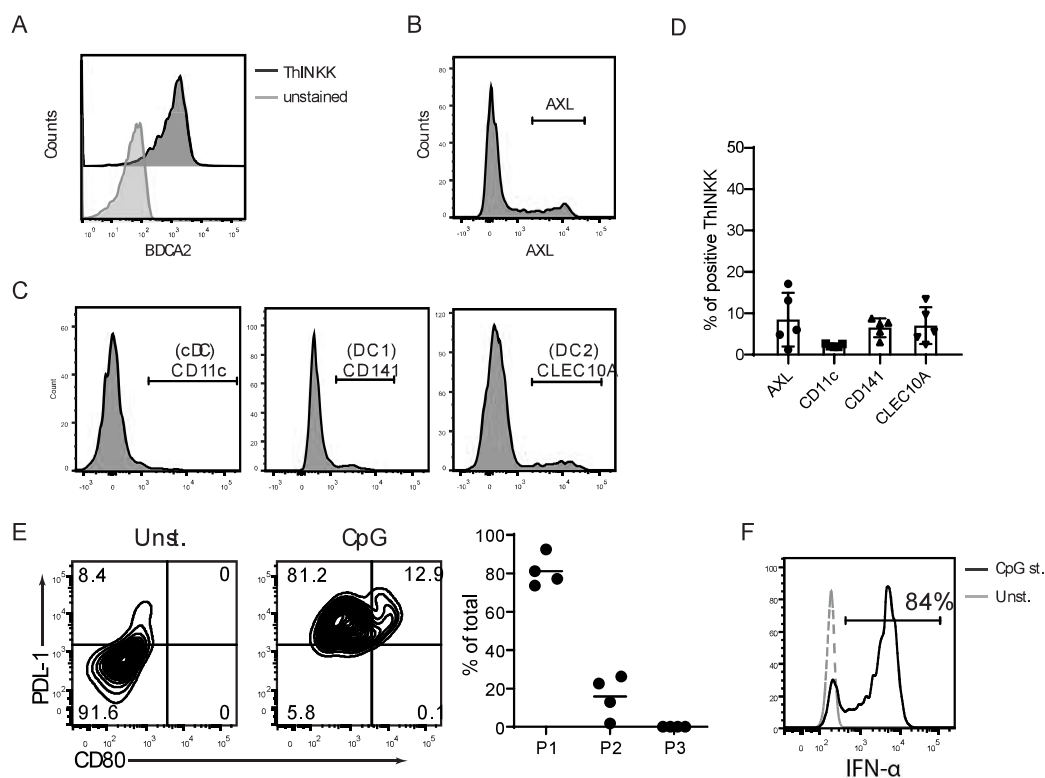
The primary pharmacological strategy to prevent GVHD is the inhibition of T cell activation using immunosuppressive drugs targeting the cytoplasmic enzyme calcineurin (CsA, tacrolimus), the mTOR pathway (sirolimus) or purine synthesis (87). Prophylaxis regimen composed of these drugs alone or in combination is routinely administrated to all transplanted patients with T repleted allogeneic hematopoietic graft while overt GvHD is treated with corticosteroid, such as methyl-prednisolone. The effect of immunosuppressive drugs on NK cell activation remains, although, controversial and may vary upon NK cell stimulation status (48-50). The most potent drugs with an impact on NK cell function are corticosteroids and, as expected, we observed a strong decrease of ThINKK induced NK cell cytotoxicity against ALL as well as a decrease viability of ThINKK in the presence of a therapeutic dose of methyl-prednisolone. Our results although demonstrated that ThINKK-induced NK cell cytotoxicity was not decreased in the presence of therapeutic and supra-therapeutic doses of tacrolimus, sirolimus and MPA, while CsA decreased by half the NK cytotoxic activity against ALL independently of the dose. These results indicate that GvHD prophylaxis regimen excluding CsA will be compatible with ThINKK adoptive immunotherapy.

As a conclusion, our results pave the way toward the clinical application of post-transplant ThINKK immunotherapy even in allogeneic settings. We showed that adoptive transfers of ThINKK would be safe

and efficient in the first weeks after transplant even in the GvHD prophylaxis immunosuppressive environment. ThINKK-induced NK cell activation will improve the GvL effect without inducing adverse GvHD reactions leading to the eradication of residual leukemia cells and giving a new chance of cure to children with high-risk leukemia.

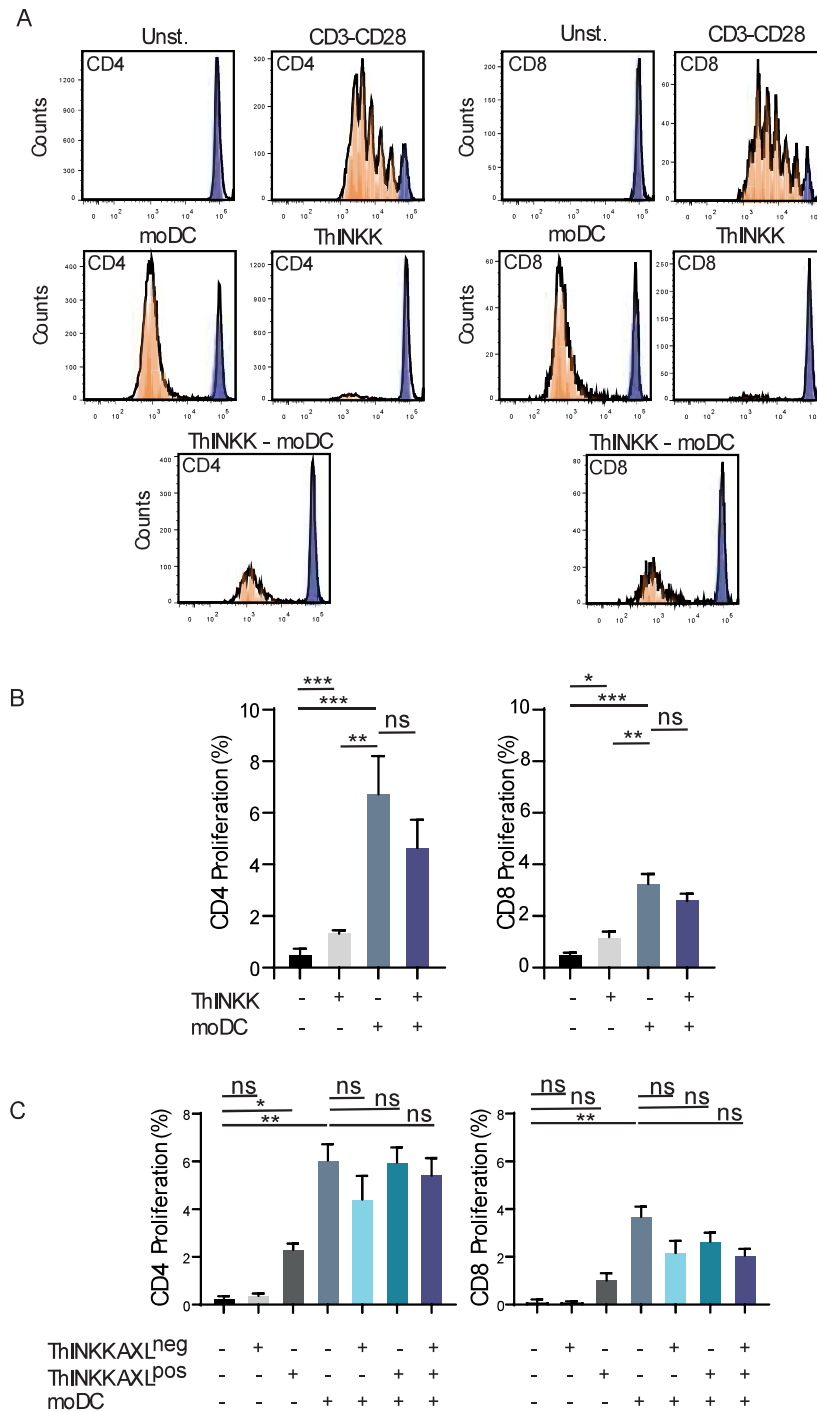


**Figure 1.** Unbiased clustering of HLA-DR<sup>+</sup> CD123<sup>+</sup> ThINKK cells expanded from CD34<sup>+</sup> cord blood progenitors. (A) Five distinct ThINKK clusters were displayed with a UMAP plot. (B) Violin plots represent the mean gene expression of DC1 to DC6 gene lists for each cluster.

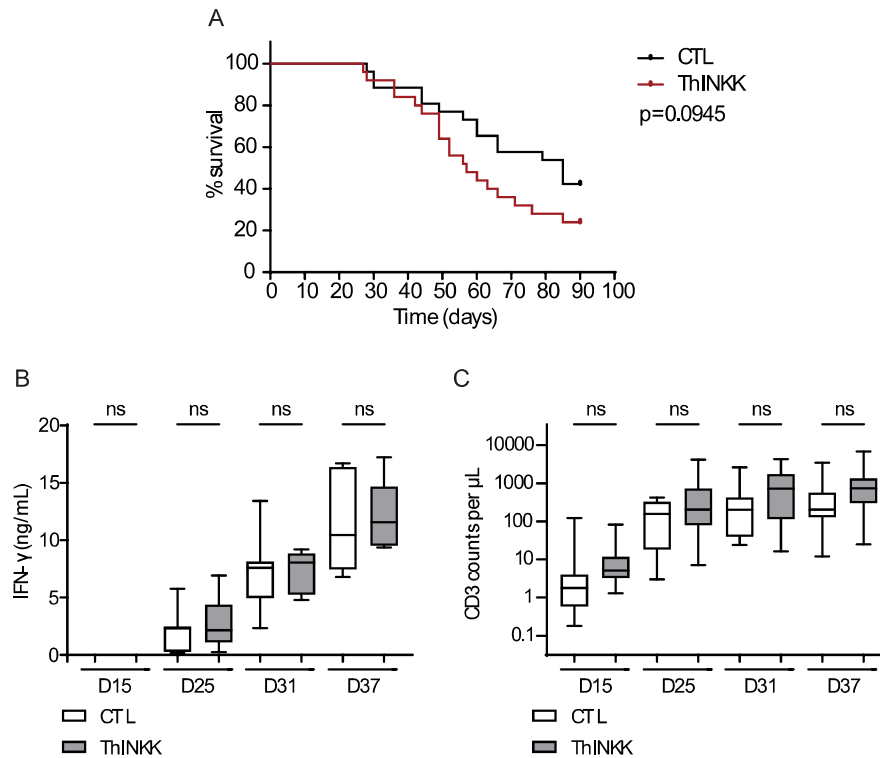


**Figure 2. Flow cytometry analysis of ThINKK phenotype.** The proportions of ThINKK expressing (A) BDCA2 pDC specific marker, (B) AXL tyrosine kinase receptor, and (C) cDC markers (CD11c, CD141, CLEC10A) were determined by flow cytometry. Representative histograms are displayed. (D) The mean  $\pm$  SD of positive ThINKK for indicated markers are presented (n=5 independent experiments). (E) The phenotype of unstimulated (unst.) and CpG-stimulated (CpG st.) ThINKK was assessed using PDL-1 and CD80 markers. Representative contour plots and percentage of P1 (PDL1<sup>+</sup>-CD80<sup>-</sup>), P2 (PDL1<sup>+</sup>-CD80<sup>+</sup>) and P3 (PDL1<sup>-</sup>-CD80<sup>+</sup>) are displayed (n=4 independent experiments). (F) Unstimulated (unst.) and CpG-stimulated (CpG st.) ThINKK were stained for intracellular IFN- $\alpha$ . A representative histogram is presented

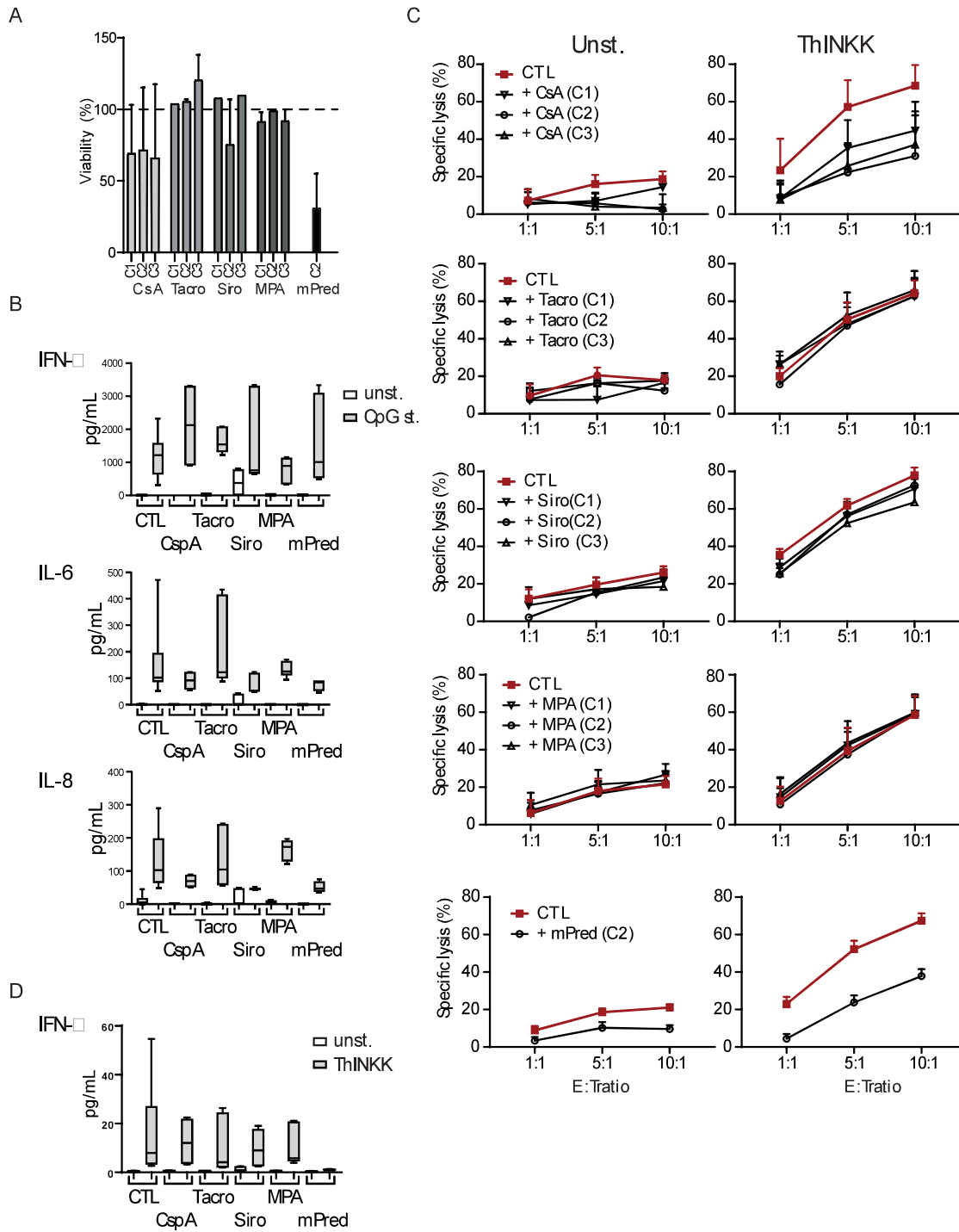




**Figure 3. ThINKK and allogeneic T-cell proliferation.** Mixed lymphocyte reactions were performed with CFSE dilution assays. CFSE stained purified T cells were cultured with monocyte-derived DC (APC) in the presence or the absence of ThINKK, AXL<sup>pos</sup> ThINKK or AXL<sup>neg</sup> ThINKK. (A) Representative histograms of CFSE dilution assays are displayed for CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells with proliferation modeling profiles (FlowJo Software). (B-C) Means of percentage of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T-cell proliferation are showed with SD for the indicated culture conditions (n=3 to 5 independent experiments). Tukey’s multiple comparison test was used to compare matched culture conditions, \* p ≤ 0.05, \*\* p ≤ 0.01, \*\*\* p ≤ 0.0001.

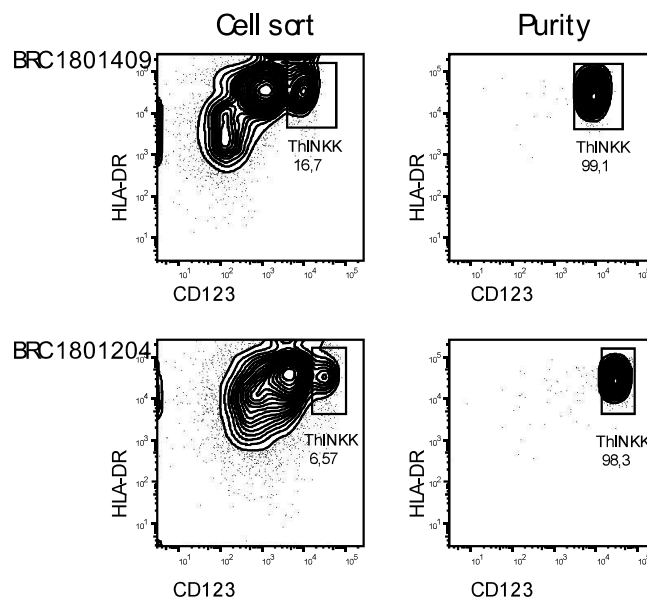


**Figure 4. ThINKK transfer and GvHD.**  $10^6$  human PBMC were injected in NSG 51 mice to induce a moderate xeno-GvHD triggered by functional human T cells. Control mice received weekly injections of saline solution, treated mice received 5 weekly injections of  $10^5$  ThINKK. (A) Kaplan Meier survival curves were established according to GvHD clinical scores assessed three-times a week. Mice were sacrificed when critical endpoints were reached (GvHD score  $\geq 7$ ). Log-rank test was used to compare the two groups ( $p=0.094$ ). (B) Human blood CD3<sup>+</sup> cell counts were monitored by flow cytometry. (C) Serum human IFN- $\gamma$  was measured by ELISA on plasma samples.

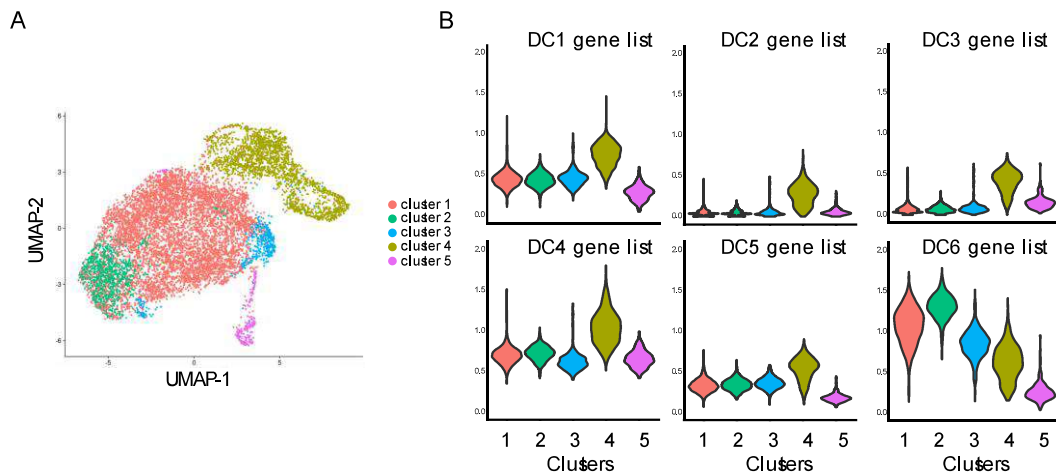


**Figure 5.** Effect of immunosuppressive drugs on ThINKK-induced NK cell cytotoxicity against ALL cells. ThINKK were cultured in the presence methyl-prednisolone (mPred), cyclosporine A (CsA), tacrolimus (Tacro), sirolimus (Siro) or mycophenolic acid (87) at three indicated concentrations corresponding to residual, therapeutic and peak plasmatic concentrations in patients. (A) After overnight incubation, live ThINKK cells were numerated by flow cytometry using 7ADD vital dye. Percentages of viable cells were calculated as compared with ThINKK + vehicle. Averages of 3 experiments are presented with SD. (B) ThINKK-secreted cytokines (IFN- $\alpha$ , IL-6 and IL-8) were measured by multiplex Luminex in ThINKK-NK

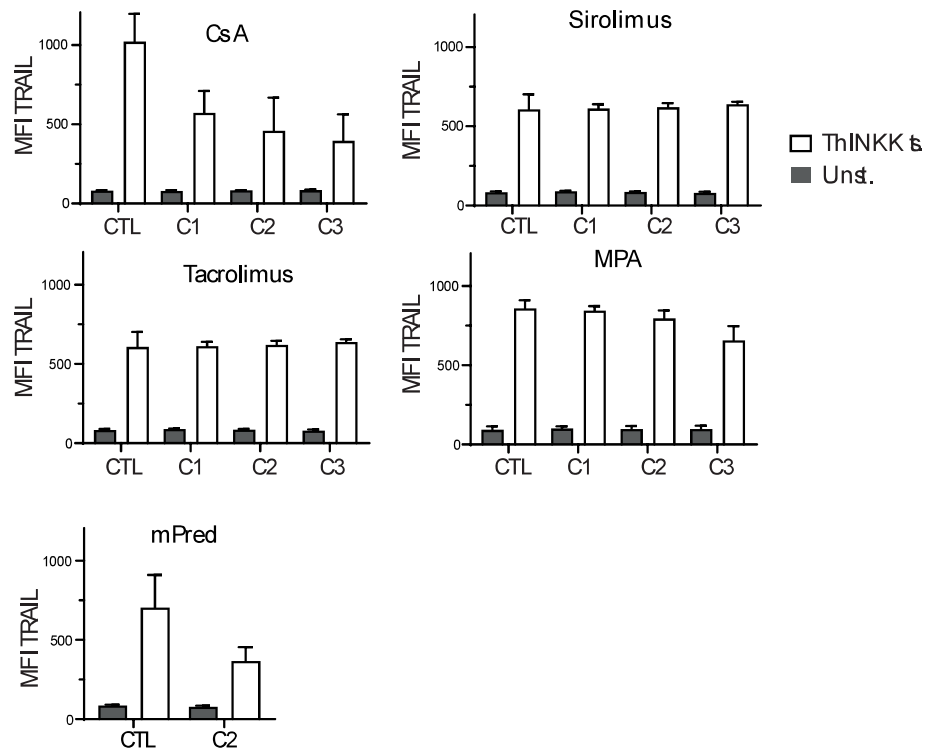
cell co-culture supernatants following overnight stimulation with CpG oligonucleotide (CpG st.) and in controls (unst.). (C) NK cell cytotoxic assays were performed against REH ALL cells and we used flow cytometry to measure specific lysis. Isolated blood NK cells were co-cultured in the presence (right column, ThINKK) or in the absence of ThINKK (left column, Unst.). mPred, CsA, Tacro, Siro or MPA were added in NK-ThINKK co-cultures at three indicated concentrations. The graphs represent the average specific lysis for 3 independent experiments with SD for CsA, Tacro, Siro and MPA and 13 experiments for mPred used as positive control in each experiment. (D) IFN- $\gamma$  was measured by multiplex Luminex in NK cell culture supernatants following overnight culture in the absence (unst.) or in the presence of ThINKK and CpG oligonucleotide.



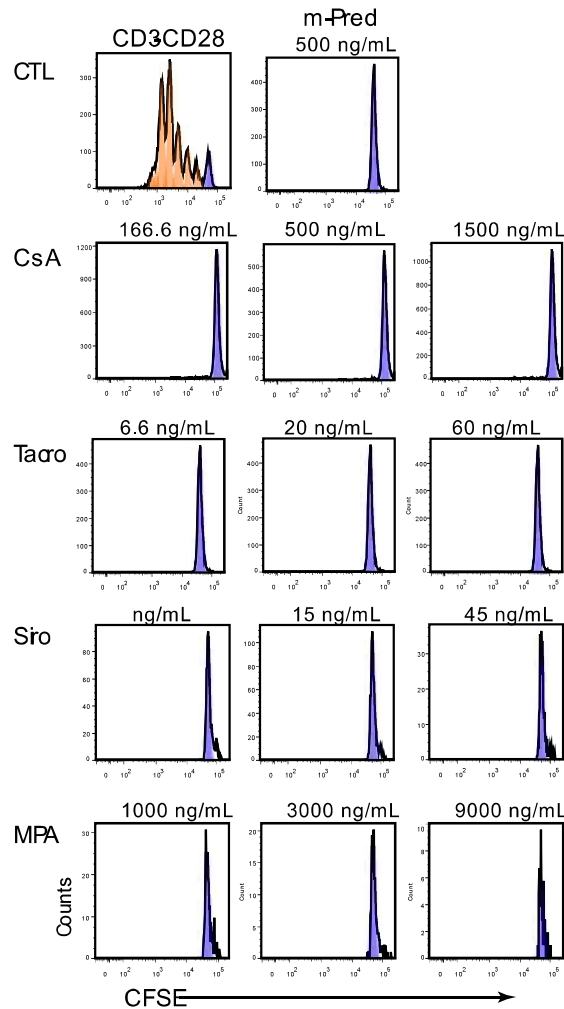
**Supplementary Figure S1.** Flow cytometry analysis of the HLA-DR/CD-123 of ThINKK. CD123<sup>hi</sup> HLA-DR<sup>+</sup> cells following two weeks of culture of cord blood progenitors. We used flow cytometry cell sorting to isolate ThINKK from two independent cord blood units (identified as BRC1801204 and BRC1801409). Left panels present cell sorting gating strategy. Purity was assessed by flow cytometry (right panels)



**Supplementary Figure S2. Unbiased clustering of HLA-DR+ CD123+ ThINKK expanded from CD34+ cord blood progenitors for sample BRC1801409.** (A) Five distinct ThINKK clusters were displayed with a UMAP plot. (B) Violin plots represent the mean gene expression of DC1 to DC6 gene lists for each cluster.



**Supplementary Figure S3.** Flow cytometry analysis of TRAIL expression on ThINKK-activated NK cells in immunosuppressive environments. Peripheral blood NK cells were either unstimulated (Unst.) or cultured with ThINKK in the presence of 3 concentrations (C1, C2 and C3) of indicated immunosuppressive drugs. The surface expression of TRAIL was assessed by flow cytometry after overnight stimulation. Means of median fluorescence intensity for three independent experiments are displayed with SD.



**Supplementary Figure S4. Immunosuppressive drugs effects on polyclonal T-cell proliferation *in vitro*.** We used CFSE dilution assays to test whether CD3/CD28 polyclonal T-cell proliferation could be inhibited by CsA, tacrolimus, sirolimus, MPA and m-pred at three concentrations (sub-therapeutic, therapeutic and supra-therapeutic). Representative histograms are displayed for each indicated drugs and concentrations.



## 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. *Journal of Clinical Oncology*. 2012;30(14):1663-9.
2. Hunger SP, Mullighan CG. Acute Lymphoblastic Leukemia in Children. *New England Journal of Medicine*. 2015;373(16):1541-52.
3. Malard F, Mohty M. Acute lymphoblastic leukaemia. *The Lancet*. 2020;395(10230):1146-62.
4. Mathan TSMM, Figdor CG, Buschow SI. Human Plasmacytoid Dendritic Cells: From Molecules to Intercellular Communication Network. *Frontiers in Immunology*. 2013;4.
5. Cichocki F, Verneris MR, Cooley S, Bachanova V, Brunstein CG, Blazar BR, et al. The Past, Present, and Future of NK Cells in Hematopoietic Cell Transplantation and Adoptive Transfer. Springer International Publishing; 2015. p. 225-43.
6. Ogonek J, Kralj Juric M, Ghimire S, Varanasi PR, Holler E, Greinix H, et al. Immune Reconstitution after Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Frontiers in Immunology*. 2016;7.
7. Locatelli F, Pende D, Falco M, Della Chiesa M, Moretta A, Moretta L. NK Cells Mediate a Crucial Graft-versus-Leukemia Effect in Haploidentical-HSCT to Cure High-Risk Acute Leukemia. *Trends Immunol*. 2018;39(7):577-90.
8. Beziat V, Nguyen S, Lapusan S, Hervier B, Dhedin N, Bories D, et al. Fully functional NK cells after unrelated cord blood transplantation. 2009;23(4):721-8.
9. Foley B, Cooley S, Verneris MR, Curtsinger J, Luo X, Waller EK, et al. NK cell education after allogeneic transplantation: dissociation between recovery of cytokine-producing and cytotoxic functions. *Blood*. 2011;118(10):2784-92.
10. Szabolcs P, Niedzwiecki D. Immune Reconstitution in Children after Unrelated Cord Blood Transplantation. 2008;14(1):66-72.
11. Charrier E, Cordeiro P, Brito RM, Mezziani S, Herblot S, Le Deist F, et al. Reconstitution of maturing and regulatory lymphocyte subsets after cord blood and BMT in children. *Bone Marrow Transplantation*. 2013;48(3):376-82.
12. Zwirner NW, Domaica CI. Cytokine regulation of natural killer cell effector functions. *Biofactors*. 2010;36(4):274-88.
13. Raulet DH, Guerra N. Oncogenic stress sensed by the immune system: role of natural killer cell receptors. *Nat Rev Immunol*. 2009;9(8):568-80.
14. Chiossone L, Dumas PY, Vienne M, Vivier E. Author Correction: Natural killer cells and other innate lymphoid cells in cancer. *Nat Rev Immunol*. 2018;18(11):726.
15. Lanier LL. NKG2D Receptor and Its Ligands in Host Defense. *Cancer Immunol Res*. 2015;3(6):575-82.
16. Joncker NT, Fernandez NC, Treiner E, Vivier E, Raulet DH. NK cell responsiveness is tuned commensurate with the number of inhibitory receptors for self-MHC class I: the rheostat model. *J Immunol*. 2009;182(8):4572-80.
17. Fauriat C, Long EO, Ljunggren HG, Bryceson YT. Regulation of human NK-cell cytokine and chemokine production by target cell recognition. *Blood*. 2010;115(11):2167-76.
18. Sordo-Bahamonde C, Vitale M, Lorenzo-Herrero S, López-Soto A, Gonzalez S. Mechanisms of Resistance to NK Cell Immunotherapy. *Cancers*. 2020;12(4):893.
19. Velardi A, Ruggeri L, Alessandro, Moretta, Moretta L. NK cells: a lesson from mismatched hematopoietic transplantation. *Trends Immunol*. 2002;23(9):438-44.

20. Ruggeri L, Capanni M, Urbani E, Perruccio K, Shlomchik WD, Tosti A, et al. Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants. *Science*. 2002;295(5562):2097-100.
21. Cooley S, Weisdorf DJ, Guethlein LA, Klein JP, Wang T, Le CT, et al. Donor selection for natural killer cell receptor genes leads to superior survival after unrelated transplantation for acute myelogenous leukemia. *Blood*. 2010;116(14):2411-9.
22. Handgretinger R, Lang P, Andre MC. Exploitation of natural killer cells for the treatment of acute leukemia. *Blood*. 2016;127(26):3341-9.
23. Myers JA, Miller JS. Exploring the NK cell platform for cancer immunotherapy. *Nat Rev Clin Oncol*. 2020.
24. Reizis B. Plasmacytoid Dendritic Cells: Development, Regulation, and Function. *Immunity*. 2019;50(1):37-50.
25. Díaz-Rodríguez Y, Cordeiro P, Belounis A, Herblot S, Duval M. In vitro differentiated plasmacytoid dendritic cells as a tool to induce anti-leukemia activity of natural killer cells. *Cancer Immunology, Immunotherapy*. 2017;66(10):1307-20.
26. Belounis A, Ayoub M, Cordeiro P, Lemieux W, Teira P, Haddad E, et al. Patients' NK cell stimulation with activated plasmacytoid dendritic cells increases dinutuximab-induced neuroblastoma killing. *Cancer Immunol Immunother*. 2020;69(9):1767-79.
27. Cordeau M, Belounis A, Lelaidier M, Cordeiro P, Sartelet H, Herblot S, et al. Efficient Killing of High Risk Neuroblastoma Using Natural Killer Cells Activated by Plasmacytoid Dendritic Cells. *PLoS One*. 2016;11(10):e0164401.
28. Charrier E, Cordeiro P, Brito RM, Harnois M, Mezziani S, Herblot S, et al. Impaired interferon-alpha production by plasmacytoid dendritic cells after cord blood transplantation in children: implication for post-transplantation toll-like receptor ligand-based immunotherapy. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2014;20(10):1501-7.
29. Lelaidier M, Diaz-Rodriguez Y, Cordeau M, Cordeiro P, Haddad E, Herblot S, et al. TRAIL-mediated killing of acute lymphoblastic leukemia by plasmacytoid dendritic cell-activated natural killer cells. *Oncotarget*. 2015;6(30):29440-55.
30. Socie G, Blazar BR. Acute graft-versus-host disease: from the bench to the bedside. *Blood*. 2009;114(20):4327-36.
31. Cangemi M, Montico B, Faè DA, Steffan A, Dolcetti R. Dissecting the Multiplicity of Immune Effects of Immunosuppressive Drugs to Better Predict the Risk of de novo Malignancies in Solid Organ Transplant Patients. *Frontiers in Oncology*. 2019;9.
32. Leung W, Campana D, Yang J, Pei D, Coustan-Smith E, Gan K, et al. High success rate of hematopoietic cell transplantation regardless of donor source in children with very high-risk leukemia. *Blood*. 2011;118(2):223-30.
33. Cooke K, Kobzik L, Martin T, Brewer J, Delmonte J, Jr., Crawford J, et al. An experimental model of idiopathic pneumonia syndrome after bone marrow transplantation: I. The roles of minor H antigens and endotoxin. *Blood*. 1996;88(8):3230-9.
34. Villani A-C, Satija R, Reynolds G, Sarkizova S, Shekhar K, Fletcher J, et al. Single-cell RNA-seq reveals new types of human blood dendritic cells, monocytes, and progenitors. *Science*. 2017;356(6335):eaah4573.
35. Alculumbre SG, Saint-Andre V, Di Domizio J, Vargas P, Sirven P, Bost P, et al. Diversification of human plasmacytoid predendritic cells in response to a single stimulus. *Nat Immunol*. 2018;19(1):63-75.
36. Thurner B, Roder C, Dieckmann D, Heuer M, Kruse M, Glaser A, et al. Generation of large numbers of fully mature and stable dendritic cells from leukapheresis products for clinical application. *J Immunol Methods*. 1999;223(1):1-15.

37. Gregoire-Gauthier J, Durrieu L, Duval A, Fontaine F, Dieng MM, Bourgey M, et al. Use of immunoglobulins in the prevention of GvHD in a xenogeneic NOD/SCID/gammac- mouse model. *Bone Marrow Transplant.* 2012;47(3):439-50.
38. Reid GS, She K, Terrett L, Food MR, Trudeau JD, Schultz KR. CpG stimulation of precursor B-lineage acute lymphoblastic leukemia induces a distinct change in costimulatory molecule expression and shifts allogeneic T cells toward a Th1 response. *Blood.* 2005;105(9):3641-7.
39. Ronsley R, Kariminia A, Ng B, Mostafavi S, Reid G, Subrt P, et al. The TLR9 agonist (GNKG168) induces a unique immune activation pattern in vivo in children with minimal residual disease positive acute leukemia: Results of the TACL T2009-008 phase I study. *Pediatr Hematol Oncol.* 2019;36(8):468-81.
40. Horvath R, Budinsky V, Kayserova J, Kalina T, Formankova R, Stary J, et al. Kinetics of dendritic cells reconstitution and costimulatory molecules expression after myeloablative allogeneic haematopoietic stem cell transplantation: implications for the development of acute graft-versus host disease. *Clin Immunol.* 2009;131(1):60-9.
41. See P, Dutertre CA, Chen J, Gunther P, McGovern N, Irac SE, et al. Mapping the human DC lineage through the integration of high-dimensional techniques. *Science.* 2017;356(6342).
42. Laustsen A, Bak RO, Krapp C, Kjaer L, Egedahl JH, Petersen CC, et al. Interferon priming is essential for human CD34+ cell-derived plasmacytoid dendritic cell maturation and function. *Nat Commun.* 2018;9(1):3525.
43. Chakraverty R, Sykes M. The role of antigen-presenting cells in triggering graft-versus-host disease and graft-versus-leukemia. *Blood.* 2007;110(1):9-17.
44. Skold AE, Mathan TSM, van Beek JJP, Florez-Grau G, van den Beukel MD, Sittig SP, et al. Naturally produced type I IFNs enhance human myeloid dendritic cell maturation and IL-12p70 production and mediate elevated effector functions in innate and adaptive immune cells. *Cancer Immunol Immunother.* 2018;67(9):1425-36.
45. Simonetta F, Alvarez M, Negrin RS. Natural Killer Cells in Graft-versus-Host-Disease after Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation. *Front Immunol.* 2017;8:465.
46. Ludajic K, Balavarca Y, Bickeboller H, Rosenmayr A, Fae I, Fischer GF, et al. KIR genes and KIR ligands affect occurrence of acute GVHD after unrelated, 12/12 HLA matched, hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 2009;44(2):97-103.
47. Sivori S, Carlomagno S, Falco M, Romeo E, Moretta L, Moretta A. Natural killer cells expressing the KIR2DS1-activating receptor efficiently kill T-cell blasts and dendritic cells: implications in haploidentical HSCT. *Blood.* 2011;117(16):4284-92.
48. Pradier A, Papaserafeim M, Li N, Rietveld A, Kaestel C, Gruaz L, et al. Small-Molecule Immunosuppressive Drugs and Therapeutic Immunoglobulins Differentially Inhibit NK Cell Effector Functions in vitro. *Front Immunol.* 2019;10:556.
49. Vitale C, Chiossone L, Cantoni C, Morreale G, Cottalasso F, Moretti S, et al. The corticosteroid-induced inhibitory effect on NK cell function reflects down-regulation and/or dysfunction of triggering receptors involved in natural cytotoxicity. *Eur J Immunol.* 2004;34(11):3028-38.
50. Meehan AC, Mifsud NA, Nguyen TH, Levvey BJ, Snell GI, Kotsimbos TC, et al. Impact of commonly used transplant immunosuppressive drugs on human NK cell function is dependent upon stimulation condition. *PLoS One.* 2013;8(3):e60144.

## **Conclusions**

## Conclusions

Notre projet de recherche apporte des éléments essentiels sur l'efficacité et la sécurité du transfert adoptif de cellules ThINKK dans un contexte de greffe de cellules souches. Nous avons démontré que notre protocole de différenciation des ThINKK à partir de cellules CD34<sup>+</sup> de sang de cordon permet de produire une population constituée à plus de 80% de cellules exprimant les marqueurs caractéristiques des pDC productrices d'IFN- $\alpha$ . Nos expériences ont démontré que les ThINKK n'exacerbaient pas l'activation et la prolifération des cellules T allogéniques. Nous avons également identifié une sous-population cellulaire exprimant le récepteur tyrosine kinase AXL possédant un faible caractère activateur des cellules T *in vitro*. Nos expériences *in vivo* ont toutefois démontré que les ThINKK n'accroissent pas la réaction de GvHD chez la souris, et ce, même sans déplétion de la sous-population AXL. Comme les patients visés par notre thérapie reçoivent après leur greffe des immunosuppresseurs pour contrer la GvHD, nous avons également déterminé l'impact que pourraient avoir ces immunosuppresseurs sur l'efficacité des ThINKK. Nos résultats démontrent que seules la cyclosporine A et la méthyl-prednisolone diminuent la cytotoxicité des cellules NK induite par les ThINKK, soutenant plutôt l'usage d'une prophylaxie basée sur le tacrolimus, le sirolimus et l'acide mycophénolique, sans effet sur l'axe d'activation ThINKK/NK.

Notre projet de recherche cible spécifiquement la LAL en raison de son taux de mortalité très élevé chez les enfants de moins de 15 ans. Suivant une rechute après chimiothérapie de première ligne, les enfants pour lesquels la GSCH ne s'avère pas efficace se retrouvent face à très peu de thérapies alternatives. Bien que certaines des thérapies en développement soient prometteuses, elles sont souvent limitées par un ou plusieurs facteurs d'efficacité, de spécificité et d'accessibilité. Les thérapies basées sur les CAR-T ont par exemple beaucoup gagné en popularité en raison de leur grande efficacité. Toutefois, d'un point de vue pratique, ces thérapies sont extrêmement coûteuses, avec certaines études projetant le coût total de production et d'administration d'une thérapie CAR-T à plus de \$400 000, avec une estimation de \$373 000 pour l'acquisition des CAR-T (88). Il est important de noter que ce coût est associé à un seul patient et que la production des CAR-T peut s'étendre sur plusieurs mois. En ciblant des antigènes spécifiques comme CD19, CD20 et CD22, les approches basées sur la reconnaissance d'un seul récepteur spécifique induisent un manque de spécificité pour les blastes leucémiques, provoquant par le fait même une lyse des lymphocytes B sains du patient.

Nous pensons que l'optimisation de la GSCH avec transfert adoptif de ThINKK sera en mesure de surmonter plusieurs de ces limites et d'offrir une voie de traitement accessible et efficace. Notre approche permet de produire des stocks de ThINKK non allo-réactives pouvant être transférés chez tous les patients. Les ThINKK peuvent également être congelés à la fin de la différenciation, nous permettant d'offrir une thérapie « off-the-shelf » disponible le jour même. Comme notre effet repose sur les cellules NK comme

effecteurs, nous sommes en mesure de tirer profit des mécanismes de reconnaissance des NK afin d'obtenir une spécificité ne reposant pas sur une seule cible. Nous évitons également le risque d'induction du syndrome de libération de cytokine (CRS) associé à l'utilisation des cellules T.

Bien que le projet de recherche se soit montré concluant pour l'ensemble des objectifs, plusieurs aspects mériteraient d'être investigués de manière plus approfondie. Il serait intéressant de tenter d'approfondir notre compréhension des mécanismes en jeu dans l'inhibition de l'activation ThINKK/NK par la CspA afin d'expliquer pourquoi le tacrolimus, qui possède un mécanisme très similaire à celui de la cyclosporine, n'induit pas cette même inhibition. En effet, la CspA inhibe la prolifération de cellules T en bloquant la production d'IL-2. Pour ce faire, la cyclosporine forme un complexe avec la cyclophiline, qui à son tour se lie à la calcineurine qui ne peut ainsi plus déphosphoryler le facteur nucléaire des cellules T activées (NF-ATc). Ce dernier ne peut donc plus entrer dans le noyau cellulaire pour y promouvoir la production d'IL-2. Le tacrolimus possède un mécanisme en tout point similaire mis à part qu'il forme un complexe avec l'immunophiline FK506-binding protéine (FKBP) et c'est ce complexe qui inhibe l'action de la calcineurine. C'est pourquoi il n'aurait pas été surprenant d'observer une action similaire de la CspA et du Tacro sur notre activation. Une analyse par cytométrie en flux de la quantité relative de cyclophiline et de FKBP pourrait nous éclairer sur le sujet.

Dans un intérêt davantage clinique, il serait pertinent de tester des alternatives au SR1 pour potentiellement améliorer le rendement cellulaire de notre différenciation de ThINKK. D'autres amplificateurs de cellules souches pourraient potentiellement mener à une différenciation plus efficace et une plus grande homogénéité du produit en diminuant la présence de sous-populations de ThINKK, comme les cellules AXL<sup>+</sup>. Les résultats de scRNAseq pourraient être analysés de nouveau pour tenter d'identifier les gènes impliqués dans la différenciation de ces sous-populations.

En résumé, nos résultats établissent les bases nécessaires pour l'élaboration d'une étude clinique en démontrant l'absence d'effet des ThINKK sur la GvHD, l'effet secondaire principal de la greffe et en identifiant les médicaments immunosuppresseurs compatibles avec notre immunothérapie.

Les prochaines étapes du projet résideront dans le transfert de la production des ThINKK en milieu industriel (GMP) pour obtenir un produit de grade clinique, des études de toxicologie générale chez la souris et l'écriture du protocole clinique et documents associés. Nous anticipons qu'une étude clinique de phase I sera ouvert d'ici 2023 pour les enfants atteints de leucémie aigüe lymphoblastique.

## Références

1. Onciu M. Acute Lymphoblastic Leukemia. *Hematology/Oncology Clinics of North America*. 2009;23(4):655-74.
2. Paul S, Lal G. The Molecular Mechanism of Natural Killer Cells Function and Its Importance in Cancer Immunotherapy. *Frontiers in Immunology*. 2017;8.
3. Vrooman LM, Silverman LB. Treatment of Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia: Prognostic Factors and Clinical Advances. *Current Hematologic Malignancy Reports*. 2016;11(5):385-94.
4. Sedick Q, Alotaibi S, Alshieban S, Khalid, Elyamany G. Natural Killer Cell Lymphoblastic Leukaemia/Lymphoma: Case Report and Review of the Recent Literature. *Case Reports in Oncology*. 2017;10(2):588-95.
5. Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia Treatment (PDQ(R)): Health Professional Version. PDQ Cancer Information Summaries. Bethesda (MD)2002.
6. Hunger SP, Mullighan CG. Acute Lymphoblastic Leukemia in Children. *New England Journal of Medicine*. 2015;373(16):1541-52.
7. Li Pira G, Biagini S, Cicchetti E, Merli P, Brescia LP, Milano GM, et al. Immunoselection techniques in hematopoietic stem cell transplantation. *Transfus Apher Sci*. 2016;54(3):356-63.
8. Stein M, Feldman E, Seiter K, Chiao JW, Goff H, Baskind P, et al. Cyclosporine-induced autologous graft-versus-host disease in patients with acute myeloid leukemia undergoing non-myeloablative chemotherapy without progenitor cell reinfusion. 1999;24(10):1073-7.
9. Gribben JG. Autologous and allogeneic stem cell transplantations for poor-risk chronic lymphocytic leukemia. 2005;106(13):4389-96.
10. Ballen KK, Spitzer TR. The great debate: haploidentical or cord blood transplant. *Bone Marrow Transplantation*. 2011;46(3):323-9.
11. Kolb H-J. Graft-versus-leukemia effects of transplantation and donor lymphocytes. *Blood*. 2008;112(12):4371-83.
12. Mavers M, Bertaina A. High-Risk Leukemia: Past, Present, and Future Role of NK Cells. *J Immunol Res*. 2018;2018:1586905.
13. Zarling JM, Nowinski RC, Bach FH. Lysis of leukemia cells by spleen cells of normal mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1975;72(7):2780-4.
14. Kiessling R, Klein E, Wigzell H. "Natural" killer cells in the mouse. I. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Specificity and distribution according to genotype. *Eur J Immunol*. 1975;5(2):112-7.

15. Herberman RB, Nunn ME, Holden HT, Lavrin DH. Natural cytotoxic reactivity of mouse lymphoid cells against syngeneic and allogeneic tumors. II. Characterization of effector cells. *Int J Cancer*. 1975;16(2):230-9.
16. Greenberg AH, Hudson L, Shen L, Roitt IM. Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity due to a "null" lymphoid cell. *Nat New Biol*. 1973;242(117):111-3.
17. Geiger TL, Sun JC. Development and maturation of natural killer cells. *Curr Opin Immunol*. 2016;39:82-9.
18. Cooper MA, Fehniger TA, Turner SC, Chen KS, Ghaheri BA, Ghayur T, et al. Human natural killer cells: a unique innate immunoregulatory role for the CD56bright subset. *Blood*. 2001;97(10):3146-51.
19. Mandelboim O, Lieberman N, Lev M, Paul L, Arnon TI, Bushkin Y, et al. Recognition of haemagglutinins on virus-infected cells by NKp46 activates lysis by human NK cells. *Nature*. 2001;409(6823):1055-60.
20. Byrd A, Hoffmann SC, Jarahian M, Momburg F, Watzl C. Expression Analysis of the Ligands for the Natural Killer Cell Receptors NKp30 and NKp44. *PLoS ONE*. 2007;2(12):e1339.
21. Martinet L, Ferrari De Andrade L, Guillerey C, Lee JS, Liu J, Souza-Fonseca-Guimaraes F, et al. DNAM-1 expression marks an alternative program of NK cell maturation. *Cell Rep*. 2015;11(1):85-97.
22. Makanga DR, Da Rin De Lorenzo F, David G, Willem C, Dubreuil L, Legrand N, et al. Genetic and Molecular Basis of Heterogeneous NK Cell Responses against Acute Leukemia. *Cancers*. 2020;12(7):1927.
23. Zhou X, Du J, Wang H, Chen C, Jiao L, Cheng X, et al. Repositioning liothyronine for cancer immunotherapy by blocking the interaction of immune checkpoint TIGIT/PVR. *Cell Communication and Signaling*. 2020;18(1).
24. Falschlehner C, Schaefer U, Walczak H. Following TRAIL's path in the immune system. *Immunology*. 2009;127(2):145-54.
25. Kanda J. Effect of HLA mismatch on acute graft-versus-host disease. *International Journal of Hematology*. 2013;98(3):300-8.
26. Zeis M, Uharek L, Glass B, Steinmann J, Dreger P, Gassmann W, et al. Allogeneic MHC-mismatched activated natural killer cells administered after bone marrow transplantation provide a strong graft-versus-leukaemia effect in mice. *British Journal of Haematology*. 1997;96(4):757-61.
27. Bishara A, De Santis D, Witt CC, Brautbar C, Christiansen FT, Or R, et al. The beneficial role of inhibitory KIR genes of HLA class I NK epitopes in haploidentically mismatched stem cell allografts may be masked by residual donor-alloreactive T cells causing GVHD. 2004;63(3):204-11.



28. Ruggeri L, Capanni M, Casucci M, Volpi I, Tosti A, Perruccio K, et al. Role of Natural Killer Cell Alloreactivity in HLA-Mismatched Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Blood*. 1999;94(1):333-9.
29. North J, Bakhsh I, Marden C, Pittman H, Addison E, Navarrete C, et al. Tumor-Primed Human Natural Killer Cells Lyse NK-Resistant Tumor Targets: Evidence of a Two-Stage Process in Resting NK Cell Activation. *The Journal of Immunology*. 2007;178(1):85-94.
30. Goswami R, Awasthi A. Editorial: T Cell Differentiation and Function in Tissue Inflammation. *Frontiers in Immunology*. 2020;11.
31. Fähnrich A, Klein S, Sergé A, Nyhoegen C, Kombrink S, Möller S, et al. CD154 Costimulation Shifts the Local T-Cell Receptor Repertoire Not Only During Thymic Selection but Also During Peripheral T-Dependent Humoral Immune Responses. *Frontiers in Immunology*. 2018;9.
32. Wucherpfennig KW, Sethi D. T cell receptor recognition of self and foreign antigens in the induction of autoimmunity. *Semin Immunol*. 2011;23(2):84-91.
33. Ichiki Y, Bowlus CL, Shimoda S, Ishibashi H, Vierling JM, Gershwin ME. T cell immunity and graft-versus-host disease (GVHD). *Autoimmun Rev*. 2006;5(1):1-9.
34. Kuba A, Raida L. Graft versus Host Disease: From Basic Pathogenic Principles to DNA Damage Response and Cellular Senescence. *Mediators of Inflammation*. 2018;2018:1-13.
35. Ferrara JL, Levine JE, Reddy P, Holler E. Graft-versus-host disease. *Lancet*. 2009;373(9674):1550-61.
36. Sakai R, Taguri M, Oshima K, Mori T, Ago H, Adachi S, et al. A comparison of tacrolimus and cyclosporine combined with methotrexate for graft-versus-host disease prophylaxis, stratified by stem cell source: a retrospective nationwide survey. *International Journal of Hematology*. 2016;103(3):322-33.
37. Pidala J, Kim J, Anasetti C. Sirolimus as primary treatment of acute graft-versus-host disease following allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2009;15(7):881-5.
38. Jacobson PA, Huang J, Wu J, Kim M, Logan B, Alousi A, et al. Mycophenolate pharmacokinetics and association with response to acute graft-versus-host disease treatment from the Blood and Marrow Transplant Clinical Trials Network. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2010;16(3):421-9.
39. Van Lint MT. Treatment of acute graft-versus-host disease with prednisolone: significant survival advantage for day +5 responders and no advantage for nonresponders receiving anti-thymocyte globulin. *Blood*. 2006;107(10):4177-81.
40. Rosenblatt J, Avigan D. *Immunotherapy for Acute Lymphocytic Leukemia*. Humana Press; 2011. p. 351-63.

41. Atrash S, Bano K, Harrison B, Abdallah AO. CAR-T treatment for hematological malignancies. *J Investig Med*. 2020.
42. Brudno JN, Kochenderfer JN. Recent advances in CAR T-cell toxicity: Mechanisms, manifestations and management. *Blood Rev*. 2019;34:45-55.
43. Jafarzadeh L, Masoumi E, Fallah-Mehrjardi K, Mirzaei HR, Hadjati J. Prolonged Persistence of Chimeric Antigen Receptor (CAR) T Cell in Adoptive Cancer Immunotherapy: Challenges and Ways Forward. *Front Immunol*. 2020;11:702.
44. Wang W, Jiang J, Wu C. CAR-NK for tumor immunotherapy: Clinical transformation and future prospects. *Cancer Letters*. 2020;472:175-80.
45. Siegler EL, Zhu Y, Wang P, Yang L. Off-the-Shelf CAR-NK Cells for Cancer Immunotherapy. *Cell Stem Cell*. 2018;23(2):160-1.
46. Domogala A, Madrigal JA, Saudemont A. Cryopreservation has no effect on function of natural killer cells differentiated in vitro from umbilical cord blood CD34+ cells. 2016;18(6):754-9.
47. Hudecek M, Izsvák Z, Johnen S, Renner M, Thumann G, Ivics Z. Going non-viral: the Sleeping Beauty transposon system breaks on through to the clinical side. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*. 2017;52(4):355-80.
48. Bari R, Granzin M, Tsang KS, Roy A, Krueger W, Orentas R, et al. Corrigendum: A Distinct Subset of Highly Proliferative and Lentiviral Vector (LV)-Transducible NK Cells Define a Readily Engineered Subset for Adoptive Cellular Therapy. *Frontiers in Immunology*. 2019;10.
49. Naeimi Kararoudi M, Tullius BP, Chakravarti N, Pomeroy EJ, Moriarity BS, Beland K, et al. Genetic and epigenetic modification of human primary NK cells for enhanced antitumor activity. *Semin Hematol*. 2020;57(4):201-12.
50. Minculescu L, Marquart HV, Friis LS, Petersen SL, Schiødt I, Ryder LP, et al. Early Natural Killer Cell Reconstitution Predicts Overall Survival in T Cell-Replete Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2016;22(12):2187-93.
51. Rubnitz JE, Inaba H, Ribeiro RC, Pounds S, Rooney B, Bell T, et al. NKAML: A Pilot Study to Determine the Safety and Feasibility of Haploidentical Natural Killer Cell Transplantation in Childhood Acute Myeloid Leukemia. *Journal of Clinical Oncology*. 2010;28(6):955-9.
52. Rubnitz JE, Inaba H, Kang G, Gan K, Hartford C, Triplett BM, et al. Natural killer cell therapy in children with relapsed leukemia. *Pediatric Blood & Cancer*. 2015;62(8):1468-72.
53. Inaba H, Bhojwani D, Pauley JL, Pei D, Cheng C, Metzger ML, et al. Combination chemotherapy with clofarabine, cyclophosphamide, and etoposide in children with refractory or relapsed haematological malignancies. *British Journal of Haematology*. 2012;156(2):275-9.

54. Brehm C, Huenecke S, Quaiser A, Esser R, Bremm M, Kloess S, et al. IL-2 Stimulated but Not Unstimulated NK Cells Induce Selective Disappearance of Peripheral Blood Cells: Concomitant Results to a Phase I/II Study. *PLoS ONE*. 2011;6(11):e27351.
55. Koehl U, Kalberer C, Spanholtz J, Lee DA, Miller JS, Cooley S, et al. Advances in clinical NK cell studies: Donor selection, manufacturing and quality control. *Oncol Immunology*. 2016;5(4):e1115178.
56. Levato L, Molica S. Rituximab in the management of acute lymphoblastic leukemia. *Expert Opin Biol Ther*. 2018;18(2):221-6.
57. Phelan KW, Advani AS. Novel Therapies in Acute Lymphoblastic Leukemia. *Current Hematologic Malignancy Reports*. 2018;13(4):289-99.
58. Shah NN, Stevenson MS, Yuan CM, Richards K, Delbrook C, Kreitman RJ, et al. Characterization of CD22 expression in acute lymphoblastic leukemia. *Pediatric Blood & Cancer*. 2015;62(6):964-9.
59. Raetz EA, Cairo MS, Borowitz MJ, Lu X, Devidas M, Reid JM, et al. Re-induction chemoimmunotherapy with epratuzumab in relapsed acute lymphoblastic leukemia (ALL): Phase II results from Children's Oncology Group (COG) study ADVL04P2. *Pediatric Blood & Cancer*. 2015;62(7):1171-5.
60. McNeer JL, Rau RE, Gupta S, Maude SL, O'Brien MM. Cutting to the Front of the Line: Immunotherapy for Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. *American Society of Clinical Oncology Educational Book*. 2020(40):1-12.
61. Huehls AM, Coupet TA, Sentman CL. Bispecific T-cell engagers for cancer immunotherapy. *Immunology & Cell Biology*. 2015;93(3):290-6.
62. Goebeler ME, Bargou RC. T cell-engaging therapies - BiTEs and beyond. *Nat Rev Clin Oncol*. 2020.
63. Wiernik A, Foley B, Zhang B, Verneris MR, Warlick E, Gleason MK, et al. Targeting Natural Killer Cells to Acute Myeloid Leukemia In Vitro with a CD16 x 33 Bispecific Killer Cell Engager and ADAM17 Inhibition. *Clinical Cancer Research*. 2013;19(14):3844-55.
64. Felices M, Lenvik TR, Davis ZB, Miller JS, Vallera DA. Generation of BiKEs and TriKEs to Improve NK Cell-Mediated Targeting of Tumor Cells. Springer New York; 2016. p. 333-46.
65. Tay SS, Carol H, Biro M. TriKEs and BiKEs join CARs on the cancer immunotherapy highway. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*. 2016;12(11):2790-6.
66. Spranger S, Gajewski TF. Mechanisms of Tumor Cell–Intrinsic Immune Evasion. *Annual Review of Cancer Biology*. 2018;2(1):213-28.
67. Vinay DS, Ryan EP, Pawelec G, Talib WH, Stagg J, Elkord E, et al. Immune evasion in cancer: Mechanistic basis and therapeutic strategies. *Seminars in Cancer Biology*. 2015;35:S185-S98.

68. Rabilloud T, Potier D, Pankaew S, Nozais M, Loosveld M, Payet-Bornet D. Single-cell profiling identifies pre-existing CD19-negative subclones in a B-ALL patient with CD19-negative relapse after CAR-T therapy. *Nature Communications*. 2021;12(1).
69. Patente TA, Pinho MP, Oliveira AA, Evangelista GCM, Bergami-Santos PC, Barbuto JAM. Human Dendritic Cells: Their Heterogeneity and Clinical Application Potential in Cancer Immunotherapy. *Frontiers in Immunology*. 2019;9.
70. Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YJ, et al. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol*. 2000;18:767-811.
71. Collin M, Bigley V. Human dendritic cell subsets: an update. *Immunology*. 2018;154(1):3-20.
72. Durai V, Kenneth. Functions of Murine Dendritic Cells. *Immunity*. 2016;45(4):719-36.
73. Shin K-S, Jeon I, Kim B-S, Kim I-K, Park Y-J, Koh C-H, et al. Monocyte-Derived Dendritic Cells Dictate the Memory Differentiation of CD8+ T Cells During Acute Infection. *Frontiers in Immunology*. 2019;10.
74. Villani A-C, Satija R, Reynolds G, Sarkizova S, Shekhar K, Fletcher J, et al. Single-cell RNA-seq reveals new types of human blood dendritic cells, monocytes, and progenitors. *Science*. 2017;356(6335):eaah4573.
75. Fitzgerald-Bocarsly P, Dai J, Singh S. Plasmacytoid dendritic cells and type I IFN: 50 years of convergent history. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2008;19(1):3-19.
76. Gardner A, Ruffell B. Dendritic Cells and Cancer Immunity. *Trends in Immunology*. 2016;37(12):855-65.
77. Villadangos JA, Young L. Antigen-presentation properties of plasmacytoid dendritic cells. *Immunity*. 2008;29(3):352-61.
78. Tel J, Van Der Leun AM, Figdor CG, Torensma R, De Vries IJM. Harnessing human plasmacytoid dendritic cells as professional APCs. *Cancer Immunology, Immunotherapy*. 2012;61(8):1279-88.
79. Marsman C, Lafouresse F, Liao Y, Baldwin TM, Mielke LA, Hu Y, et al. Plasmacytoid dendritic cell heterogeneity is defined by CXCL10 expression following TLR7 stimulation. *Immunology and Cell Biology*. 2018;96(10):1083-94.
80. Alculumbre SG, Saint-Andre V, Di Domizio J, Vargas P, Sirven P, Bost P, et al. Diversification of human plasmacytoid predendritic cells in response to a single stimulus. *Nat Immunol*. 2018;19(1):63-75.
81. Gerosa F, Gobbi A, Zorzi P, Burg S, Briere F, Carra G, et al. The Reciprocal Interaction of NK Cells with Plasmacytoid or Myeloid Dendritic Cells Profoundly Affects Innate Resistance Functions. *The Journal of Immunology*. 2005;174(2):727-34.

82. Lelaidier M, Diaz-Rodriguez Y, Cordeau M, Cordeiro P, Haddad E, Herblot S, et al. TRAIL-mediated killing of acute lymphoblastic leukemia by plasmacytoid dendritic cell-activated natural killer cells. *Oncotarget*. 2015;6(30):29440-55.
83. Díaz-Rodríguez Y, Cordeiro P, Belounis A, Herblot S, Duval M. In vitro differentiated plasmacytoid dendritic cells as a tool to induce anti-leukemia activity of natural killer cells. *Cancer Immunology, Immunotherapy*. 2017;66(10):1307-20.
84. Belounis A, Ayoub M, Cordeiro P, Lemieux W, Teira P, Haddad E, et al. Patients' NK cell stimulation with activated plasmacytoid dendritic cells increases dinutuximab-induced neuroblastoma killing. *Cancer Immunol Immunother*. 2020;69(9):1767-79.
85. Cordeau M, Belounis A, Lelaidier M, Cordeiro P, Sartelet H, Herblot S, et al. Efficient Killing of High Risk Neuroblastoma Using Natural Killer Cells Activated by Plasmacytoid Dendritic Cells. *PLOS ONE*. 2016;11(10):e0164401.
86. Gregoire-Gauthier J, Durrieu L, Duval A, Fontaine F, Dieng MM, Bourgey M, et al. Use of immunoglobulins in the prevention of GvHD in a xenogeneic NOD/SCID/gammac- mouse model. *Bone Marrow Transplant*. 2012;47(3):439-50.
87. Leung W, Campana D, Yang J, Pei D, Coustan-Smith E, Gan K, et al. High success rate of hematopoietic cell transplantation regardless of donor source in children with very high-risk leukemia. *Blood*. 2011;118(2):223-30.
88. Lyman GH, Nguyen A, Snyder S, Gitlin M, Chung KC. Economic Evaluation of Chimeric Antigen Receptor T-Cell Therapy by Site of Care Among Patients With Relapsed or Refractory Large B-Cell Lymphoma. *JAMA Network Open*. 2020;3(4):e202072.