

Université de Montréal

**Thérapie génique ciblant CD33 dans les cellules souches
hématopoïétiques, une approche innovatrice pour le traitement de
la leucémie myéloïde aiguë**

Par Camille Tremblay-Laganière

Département de microbiologie, infectiologie et immunologie
Faculté de médecine

Mémoire présenté en vue de l'obtention du grade de Maîtrise en microbiologie et
immunologie

Septembre 2018

© Camille Tremblay-Laganière, 2018

Résumé

Avec peu de nouveaux traitements, la leucémie myéloïde aiguë (LMA) demeure un cancer à mauvais pronostic. Depuis peu, des thérapies basées sur le transfert adoptif de lymphocytes T autologues modifiés avec un « Chimeric-Antigen Receptor » (CAR), récepteur artificiel redirigeant leur capacité cytotoxique vers les cellules tumorales, révolutionnent le traitement des tumeurs malignes d'origine B. CD33 est une des seules cibles démontrées comme efficace en essai clinique pour l'immunothérapie de la LMA. Cependant, la myélotoxicité est un problème majeur causé par la présence de CD33 sur les cellules souches hématopoïétiques (HSC) normales. De façon intéressante, CD33 ne semble pas indispensable puisque des patients et des modèles animaux déficients en CD33 ont été reportés, sans phénotype évident. Nous émettons l'hypothèse qu'une stratégie de « knock-out/knock-in » de CD33^{KO}/CAR-CD33 dans des HSC serait un traitement efficace et sécuritaire pour la LMA qui contournerait le problème de myélotoxicité. Les CAR HSC présenteraient plusieurs avantages sur les CAR-T, telles qu'une meilleure persistance *in vivo*, une diminution de l'épuisement des T et de leur toxicité dues à la génération continue et progressive des cellules effectrices. Nos résultats montrent qu'un CAR anti-CD33 est efficace contre des lignées cellulaires de LMA, lorsqu'exprimé dans des T primaires, même lorsque placé sous le contrôle d'un promoteur T-spécifique restreignant l'expression du CAR à la progéniture T. Nous avons aussi démontré l'efficacité des ARN guides et la spécificité du CAR par la résistance à la lyse de clones LMA CD33⁻. Notre stratégie sera maintenant testée dans les HSC et *in vivo*.

Mots-clés : CRISPR/Cas9, Leucémie myéloïde aiguë, CD33, thérapie génique, cellules souches hématopoïétiques, immunothérapie du cancer, CAR, lymphocytes T, promoteur spécifique

Abstract

With very few new treatments introduced in the past decades, acute myeloid leukemia (AML) remains a cancer with poor prognosis. Recently, a revolutionary immunotherapy for B-cell malignancies has been approved, named CAR-T cells. It is based on adoptive T-cell therapy but the cells are genetically engineered to express a “chimeric antigen receptor” (CAR), a surface protein used to redirect T cell’s natural cytotoxic activity against tumors. CD33 is one of the few clinically validated targets for AML immunotherapy. However, myelotoxicity is a major concern because this antigen is also present on normal hematopoietic stem cells (HSC). Interestingly, CD33 was dispensable in humans and in several animal models without any apparent consequences. We hypothesized that a HSC graft, engineered with a knock-out/knock-in of CD33/CAR-CD33, would be a safe and effective therapy for AML patients. This strategy would benefit from the clinical potential of CD33 without the associated myelotoxicity. Because of the continuous renewal of effector cells, CAR-HSC would have several advantages over the CAR-T cells such as long-term *in vivo* persistence and reduced cellular exhaustion. Cytokine release syndrome could also be diminished in CAR-HSC settings by the slow generation of CAR-T. In this study, we showed that the anti-CD33 CAR is effective and specific against AML cell lines even when its expression is mediated by a T-specific promoter. This promoter allows restriction of transgene expression to the T lineage progeny. We have designed efficient gRNA to target CD33 gene. The strategy will now be tested in HSC and in mice models.

Keywords : CRISPR/Cas9, acute myeloid leukemia, CD33, gene editing, hematopoietic stem cells, cancer immunotherapy, chimeric antigen receptor, T cells, specific promoter

Table des matières

Résumé.....	ii
Abstract.....	iii
Table des matières.....	iv
Liste des tableaux.....	vi
Liste des figures.....	vii
Liste des sigles et abréviations.....	viii
Chapitre 1 : Introduction.....	1
1.1 La leucémie myéloïde aiguë et ses traitements actuels.....	1
1.2 CD33 et son potentiel thérapeutique pour la LMA.....	3
1.3 La toxicité des thérapies anti-CD33.....	6
1.4 Les « Chimeric Antigen Receptors » comme nouvelle approche.....	7
1.5 La toxicité des CAR-T.....	9
1.6 Les générations de CAR.....	10
1.7 Barrière à l'application des CAR dans les autres cancers et défis.....	12
1.8 Les antigènes pour l'immunothérapie dans la LMA.....	14
1.9 Le concept de création d'antigène spécifique aux tumeurs par génie génétique.....	15
1.10 Les virus AAV comme outil thérapeutique.....	17
1.11 Le projet.....	18
1.12 Hypothèse et objectifs.....	23
Chapitre 2 : Matériel et méthodes.....	26
Réactifs et Milieux.....	26
Conception et clonage des ARNg.....	27
Conception et clonage du CAR anti-CD33.....	28
Bactéries et ADN.....	31
Culture cellulaire.....	31
Production virale.....	31
Titration virale sur Jurkat.....	32
Cytométrie en flux.....	32
Génération des clones d'AML CD33 KO et Luciférase ⁺ -GFP ⁺	33
Essais T7 et séquençage des clones AML CD33 KO.....	33
Transduction des cellules T primaires.....	34
Essais de cytotoxicité.....	35
Statistiques.....	36
Chapitre 3 : Résultats.....	37
3.1 CAR et effecteurs.....	37
3.2 CRISPR et cibles.....	45
3.3 Cytotoxicité du CAR anti-CD33 contre les cellules LMA.....	50
3.4 Préparation des modèles animaux.....	54
Chapitre 4 : Discussion.....	56
4.1. CAR et effecteurs.....	56
4.2. CRISPR et cibles.....	57

4.3. Cytotoxicité du CAR anti-CD33 contre les cellules LMA	58
4.4. Préparation des modèles animaux.....	61
4.5. Autres écueils et difficultés.....	63
Chapitre 5 : Perspectives.....	66
Chapitre 6 : Conclusion	68
Bibliographie.....	69
Annexe A : Séquence du fragment ScFv My96 ciblant le CD33	ii

Liste des tableaux

Tableau I : Séquences des ARN guides pour le CRISPR de CD33.....	28
Tableau II : Séquences des amorces utilisées pour l'amplification du ScFv My96.....	29
Tableau III : Séquences des amorces utilisées pour l'amplification.....	34

Liste des figures

Figure 1 : Spécificité du promoteur T-spécifique (Tenh) <i>in vitro</i>	19
Figure 2 : Spécificité du promoteur T-spécifique (Tenh) <i>in vivo</i>	20
Figure 3 : Stratégie proposée pour le traitement de la LMA par CAR-HSC	23
Figure 4 : Design expérimental pour mesurer l'efficacité des CAR-HSC	25
Figure 5 : Stratégie de clonage pour les vecteurs CAR anti-CD33 28z	30
Figure 6 : Clonage des vecteurs CAR CD33 28z	38
Figure 7 : Purification des cellules T à partir de PBMC de donneur sain	40
Figure 8 : Expression du CAR anti-CD33 à la surface des cellules T primaires	41
Figure 9 : Titration sur Jurkat des lentivirus codant pour le transgène du CAR anti-CD33	43
Figure 10 : Expression du CAR anti-CD33 sous promoteur fort ou spécifique sur cellules T primaires	44
Figure 11 : Test d'efficacité des ARN guides sur les THP1	46
Figure 12 : Invalidation du gène CD33 dans les lignées de LMA THP1 et HL60 à l'aide de l'ARNg #77	48
Figure 13 : Clones de LMA CD33+/-	49
Figure 14 : Caractérisation du clone HL60 CD33 ^{KO}	50
Figure 15 : Cytotoxicité du CAR anti-CD33 sous promoteur fort contre HL60 CD33 ⁺ ou CD33 ^{KO}	51
Figure 16 : Cytotoxicité du CAR anti-CD33 sous promoteur T-spécifique contre HL60 et THP1	53
Figure 17 : Génération de clones HL60 GFP-Luciférase pour les expériences <i>in vivo</i>	55

Liste des sigles et abréviations

AAV : « adeno-associated virus »

ADCC : cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps

ADN : acide désoxyribonucléique

ARN : acide ribonucléique

ARNg : ARN guide pour CRISPR

CAR : « chimeric antigen receptors »

Cas9 : « CRISPR-associated protein 9 »

CD : « cluster of differentiation »

CMH : complexe majeur d'histocompatibilité

CPA: cellule présentatrice d'antigènes

CRES : syndrome d'encéphalopathie relié aux cellules CAR-T

CRISPR: « clustered regularly interspaced short palindromic repeats »

CRS : syndrome de relargage de cytokines

DLBCL : lymphome diffus à grandes cellules B

DMEM : Dulbecco's Modified Eagle's Medium

DMEMc : milieu DMEM complet (10% FBS, 100 IU/ml de pénicilline-streptomycine)

DMSO : Diméthylsulfoxyde

FBS : « fetal bovine serum »

Fc: fragment constant d'un anticorps

FDA : « Food and Drug administration » des États-Unis

FITC: fluorochrome fluorescéine isothiocyanate

GO : Gemtuzumab ozogamicine

GvHD : maladie du greffon contre l'hôte

GVL : greffe contre leucémie

HBS : « HEPES buffered saline »

HDR: « homology directed repair »

HLA : antigènes leucocytaires humains

HSC : cellules souches hématopoïétiques

HSCT : transplantation de cellules souches hématopoïétiques

IFN- γ : interféron gamma

IL : Interleukine
Indels : insertions et/ou délétions de nucléotides
kb : kilobase
LB : « Lysogeny broth », milieu de culture pour bactéries
LLA : leucémie lymphoïde aiguë
LMA : leucémie myéloïde aiguë
LSC : cellules souches leucémiques
LTRs : « Long Terminal Repeats », séquence dans les vecteurs lentiviraux
ml : millilitres
MOI : « Multiplicity of infection »
NHEJ : « non-homologous end joining »
NSG : souris de génotype NOD/SCID/IL2 γ ^{null}
PAM : « Protospacer adjacent motif »
PBMC : cellules mononuclées de sang périphérique
PBS : Tampon phosphate salin
PCR : réaction en chaîne par polymérase
PE : fluorochrome R-phycoérythrine
Rpm: « Revolutions per minute »
RPMI : milieu Roswell Park Memorial Institute
RPMIc : milieu RPMI complet (10% FBS, 100 IU/ml de pénicilline-streptomycine)
ScFv : « single-chain variable fragment »
SEM : « Standard Error of the Mean »
SOS : syndrome d'obstruction sinusoidal
TAE buffer : solution de Tris base, Acide acétique, EDTA
TCR : récepteur de cellule T
TNF : « tumor necrosis factor »
ul : microlitres
4-1BB : CD137
7-AAD : « 7-aminoactinomycin D »

Remerciements

J'aimerais remercier tous les membres du laboratoire et plus particulièrement :

Pour ce projet :
Maxime Veillette
Louise Duquesne

Pour le développement du promoteur T-spécifique :
Aurélien Colamartino
Panojot Bifsha

Pour leur enseignement :
William Lemieux
Hugo Roméro
Chloé Colas
Kathie Beland
Silvia Selleri
Yuanyi Li

Pour sa supervision :
Dr Élie Haddad

Chapitre 1 : Introduction

1.1 La leucémie myéloïde aiguë et ses traitements actuels

La leucémie myéloïde aiguë (LMA) est un cancer dérivant des cellules hématopoïétiques de type myéloïde, qui comprennent les monocytes, les granulocytes, les érythrocytes et mégacaryocytes. Selon la cellule d'origine et les anomalies génétiques présentes, la LMA peut être divisée en plusieurs sous-types qui ont chacun leurs particularités propres, ce qui rend cette maladie très hétérogène au niveau génétique et moléculaire (Buckley and Walter 2015). La LMA est la leucémie aiguë la plus commune chez l'adulte et la deuxième leucémie la plus fréquente chez l'enfant (Tasian et al. 2018). Les taux de survie à 5 ans actuels sont de 20% chez l'adulte et 70% chez l'enfant (Newcombe et al. 2018). La LMA fait partie des cancers les plus difficiles à traiter chez l'enfant dû à sa grande hétérogénéité et à son taux élevé de rechutes (Gamis et al. 2014). Les rechutes de LMA et les LMA réfractaires sont responsables de la moitié des mortalités liées à la leucémie de l'enfant. Dans les dernières décennies, peu de nouveaux traitements ont été introduits pour la LMA et les avancées thérapeutiques principales sont l'intensification de la chimiothérapie, le perfectionnement de la greffe de cellules souches hématopoïétiques (HSCT) et l'amélioration des soins de support permettant une diminution de la mortalité liée à ces traitements (Newcombe et al. 2018)(Buckley and Walter 2015). La chimiothérapie standard pour la LMA est constituée de daunorubicine et cytarabine (Ara-C) et n'a pas changé depuis 1973 (Luger 2017).

Après la chimiothérapie, la HSCT reste la seule option curative mais conduit à une rechute dans 35 à 45% des cas avec un pronostic très sombre (Shem-Tov et al. 2017). La HSCT est la première immunothérapie mise au point et est encore aujourd'hui la plus utilisée (Beyar-Katz and Gill 2018). Elle fonctionne par un effet de greffe contre leucémie (GVL), où le système immunitaire du donneur, principalement les cellules T, attaque la tumeur à cause des disparités génétiques dans les antigènes leucocytaires humains (HLA) et dans d'autres antigènes mineurs entre le donneur et le receveur.

La maladie du greffon contre l'hôte (GvHD) est la contrepartie pathologique de la GVL où cette même reconnaissance des HLA étrangers va mener les cellules de la greffe à endommager les organes du receveur, principalement la peau, le tube digestif et le foie. Un équilibre thérapeutique doit donc être trouvé afin de maximiser la GVL sans aggraver la GvHD. Les moyens pour y arriver font toujours l'objet de recherches intensives (Warren and Deeg 2013). La GvHD est la plus fréquente et la plus grave complication post-HSCT. La prise en charge actuelle passe principalement par l'administration de corticostéroïdes qui ont permis de diminuer la mortalité et la morbidité liée à la HSCT (Holtan et al. 2014). Il y a donc un besoin criant de nouveaux traitements efficaces afin de bonifier ou de remplacer les traitements actuels et d'améliorer le pronostic des patients atteints de LMA.

Parmi les rares nouveaux traitements à avoir démontré une efficacité en clinique contre LMA se trouve le gemtuzumab ozogamicin (GO), un anticorps anti-CD33 conjugué à un dérivé disulfide de calicheamicine par un lien hydrolysable. Le mode d'action de GO passe par la calicheamicine, un agent de chimiothérapie. Cet agent toxique est livré aux cellules tumorales par un anticorps ciblant CD33. Une fois lié au CD33, le complexe CD33-GO est internalisé. Le GO est hydrolysé afin de libérer la calicheamicine, qui pénètre le noyau cellulaire où elle cause des bris double brin à l'ADN. Ces bris double brin causent la mort de la cellule par apoptose (Voutsadakis 2002). GO est le premier traitement contre le cancer sous forme d'anticorps conjugué à un médicament à être approuvé par la FDA. Il est particulièrement efficace contre les LMA de type pro-myélocytaire et augmente la survie à 5 ans en diminuant les risques de rechute pour les LMA avec des risques cytogénétiques favorables et intermédiaires (C D Godwin et al. 2017; Hills et al. 2014). Il est approuvé seul ou en combinaison pour le traitement des adultes avec un nouveau diagnostic de LMA CD33⁺, pour lesquels une augmentation de la survie sans événement a été démontrée (Jen et al. 2018). Dans un essai clinique chez les enfants et les adolescents nouvellement diagnostiqués, GO augmente aussi la survie sans événement en diminuant les risques de rechutes (Gamis et al. 2014).

1.2 CD33 et son potentiel thérapeutique pour la LMA

CD33 ou siglec-3 fait partie de la famille des siglec, des protéines de surface de type lectine « immunoglobulin-like » liant l'acide sialique. Il est aussi appelé antigène de différenciation myéloïde puisqu'il apparaît sur les cellules lorsqu'elles s'engagent dans la lignée myéloïde. Parmi les siglec, CD33 est celui qui est exprimé le plus tôt dans l'hématopoïèse. Il est exprimé par les cellules souches hématopoïétiques (HSC) et les progéniteurs hématopoïétiques multipotents précoces mais aussi par les macrophages, monocytes et cellules dendritiques (Gunten and Bochner 2008; Laing et al. 2017; Taussig et al. 2005; Knapp et al. 2018; Pizzitola et al. 2014; Olweus et al. 1994). La molécule de CD33 est constituée de deux domaines « immunoglobulin-like » extracellulaires et d'une queue cytoplasmique contenant un motif immunorecepteur inhibiteur à tyrosine (ITIM) qui permet son endocytose suite à sa liaison (Laing et al. 2017). La fonction de CD33 n'est pas complètement élucidée puisqu'elle a peu été étudiée *in vivo*. Cependant, CD33 semble être impliqué dans la régulation de la croissance et de la prolifération des progéniteurs et des cellules myéloïdes matures par l'activation de l'apoptose (Gunten and Bochner 2008). Chez les monocytes plus particulièrement, CD33 bloque aussi la production de plusieurs cytokines inflammatoires tels que IL1 β , IL8 et TNF α (Gunten and Bochner 2008).

Comme cible thérapeutique pour la LMA, CD33 a un bon potentiel puisqu'il est exprimé sur les blastes leucémiques de 90% des patients et est fréquemment surexprimé par les blastes LMA (O'Hear et al. 2015). CD33 est aussi présent sur les cellules souches leucémiques (LSC), une sous-population rare de cellule LMA qui, comme les HSC normales, ont la capacité de s'auto-renouveler, d'entrer en quiescence et de produire des cellules filles plus différenciées comme les blastes leucémiques (Laing et al. 2017). Ces cellules initient et maintiennent la maladie. Elles contiennent les mutations fondatrices du cancer et sont particulièrement résistantes aux traitements. Elles sont, en grande partie, responsables des rechutes de LMA (Pelosi et al. 2015). L'élimination des LSC lors du traitement est donc essentielle et les thérapies ciblant CD33 ont cette capacité bien que le niveau d'expression puisse varier d'un patient à l'autre et être hétérogène au sein de la population cellulaire de LMA (Laszlo et al. 2014). Aussi, les thérapies visant CD33 tel que GO et lintuzumab, un autre anticorps anti-CD33 humanisé

mais non-conjugué à une chimiothérapie, ne semblent pas induire une réduction de l'expression de CD33 ni sélectionner l'émergence de cellules tumorales CD33 négatives, contrairement à plusieurs traitements visant d'autres molécules de surface comme CD19, par exemple (Mejstříková et al. 2017; Ruella, Barrett, et al. 2016; Wang et al. 2015). En effet, les rechutes de LMA survenant après un traitement avec GO sont le plus souvent CD33-positives et le mode de résistance au traitement passe par la chimio-résistance à la calicheamicine par des pompes à efflux et la résistance à l'apoptose causée par les dommages à l'ADN. De plus, parmi toutes les cibles présentement à l'étude pour l'immunothérapie de la LMA, seul CD33 a été démontré comme efficace en essai clinique, approuvé par la FDA et mis en marché pour le traitement de la LMA (O'Hear et al. 2015; Assi et al. 2018).

Un fait intéressant sur CD33 est qu'il semble être complètement dispensable chez plusieurs espèces de mammifères, peut-être dû à la présence d'autres protéines de fonction redondante. Premièrement, chez la souris déficiente en CD33, aucun phénotype particulier n'a été détecté. Ces souris sont viables et fertiles. Aucune anomalie dans la morphologie, l'histologie, la distribution et le nombre de cellules hématopoïétiques n'a été observée (Brinkman-Van der Linden et al. 2003). La réponse inflammatoire semble, également, inchangée. Les gènes de CD33 murin et humain ont en commun la position chromosomique, en regard des gènes adjacents, et la structure. Cependant, l'équivalence fonctionnelle du CD33 murin et humain est questionnée. En effet, l'expression est différente chez la souris où CD33 est davantage exprimé sur les granulocytes matures que sur les monocytes et les progéniteurs myéloïdes. Le ligand est aussi différent puisque le CD33 murin lie préférentiellement les mucines plutôt que l'acide sialique. Finalement, le ITIM est absent de la queue cytoplasmique du CD33 murin (Brinkman-Van der Linden et al. 2003). Ensuite, chez le macaque rhésus, chez qui l'expression de CD33 est équivalente à l'humain dans les neutrophiles mais plus variable dans les monocytes et les HSC, la greffe autologue de HSC invalidées pour le CD33 mène à une reconstitution immunitaire normale. Les HSC invalidées semblent conserver leur capacité à produire des cellules de toutes les lignées hématopoïétiques à long-terme et les neutrophiles dérivés de ces HSC ne montrent pas de perturbations dans leur aspect ou leur fonction (Kim et al. 2018). Finalement, chez l'humain, une étude de cas a été reportée d'un patient complètement déficient en CD33 dû à une délétion homozygote de 4 nucléotides dans l'exon 3 créant un codon

stop prématuré dans tous les variants d'épissage de CD33. Les seules caractéristiques notées chez ce patient sont la présence d'un angio-œdème récurrent et l'augmentation de la production spontanée d'IL8 par les cellules mononuclées sans impact clinique majeur. Toutefois, la fonction et le nombre des monocytes et granulocytes sont normaux (Geier et al. 2014). Ces trouvailles concordent avec la fonction attribuée à CD33 d'inhiber les cellules myéloïdes et leur sécrétion de cytokines pro-inflammatoires, tel que décrit précédemment (C D Godwin et al. 2017; Gunten and Bochner 2008). Similairement à ce patient, un total de 51 autres individus avec des mutations homozygotes de perte de fonction de CD33 ont été recensés dans quatre cohortes (Lek et al. 2016; Narasimhan et al. 2016; Saleheen et al. 2017; Sulem et al. 2015). Quatre-vingt-six pourcent (86%) de ces individus ont la même mutation que le patient mentionné plus tôt (Kim et al. 2018). Dans une autre étude, l'inactivation du gène de CD33 dans des HSC humaines ne change pas leur croissance et différenciation *in vitro* ni leur potentiel de reconstitution à long-terme dans des souris immuno-déficientes NOD/SCID/IL2 γ ^{null} (NSG). En effet, la prise d'une greffe secondaire de ces HSC dans une deuxième souris est équivalente à celle de HSC contrôles. Le profil d'expression d'ARN, le phénotype et la fonction de neutrophiles et de macrophages dérivés de ces HSC *in vitro* sont normaux (Kim et al. 2016). La réponse inflammatoire induite par la modélisation d'une septicémie de bactéries gram-négatives chez les souris reconstituées par les HSC invalidées pour CD33 est similaire à celle produite par des souris HSC contrôles. La réponse de ces souris au G-CSF est aussi inchangée (Kim et al. 2018). Ainsi, l'absence du gène CD33 chez l'humain, les souris et les macaques ne semblent pas affecter les fonctions immunitaires normales. Cependant, beaucoup reste encore à faire pour mieux comprendre le rôle de CD33 dans l'hématopoïèse. Par exemple, une étude récente a démontré que la fraction CD33⁺ des HSC de sang de cordon (définies comme CD34⁺ CD38⁻ CD45RA⁻ CD90⁺ CD49f⁺) avait le plus grand potentiel régénératif à long-terme lors de xenogreffes sériées (Knapp et al. 2018). Les nouvelles méthodes d'analyses fonctionnelles unicellulaires combinées aux analyses des transcriptomes, methylomes et protéomes de cellules primitives uniques permettront d'élucider les phénotypes spécifiques aux différents sous-types de HSC et de peaufiner notre compréhension de l'hématopoïèse (Velten et al. 2017).

1.3 La toxicité des thérapies anti-CD33

De par la présence de CD33 sur les cellules hématopoïétiques normales, les traitements qui ciblent cette protéine induisent une myélosuppression profonde et une pancytopenie persistante en tuant une grande proportion des HSC et progéniteurs hématopoïétiques du patient (Wang et al. 2015). Ces phénomènes se manifestent par une anémie grave, des hémorragies à répétition et une susceptibilité accrue aux infections. L'effet indésirable le plus fréquemment observé avec GO est une neutropénie et une thrombocytopenie prolongées (Voutsadakis 2002).

Le syndrome d'obstruction sinusoidal (SOS), ou maladie veno-occlusive hépatique, est un autre type de toxicité qui semble être associé aux traitements anti-CD33. Il est caractérisé par une hyperbilirubinémie, une hépatomégalie douloureuse, une ascite et une prise de poids soudaine. Il peut mener à une hépatotoxicité grave. En effet, plusieurs cas ont été reportés lors de l'utilisation de GO qui ont menés au retrait temporaire de GO du marché en 2010. L'incidence de SOS aux doses initiales de GO de 9 mg/m² atteint jusqu'à 15% (McKoy et al. 2007). Également, un essai clinique de phase I utilisant le vadastuximab talirine, un autre anticorps anti-CD33 conjugué à une chimiothérapie de dimère de pyrrolobenzodiazépine, a été suspendu par la FDA en 2016 suite à des cas de SOS et d'hépatotoxicité qui ont mené à la mort de 4 patients. Le SOS est, par contre, aussi une complication connue de la HSCT (Colin D Godwin et al. 2017). Comme les patients LMA participant aux essais cliniques ont souvent reçu un HSCT, le risque attribuable aux thérapies anti-CD33 ou à la HSCT reste encore à déterminer. De plus, une incidence de SOS de 15 à 40% a été trouvée lorsque une HSCT est réalisée dans les 3 à 4 mois suivant l'utilisation de GO, suggérant un effet synergique (McKoy et al. 2007; Wadleigh et al. 2003). De fait, aucun cas de SOS n'a été observé dans l'essai clinique de vadastuximab talirine en l'absence de HSCT (Stein et al. 2018). La calicheamicine utilisée dans le GO, de même que les alcaloïdes pyrrolizidines dans le vadastuximab talirine, sont aussi, en eux-mêmes, des agents pouvant causer des dommages au foie. Une association entre le SOS et le inotuzumab ozogamicine, un anticorps anti-CD22 conjugué au même dérivé de calicheamicine que le GO, est aussi reportée (Kantarjian et al. 2016). De façon intéressante, à faible dose, la toxicité de GO (hémorragie, thrombocytopenie prolongée et SOS) est retrouvée uniquement lors de son administration en combinaison avec les agents de chimiothérapie

standards, daunorubicine et cytarabine, pointant vers un possible effet synergique (Jen et al. 2018). L'incidence de SOS chez les adultes recevant 6 mg/m² ou moins de GO seul ou en combinaison avec des agents non-hépatotoxiques est de 3% (McKoy et al. 2007). Une méta-analyse démontre qu'une dose de 3 mg/m² est aussi efficace que des doses plus fortes et cause moins de toxicité grave (Hills et al. 2014).

Le mécanisme d'hépatotoxicité des thérapies anti-CD33 doit donc continuer d'être évalué en profondeur afin de déterminer si celle-ci est dépendante de la cible ou plutôt médiée par les chimiothérapies conjuguées et par la combinaison avec la HSCT. Cette évaluation permettra de prédire le potentiel de toxicité de thérapies anti-CD33 prenant d'autres formes.

1.4 Les « Chimeric Antigen Receptors » comme nouvelle approche

Récemment, un nouveau type de traitement a fait son apparition sur le marché pour la leucémie lymphoïde aiguë et le lymphome. Les « Chimeric Antigen Receptors » (CAR) sont des molécules artificielles développées afin de rediriger le potentiel cytotoxique d'un lymphocyte T contre une cellule portant un antigène donné. Ces molécules, mimant le récepteur des cellules T (TCR), sont constituées de trois parties. En extracellulaire, un fragment « Single-Chain Fragment Variable » (ScFv), issu de la partie variable de la chaîne légère et lourde d'un anticorps est utilisé afin de permettre la reconnaissance de l'antigène choisi. En intracellulaire, un domaine CD3 ζ , combiné ou non à des domaines de co-stimulation (typiquement CD28 et/ou 4-1BB), assure la transduction du signal et l'activation des voies de cytotoxicité (Chavez and Locke 2018). Ces deux parties sont reliées par un domaine transmembranaire, qui stabilise le CAR, le plus souvent généré à partir du domaine transmembranaire de CD28 ou de la partie constante d'un IgG. La partie extracellulaire et le domaine transmembranaire sont reliés par un segment du CD8, d'un IgG ou d'un IgD qui, par sa flexibilité, permet un mouvement suffisant du ScFv pour une liaison optimale avec l'antigène (Muhammad et al. 2017; Fan et al. 2017). Le transgène codant pour la molécule du CAR est inséré dans l'ADN de cellules T, qui exprimeront cette protéine à leur surface, afin de créer ce qui est appelé des CAR-T.

De façon générale, les CAR présentent des avantages majeurs sur les TCR. En effet, ils ne requièrent pas de signal de co-stimulation pour activer la cellule qui les porte puisque les domaines de co-stimulation sont intégrés dans la queue cytoplasmique du CAR et sont activés directement par la liaison de l'antigène, sans nécessiter la liaison d'un ligand supplémentaire. Aussi, comme les anticorps desquels ils sont issus et contrairement au TCR, les CAR peuvent reconnaître l'antigène dans sa forme native et soluble, sans qu'il soit présenté par une molécule de complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) du soi. Ceci permet l'utilisation des CAR indépendamment de la compatibilité des HLA. De plus, les CAR peuvent être employés pour cibler des carbohydrates ou des glycolipides et ne sont pas limités aux protéines comme la majorité des TCR. Finalement, les CAR-T sont complètement indépendants de la présentation antigénique par les cellules présentatrices d'antigène (CPA), qui fournissent normalement les signaux de co-stimulation et l'antigène dans le contexte du CMH du soi (Jain et al. 2018). Tous ces avantages sont extrêmement utiles lorsque les CAR-T sont placées face à des cellules tumorales. Effectivement, il est bien connu que les tumeurs utilisent de nombreux mécanismes pour échapper à la reconnaissance du système immunitaire tel qu'une expression diminuée du CMH et des signaux de co-stimulation (Muhammad et al. 2017; Sadelain et al. 2013). De leur côté, les TCR ont l'avantage de pouvoir reconnaître des antigènes à très faible densité sur une cellule, dû à une organisation précise des molécules de signalisation, appelée synapse immunologique (Majzner and Mackall 2018). Aussi, dans certaines situations, la stimulation du TCR seule peut être suffisante pour permettre l'activation des lymphocytes T, sans nécessiter une co-stimulation, par exemple, dans le cas de l'activation des lymphocytes T mémoires ou en présence d'antigènes très abondants et persistants. (Boesteanu and Katsikis 2009).

Fin 2017, la FDA a approuvé les deux premières thérapies basées sur les CAR-T. Ces deux traitements sont des CAR de deuxième génération qui visent l'antigène CD19 à la surface des cellules B. Le CAR de Kymriah (Novartis) contient les domaines CD3 ζ et 4-1BB alors que celui de Yescarta (Gilead Sciences / Kite Pharma) contient CD3 ζ et CD28. D'abord, Kymriah (tisagenlecleucel) est approuvé pour la leucémie lymphoïde aiguë (LLA) pédiatrique à cellules B réfractaire ou avec deux rechutes ou plus, chez qui il obtient des taux de réponse de 81% et de rémission complète de 60% (Maude et al. 2018). Ensuite, Yescarta (axicabtagene ciloleucel)

est approuvé pour le lymphome diffus à grandes cellules B (DLBCL) adulte réfractaire ou en rechute avec des taux de 82% de réponse et 54% de rémission complète (Jain et al. 2018). Ces essais cliniques sont faits sur des patients de dernière chance, pour lesquels tous les autres traitements ont échoué, ce qui laisse présager que l'efficacité dans la population de patients naïfs pourraient encore plus grande. De plus, des rémissions durables ont été observées, suggérant que ces traitements pourraient être curatifs (Neelapu et al. 2018).

1.5 La toxicité des CAR-T

Les résultats des essais cliniques des CAR-T sont impressionnants. Cependant, des toxicités sévères ont été observées, principalement le syndrome de relargage de cytokines (CRS) et le syndrome d'encéphalopathie relié aux cellules CAR-T (CRES), une forme de neurotoxicité. Le CRS se manifeste par une fièvre élevée, une hypotension, une hypoperfusion et une défaillance multi-organes. Le mécanisme passe par la relâche massive de cytokines telles que IL2, IL6, IFN γ et GM-CSF par des milliers de CAR-T activés simultanément par la rencontre de l'antigène. Ces cytokines, en retour, activeront une grande quantité de monocytes, macrophages, cellules dendritiques et autres cellules qui créeront une boucle d'activation qui renforcera l'état d'inflammation excessive. La prise en charge repose en grande partie sur des anticorps antagonistes d'IL-6, siltuximab, ou du récepteur à IL-6, tocilizumab (Neelapu et al. 2018). Les corticostéroïdes systémiques sont aussi utilisés en dernier recours, car ceux-ci peuvent inhiber la persistance et l'effet anti-tumorale des CAR-T (Fan et al. 2017; Brudno and Kochenderfer 2016). Une forte charge tumorale pré-traitement et une prolifération élevée de CAR-T *in vivo* semblent être des facteurs majeurs qui favorisent le développement de CRS (Chavez and Locke 2018; Norelli et al. 2018).

Le CRES est caractérisé par de la confusion, un délirium, des pertes de conscience et un œdème cérébral. La physiopathologie est mal comprise mais deux mécanismes semblent entrer en jeu. Premièrement, la diffusion de cytokines, principalement IL-6 et IL-15, à travers la barrière hémato-encéphalique. Deuxièmement, l'infiltration de CAR-T dans le système nerveux central. En effet, on retrouve des CAR-T et des globules blancs dans le liquide céphalo-rachidien des patients souffrant de CRES sévère, dénotant un bris de la barrière hémato-encéphalique

(Santomasso et al. 2018). Le traitement est basé principalement sur des corticostéroïdes. Les thérapies anti-IL6 sont recommandés lorsque le CRES est accompagné de CRS (Neelapu et al. 2018).

Le CRS est la complication la plus fréquente avec jusqu'à 90% des patients traités aux CAR-T qui la développeront. Par ailleurs, 47% des patients traités avec Kymriah ont développé un CRS grave et 13% une CRES grave (Maude et al. 2018). Dans l'essai clinique pour Yescarta, 28% des patients ont développé une CRES grave, 13% ont souffert de CRS grave et deux patients sont décédés des complications de CRS (Jain et al. 2018). Ces complications sont des entités nouvelles qui sont spécifiques aux immunothérapies cellulaires et n'étaient pas retrouvées avec les autres types de traitements (Neelapu et al. 2018). Des études approfondies seront nécessaires afin de mieux définir la meilleure prise en charge pour ces pathologies. Les CAR-T devront donc être administrés dans de grands centres spécialisés pour encore plusieurs années afin d'assurer la sécurité des patients.

1.6 Les générations de CAR

Plusieurs générations de CAR ont été développées au fil des années. La première génération de CAR contenait uniquement le CD3 ζ sans domaines de co-stimulation. Ces CAR démontraient une activité anti-tumorale mais proliféraient peu et avaient une durée de vie courte (Jain et al. 2018; Abken 2016). Les CAR de deuxième génération ont été créés en ajoutant un domaine de co-stimulation à la queue cytoplasmique. Plusieurs domaines de co-stimulation existent mais les deux plus utilisés sont le CD28 et le 4-1BB. Ces deux domaines permettent de générer des CAR-T efficaces, qui prolifèrent et persistent plus que ceux de première génération, mais ont des caractéristiques distinctes. En général, la combinaison de CD28 et CD3 ζ permet d'obtenir un phénotype effecteur où les cellules sont CD45RO⁺ CCR7⁻, libèrent plus de cytokines et utilisent un métabolisme glycolytique (Abken 2016). Le CAR 4-1BB, de son côté, produit des CAR-T avec un phénotype mémoire. Ces CAR-T sont CD45RO⁺ CCR7⁺, libèrent moins de cytokines et ont un métabolisme oxydatif (Abken 2016; Muhammad et al. 2017). Les CAR-T CD28 permettent d'éliminer les cellules tumorales plus rapidement que les CAR-T

utilisant 4-1BB dans un modèle de xéno greffe leucémique LLA chez la souris. Dans des tests de prolifération *in vitro*, les CAR-T 4-1BB surpassent les CAR-T CD28 en prolifération après 2-3 semaines. Les CAR-T 4-1BB persistent davantage que les CAR-T CD28 *in vivo*. Les CAR-T 4-1BB sont détectables pendant plus de 6 mois dans le sang des patients traités alors que les CAR-T CD28 sont détectés en moyenne jusqu'à 3 mois après le traitement (Zhang et al. 2015). En bref, les CAR CD28-CD3 ζ ont une activité anti-tumorale supérieure et agissent rapidement alors que les CAR 4-1BB-CD3 ζ , par leur plus grande persistance, atteignent une efficacité équivalente mais avec une cinétique plus lente (Zhao et al. 2015; van der Stegen et al. 2015; Carpenito et al. 2009).

Les CAR troisième génération, quant à eux, contiennent le CD3 ζ ainsi que deux domaines de co-stimulation, le plus souvent CD28 et 4-1BB. Ils ont été créés afin de combiner les avantages des deux domaines. Dans des études précliniques, ces nouveaux CAR semblent démontrer une prolifération, une activation et une cytotoxicité augmentées mais peu d'études ont réellement comparé l'efficacité des CAR 2^e génération à ceux de 3^e génération (Carpenito et al. 2009; Wang et al. 2007; Wilkie et al. 2008; Zhong et al. 2010). Cependant, cette supériorité ne semble pas se confirmer en clinique (Fan et al. 2017; Zhang et al. 2017). Les propriétés spécifiques des CAR 3^e génération sont encore peu connues. L'impact de leur plus longue queue cytoplasmique n'est pas encore déterminé mais celle-ci pourrait nuire à la bonne interaction des domaines avec la membrane plasmique à l'état de repos et conduire à une suractivation des voies de signalisation (Dobbins et al. 2016). Par exemple, le concept de signalisation tonique est décrit chez les CAR où, par l'oligomérisation des ScFv, les chaînes CD3 ζ sont phosphorylées de façon indépendante de l'antigène, ce qui peut mener à l'épuisement des cellules (Kasakovski et al. 2018; Long et al. 2015). L'activation excessive de ces CAR-T soulève aussi la possibilité que les effets secondaires comme le CRS soient amplifiés (Fan et al. 2017; Morgan et al. 2010).

D'autres domaines de co-stimulation sont aussi de plus en plus utilisés, particulièrement ICOS et OX40 (Abken 2016). ICOS semblent augmenter la persistance et l'efficacité des CAR-T en modulant le programme de différenciation des lymphocytes T (Guedan et al. 2014). OX40, quant à lui, semble induire une prolifération plus importante et plus soutenue avec une

production de cytokines accrue (Sahin et al. 2018; Pulè et al. 2005). D'autres études sont nécessaires afin de définir les caractéristiques propres de chacun des domaines et déterminer comment ils doivent être combinés pour construire le CAR optimal.

1.7 Barrière à l'application des CAR dans les autres cancers et défis

Malgré le succès des CAR-T dans les tumeurs d'origine lymphocytaire B et la grande intensité de recherche dans le domaine, les CAR-T pour d'autres types de cancer peinent à atteindre la clinique. La barrière principale est le manque d'antigène spécifique aux tumeurs. En effet, très peu d'antigène sont exprimés uniquement par les cellules tumorales et absents des tissus sains vitaux. Les antigènes de ce type sont principalement d'origine virale, comme ceux d'EBV dans les lymphomes et du HPV dans les cancers du col utérin, ou des néoantigènes produits par des mutations ou des fusions chromosomiques comme Bcr-Abl dans le chromosome de Philadelphie dans la leucémie myéloïde chronique. La grande majorité des antigènes sont plutôt associés aux tumeurs, c'est-à-dire qu'ils sont exprimés plus fortement ou de manière anormale par les tumeurs comparativement aux tissus sains (Schmitt et al. 2015). Ceci amène un enjeu de toxicité « on-target/off-tumor », c'est-à-dire que toute immunothérapie ciblant un antigène associé aux tumeurs causera aussi des dommages aux tissus sains qui expriment cet antigène. Dans le cas des CAR-T visant CD19, ce problème est surmontable car les seules cellules saines exprimant cette protéine sont les lymphocytes B, qui sont des cellules non vitales. Les patients peuvent très bien vivre avec une aplasie complète des lymphocytes B en recevant des injections intraveineuses d'immunoglobulines régulièrement (Muhammad et al. 2017). La stratégie utilisée pour les CAR-T contre les tumeurs d'origine lymphocytaire B n'est donc peut-être pas directement applicable aux autres types de tumeurs puisque très peu d'antigène associé aux tumeurs sont présents uniquement sur des tissus sains non-vitaux (Sadelain et al. 2013; Larson et al. 2017).

Dans l'AML, comme dans beaucoup d'autres types de cancers, aucun antigène spécifique aux tumeurs n'a été identifié à ce jour. Les CAR-T développés ciblent des antigènes de surface associés aux tumeurs et ont donc tous des toxicités importantes liées à la cible, de type « on-target, off-tumor », en plus des CRS et CRES discutés plus tôt. La toxicité représente

un défi important à relever pour permettre une application plus large des CAR. Les solutions proposées le plus fréquemment pour surmonter la toxicité des CAR-T sont l'incorporation d'un gène « suicide » ou l'expression temporaire du CAR. Les gènes « suicide » les plus souvent utilisés sont le gène de la caspase 9 inductible et le CD20. Pour la caspase 9 inductible, une protéine chimérique est construite de telle sorte que l'administration d'une petite molécule entraîne la dimérisation de domaines caspase 9 qui provoquent l'apoptose des cellules. Pour le CD20, le traitement au rituximab, un anticorps anti-CD20, entraîne la déplétion de toutes les cellules exprimant CD20 par l'induction de la cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps (ADCC). Le EGFRt peut aussi être utilisé, de la même façon que CD20, avec l'anticorps le ciblant, le cetuximab. Ces gènes « suicide » permettraient aux cliniciens d'induire la mort de toutes les cellules CAR-T lors de la survenue d'effets secondaires mettant la vie du patient en danger. Cependant, cette solution ne fait que limiter les dégâts plutôt que de prévenir la toxicité. Une autre solution proposée est d'amener le gène CAR par un ARN messager qui a une durée de vie limitée et est progressivement perdu par les cellules T à mesure qu'elles se divisent (Maus and June 2016; Fan et al. 2017). Ces méthodes peuvent se révéler utiles mais elles amènent un autre problème qui est le manque de persistance des CAR-T. En effet, on sait que l'efficacité des CAR-T est directement dépendante de leur persistance *in vivo*. Elle est requise afin d'assurer une surveillance contre les rechutes et la maladie résiduelle (Muhammad et al. 2017; Kowolik et al. 2006; Robbins et al. 2004; Long et al. 2015).

Un autre des défis pour les CAR est l'évasion des cancers par la diminution de l'expression de l'antigène ou par la mutation de celui-ci. En effet, 20 à 30% des patients traités avec les CAR-T anti-CD19 ont développé des rechutes CD19-négatives (Ruella, Barrett, et al. 2016; Mejstříková et al. 2017). À l'avenir, les thérapies CAR-T seront probablement combinées pour viser plus d'un antigène afin de bloquer l'évasion. Ce genre de stratégie est déjà en développement pour les tumeurs d'origine B avec l'ajout d'un second CAR, ou d'un CAR bi-spécifique, visant CD20, CD22 ou CD123 (Zah et al. 2016; Wang et al. 2014; Muhammad et al. 2017; Ruella, Barrett, et al. 2016).

Finalement, le dernier défi auquel font face les CAR-T est l'épuisement cellulaire. Ce mécanisme naturel sert à protéger l'organisme d'une activation chronique des cellules T lors de

la présence à long terme d'un antigène tel que vu dans les infections virales chroniques ou les cancers. Il mène à la perte des fonctions cytotoxique et de la capacité de prolifération et de sécrétion de cytokines des cellules T. Il favorise aussi l'apoptose des cellules T. Dans les CAR-T, la signalisation tonique par le regroupement indépendant de l'antigène des ScFv cause une phosphorylation soutenue de la chaîne CD3 ζ qui peut entraîner l'épuisement cellulaire (Kasakovski et al. 2018). Aussi, l'expansions *ex-vivo* des cellules T par une longue stimulation de CD28 et CD3, lors de la manufacture des CAR-T, peut contribuer à ce phénotype d'épuisement (Long et al. 2015). L'épuisement est donc un autre facteur qui doit être rigoureusement contrôlé afin de maximiser la persistance des CAR-T *in vivo*.

1.8 Les antigènes pour l'immunothérapie dans la LMA

Jusqu'à maintenant, aucun antigène de surface spécifique aux blastes myéloïdes de la LMA n'a été décrit, une immunothérapie efficace pour la LMA semble donc être condamnée à être myélotoxique (Kenderian et al. 2015). Dû à son faible taux de mutations, la LMA produit très peu de néoantigènes (Beyar-Katz and Gill 2018). Tous les antigènes présentement en investigation pour le développement de CAR-T contre la LMA induisent donc, à divers degrés, une toxicité « on-target/off-tumor », principalement une myélotoxicité, car ce sont des antigènes associés aux tumeurs et non spécifiques aux tumeurs (Kenderian et al. 2015). Dans ce contexte, l'antigène idéal pour la LMA rencontrerait les critères suivants : 1) il serait exprimé par les cellules tumorales de LMA le plus fortement possible chez la majorité ou chez un nombre significatif de patients ; 2) son expression sur les cellules tumorales d'un patient donné serait homogène afin d'éviter la sélection des cellules négatives pour l'antigène ; 3) bien que non spécifique aux tumeurs, il serait exprimé par le moins de tissus sains possible et le plus faiblement possible ou les tissus sains qui l'exprimeraient seraient des tissus non vitaux ; 4) finalement, il serait essentiel dans la pathophysiologie ou la biologie de la LMA afin qu'il soit impossible aux cellules tumorales de s'en débarrasser pour résister à la thérapie (Fan et al. 2017; Atanackovic et al. 2016).

Plusieurs antigènes sont étudiés comme candidats pour la thérapie de la LMA aux CAR-T. Comme discuté précédemment, CD33 est le mieux décrit. Le risque de toxicité « on-target,

off-tumor » relié à cette cible est la myélosuppression par la lyse massive des HSC et, surtout, des progéniteurs myéloïdes. Par exemple, l'immunothérapie par GO induit l'internalisation de la calicheamicine dans toutes les cellules exprimant le CD33, incluant les cellules saines. La perte de ces cellules saines entraîne la toxicité observée lors de cette thérapie tel qu'une anémie grave ainsi qu'une aplasie persistante des neutrophiles et des plaquettes se manifestant par des hémorragies à répétition et une susceptibilité accrue aux infections.

CD123 est le deuxième antigène le plus étudié. En préclinique, il a fait ses preuves *in vitro* et *in vivo*. Comme CD33, il est largement exprimé par les blastes de LMA mais aussi par les cellules progénitrices hématopoïétiques normales, et donc induit également de la myélotoxicité. Cependant, ce dernier aspect est débattu dans la littérature avec des résultats contradictoires selon les études. Peu de données cliniques sont disponibles pour l'instant mais des essais cliniques sont en cours avec des anticorps et des CAR-T visant CD123. Les autres antigènes à l'étude incluent Lewis Y antigène, CCL1, CD38, CD7, FLT-3, NKG2D ligand, le récepteur β des folates, Wilms tumor 1 et CD44v6 (Buckley and Walter 2015; Fan et al. 2017; Laborda et al. 2017; Beyar-Katz and Gill 2018). Toutefois, aucune de ces cibles ne satisfait les critères de l'antigène idéal décrit précédemment.

1.9 Le concept de création d'antigène spécifique aux tumeurs par génie génétique

Depuis 2013, la technologie « clustered regularly interspaced short palindromic repeat » (CRISPR) nous permet d'invalider n'importe quel gène dans n'importe quelle cellule mammifère afin d'éliminer complètement son expression. La « CRISPR-associated protein 9 » (Cas9) est une endonucléase bactérienne qui sert naturellement de système immunitaire adaptatif aux bactéries en clivant l'ADN étranger introduit par les phages. Sa découverte a permis l'explosion du domaine du génie génétique en recherche en le rendant beaucoup plus accessible. La Cas9 bactérienne a été optimisée afin d'être utilisée en recherche dans l'édition génomique. Elle fonctionne en se complexant à un ARN guide qui s'apparie à une séquence complémentaire d'ADN génomique. La Cas9 reconnaît ensuite une séquence dite « protospacer adjacent motif » (PAM), le plus souvent un NGG, et fait une coupure double brin dans l'ADN, 3 nucléotides devant le PAM. Suite à la coupure double-brin, la cellule active un de ses deux

mécanismes de réparation, soit le « Non-Homologous end Joining » (NHEJ) ou le « Homology directed repair » (HDR). Le NHEJ est un type de réparation par la jonction des extrémités brisées. Cette méthode de réparation introduit des erreurs dans la séquence comme des insertions ou des délétions de nucléotides (indels). De façon aléatoire mais efficace, ces indels produisent des changements du cadre de lecture menant à la formation de codons stop prématurés dans 95% des cas et, donc, à la traduction de protéines tronquées qui seront dégradées. Le HDR est un autre type de réparation qui fonctionne en utilisant un brin d'ADN modèle contenant des séquences complémentaires aux séquences entourant le bris. L'ADN modèle utilisé naturellement par la cellule est l'autre allèle du gène. Cependant, bien que moins efficace, ce type de réparation peut être mis à profit en génie génétique afin d'introduire une séquence dans le génome à un endroit précis. Lors de la coupure par Cas9, on fournit un ADN modèle contenant la séquence de notre choix entourée par des séquences complémentaires au gène visé (Xia et al. 2018). Cette séquence sera utilisée comme patron pour réparer l'ADN selon notre intérêt.

Récemment, le groupe du Dr Saar Gill de l'Université de Pennsylvanie à Philadelphie a proposé le concept de création d'antigène spécifique aux tumeurs par génie génétique en utilisant la technologie CRISPR-Cas9. En effet, leur approche, développée pour la LMA, consiste à combiner des CAR-T anti-CD33 à une allogreffe de cellules souches hématopoïétiques dont le gène CD33 a été invalidé par la technologie CRISPR (Kim et al. 2016; Kim et al. 2018). Cette approche permet d'exploiter le potentiel thérapeutique de CD33 tout en contournant le problème de myélotoxicité. Leur groupe a démontré qu'une HSCT CD33⁻ peut reconstituer des souris et des macaques de façon équivalente à une HSCT non-modifiée. Aussi, la fonction et le phénotype des cellules myéloïdes et des HSC ne semble pas être affectée par l'invalidation du gène CD33. Finalement, ils ont pu démontrer que la HSCT CD33⁻ est résistante à des CAR-T autologues anti-CD33 et permet donc le traitement d'une LMA CD33⁺ sans induire de myélosuppression. Ils proposent un traitement où des cellules T et des HSC seraient prélevées d'un donneur sain. Les HSC seraient modifiées par CRISPR, afin d'invalider le gène du CD33, et greffées au patient LMA. Des CAR-T anti-CD33 seraient dérivés des T du donneur de façon standard et injectés au patient une ou plusieurs fois pour éliminer la maladie résiduelle.

1.10 Les virus AAV comme outil thérapeutique

Jusqu'à maintenant, les gènes CAR ont été majoritairement incorporés dans le génome des cellules T par transduction avec des lentivirus. Les lentivirus sont un type de rétrovirus dont fait partie le virus de l'immunodéficience humaine (VIH). D'un point de vue expérimental, la différence majeure entre les lentivirus et les rétrovirus est que seuls les premiers peuvent infecter des cellules quiescentes telles que les HSC. Les lentivirus utilisés en clinique et en recherche ont été modifiés pour des raisons de sécurité afin de les rendre infectieux mais non-répliquatifs. Ils sont fabriqués en laboratoire en transfectant certains gènes du VIH dans des cellules productrices HEK293T (Boroujeni and Gardaneh 2018; Jiang et al. 2015). Les lentivirus et les rétrovirus, par leur propriété intégrative, ont un potentiel de causer des modifications géniques toxiques ou cancérogènes en insérant des transgènes de façon aléatoire dans des gènes essentiels ou des gènes suppresseurs de tumeur (Zhang et al. 2017; Schmitt et al. 2015). De plus, les CAR insérés aléatoirement auront un niveau variable d'expression ou peuvent être non-transcrits selon le locus dans lequel ils se trouvent (Eyquem et al. 2017).

De leur côté, les « Adeno-Associated Virus » (AAV) sont des virus à simple brin d'ADN et ne causent aucune pathologie chez l'homme. En recherche, ils possèdent plusieurs avantages sur les lentivirus. Ils permettent d'obtenir des titres viraux plus élevés qu'avec les lentivirus. Contrairement aux lentivirus, ils requièrent un niveau de gestion du biorisque de base. La suppression du gène Rep de leur génome permet d'éliminer leur capacité de s'intégrer dans leur site de prédilection, le gène « Adeno-associated virus integration site 1 » (AAVS1) du chromosome humain 19. Ces AAV modifiés sont appelés rAAV et sont donc complètement non-intégratifs. Ils sont peu immunogènes et, comme les lentivirus, ils peuvent infecter des cellules quiescentes. Leur capacité d'encapsulation est, cependant, plus limitée que les lentivirus. La taille maximale est d'environ 4.5 kilobases (kb) alors que les lentivirus peuvent supporter jusqu'à 10-11 kb. (Naso et al. 2017; Bak and Porteus 2017; Penaud-Budloo et al. 2018). Les AAV sont sécuritaires *in vivo*. Ils sont déjà approuvés par la FDA pour le traitement de la dystrophie de la rétine génétique causée par les mutations de RPE65 et par l'Agence Européenne des Médicaments pour une déficience génétique en lipoprotéine lipase causant des pancréatites récurrentes (Kassner et al. 2018; Bennett et al. 2016; Smith and Agbandje-

McKenna 2018). Plus de 12 sérotypes d'AAV existent et ont différents tropismes. Le AAV2 est le plus commun et utilise le protéoglycan héparane sulfate comme récepteur. Ses co-récepteurs sont l'intégrine $\alpha_v\beta_5$ et le « fibroblast growth factor receptor 1 » (FGFR-1). Les AAV 5 et 6 utilisent, quant à eux, plutôt l'acide sialique comme récepteur (Seiler et al. 2006). Le choix du sérotype utilisé dépend du type cellulaire visé. Le groupe du Dr Matthew H. Porteus (Université de Stanford, États-Unis) a démontré que le AAV6 était très efficace pour transduire les HSC (Bak and Porteus 2017; Bak et al. 2017).

1.11 Le projet

Dans ce projet, nous voulons tirer parti des technologies CAR et CRISPR-Cas9 ainsi que du potentiel thérapeutique de CD33 en introduisant le gène CAR dans les cellules souches hématopoïétiques plutôt que dans les cellules T. Cette stratégie permettrait de surmonter le problème de myélotoxicité associé aux traitements visant CD33 en conférant aux HSC une résistance au CAR anti-CD33. Les CAR-HSC permettraient de surmonter plusieurs des défis propres aux CAR-T. Premièrement, ils permettraient une meilleure persistance *in vivo* et une diminution de l'épuisement cellulaire en fournissant une source continue de nouveaux CAR-T à long-terme. Les CAR-HSC pourraient aussi potentiellement diminuer la toxicité comme le CRS, le CRES et le SOS par la génération progressive des effecteurs CAR-T plutôt qu'un afflux massif momentané. Notre approche tirerait donc avantage d'une cible d'immunothérapie éprouvée en clinique tout en réduisant ses effets nocifs et en allongeant la fenêtre thérapeutique des CAR-T.

Pour ce faire, nous mettons à profit un promoteur T-spécifique, développé dans notre laboratoire par Aurélien Colamartino et Panojot Bifsha, qui permet l'expression d'un gène uniquement dans les cellules de type lymphocytaire T. Ce promoteur est présentement en instance de brevet. Sa séquence et son développement ne seront donc pas abordés dans ce mémoire. La spécificité du promoteur a déjà été investiguée et démontrée par Aurélien Colamartino (Manuscrit en préparation) (**Figure 1 & 2**). Elle ne sera donc pas non plus discutée plus amplement dans ce mémoire. Le CAR introduit dans les HSC sera placé sous la dépendance de ce promoteur afin de limiter son expression uniquement à la progéniture T. Puisque l'effet

de l'introduction du transgène CAR est uniquement bien décrit chez les T, nous voulons éviter l'expression de celui-ci dans d'autres types cellulaires, ce qui pourrait avoir des effets nocifs imprévisibles.

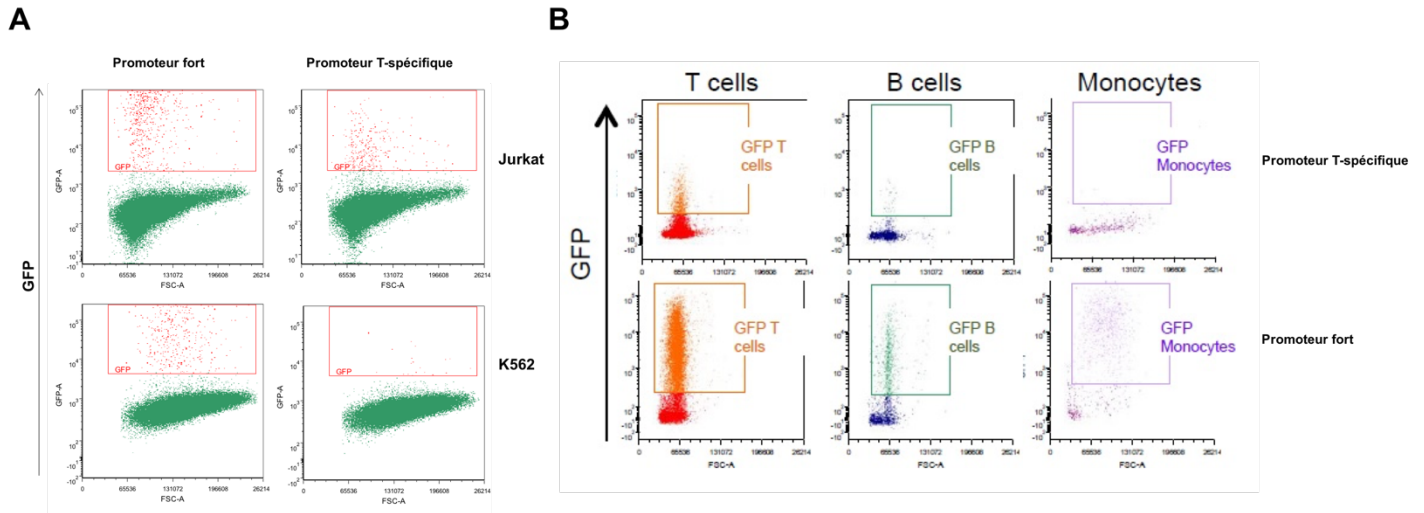
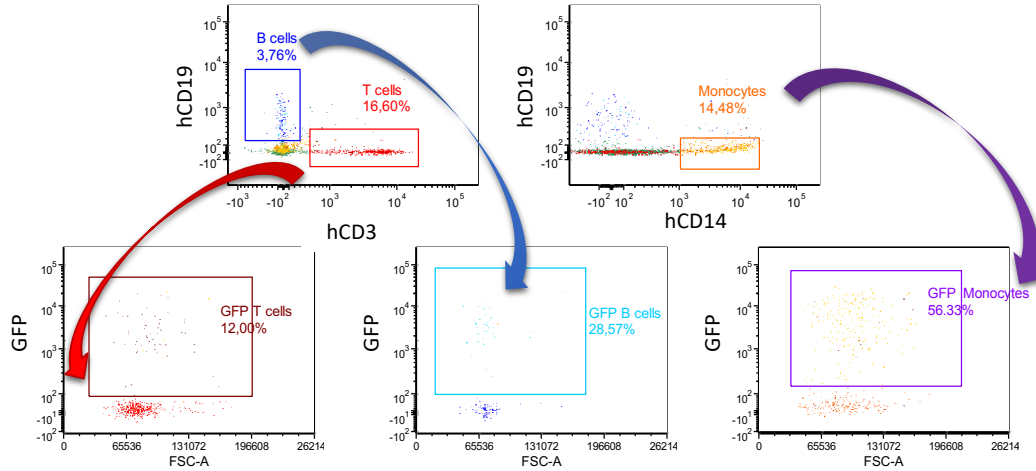


Figure 1 : Spécificité du promoteur T-spécifique (Tenh) *in vitro*. Des cellules ont été transduites avec un vecteur contenant la GFP sous le contrôle d'un promoteur fort, comme contrôle positif, ou du promoteur T-spécifique. Le niveau d'expression de la GFP est mesuré par cytométrie en flux et le seuil de positivité est déterminé par la comparaison avec des cellules non-transduites. **A.** Les cellules Jurkat sont une lignée lymphocytaire T et exprime la GFP avec les deux promoteurs. Les cellules K562 sont une lignée myéloïde et n'exprime pas la GFP sous promoteur T-spécifique. **B.** Des cellules mononuclées de sang périphérique (PBMC) de donneurs sains sont transduites puis marquées avec des anticorps. Les cellules T sont définies comme CD45⁺, CD3⁺ et CD19⁻. Les cellules B sont définies comme CD45⁺, CD3⁻ et CD19⁺. Les monocytes sont définis comme CD45⁺, CD19⁻ et CD14⁺. Seules les cellules T expriment la GFP sous promoteur T-spécifique mais un peu de bruit de fond est détecté dans les cellules B. Figure empruntée à Aurélien Colamartino.

A Promoteur fort



B Promoteur T-spécifique

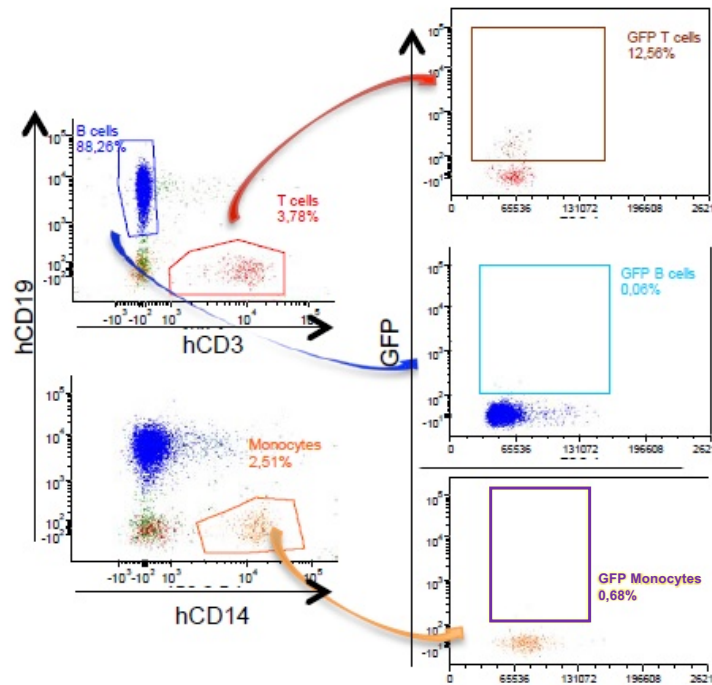


Figure 2 : Spécificité du promoteur T-spécifique (Tenh) *in vivo*. Des cellules souches hématopoïétiques (HSC), CD34⁺ et CD38⁻, de sang de cordon humain ont été transduites avec un vecteur contenant la GFP sous le contrôle **A.** d'un promoteur fort, comme contrôle positif, ou **B.** du promoteur T-spécifique. Elles ont ensuite été injectées dans des souris immunodéficientes NSG. La reconstitution du système immunitaire humain dans le sang périphérique marqué est montrée par cytométrie en flux. Le niveau d'expression de la GFP est mesuré par cytométrie en flux et le seuil de positivité est déterminé par la comparaison avec des cellules non-transduites. Toutes les fenêtres montrées sont issues des cellules CD45 humain⁺. Figure empruntée à Aurélien Colamartino.

Dans notre stratégie, le CAR sera introduit de façon non-aléatoire dans le génome des HSC afin de minimiser les risques de produire des changements génétiques délétères. À l'aide de la technologie CRISPR, nous ciblerons l'intégration du CAR sous promoteur T-spécifique dans le locus du gène de CD33 par HDR. Cette stratégie permettra un « knock-in/knock-out » en invalidant le gène de CD33 tout en introduisant un CAR anti-CD33 et son promoteur. Dans la stratégie du groupe du Dr Saar Gill, les HSC et les cellules T du donneur sont toutes deux modifiées génétiquement séparément, afin de produire, d'un côté, des CAR-T et, de l'autre, des HSC invalidés pour CD33 pour la greffe. Au contraire, dans notre stratégie nous pourrions, par une seule manipulation génétique, obtenir des HSC CD33⁻ et des CAR-T anti-CD33. Notre approche génétique est réalisée en collaboration avec Dr Fabien Touzot (Département de microbiologie, infectiologie et immunologie, Faculté de Médecine, Université de Montréal) qui est un spécialiste de l'édition génomique. Un autre des avantages de notre stratégie est que nous n'aurons pas à trier les cellules transduites et non-transduites. En effet, les CAR anti-CD33 élimineront les HSC et les cellules filles CD33⁺ n'ayant pas été transduites donc favoriseront un enrichissement des cellules CD33⁻/CAR anti-CD33 (**Figure 3**).

Le mode de livraison du CRISPR que nous voulons utiliser est basé sur les travaux du Dr Matthew H. Porteus (Université de Stanford, États-Unis) et repose sur les virus AAV. Le groupe du Dr Porteus a démontré que l'électroporation de la Cas9 en complexe avec l'ARN guide sous forme de ribonucléoprotéine (RNP) suivie d'une transduction avec un AAV6 contenant un ADN modèle permet une modification génomique par HDR efficace dans des HSC et des cellules T primaires humaines. Leur taux d'efficacité est de 20% dans les HSC, qui sont habituellement difficiles à modifier surtout avec HDR puisqu'elles ne se divisent pas. Les HSC conservent aussi leur potentiel souche et peuvent reconstituer une souris immunodéficente après la modification génétique (Bak and Porteus 2017; Bak et al. 2017). Finalement, malgré le risque de GvHD, nous viserons une allogreffe de HSC pour notre approche. En effet, la HSCT allogénique est plus sécuritaire pour les tumeurs hématologiques car le risque que le greffon contienne des cellules tumorales, qui mènent à une rechute, serait trop élevé avec une HSCT autologue.

Afin de développer un CAR anti-CD33, nous avons d'abord identifié un fragment ScFv (single-chain variable fragment) qui permettrait de cibler CD33 efficacement. Le ScFv est issu du fragment variable d'un anticorps et a pour rôle de former la liaison avec l'antigène. En recherchant dans la littérature, nous avons choisi d'utiliser le clone My96 puisqu'il a été démontré comme efficace en clinique sous forme d'anticorps avec le Gemtuzumab ozogamicin (Gamis et al. 2014) et dans des modèles précliniques sous forme de CAR-T (Kenderian et al. 2015). L'épitope reconnu se trouve sur le domaine extracellulaire V de CD33 (C D Godwin et al. 2017). Aussi, nous avons choisi d'utiliser un CAR 2^e génération contenant les domaines CD3 ζ et CD28 (abréviés 28z). Les CAR 2^e génération sont mieux décrits et sont déjà utilisés avec succès en clinique. Aussi, les CAR 28z sont reconnus pour être plus cytotoxiques bien que moins persistants que les CAR 4-1BB. Comme notre approche en elle-même pallie au problème de persistance par un renouvellement constant des CAR-T, nous émettons l'hypothèse que d'amener ces CAR plus cytotoxiques permettrait d'obtenir une efficacité augmentée.

Nous avons choisi le début de l'exon 2, qui code pour le domaine extracellulaire V de CD33, comme cible pour l'ARN guide CRISPR qui est aussi l'exon ciblé par le CAR anti-CD33 (C D Godwin et al. 2017). Ceci permet de garantir que toute cellule invalidée par le CRISPR ne pourra être ciblée par le CAR, assurant la protection des HSC contre le CAR. Aussi, nous souhaitons insérer le transgène CAR anti-CD33 en anti-sens par rapport au gène CD33 afin de réduire les chances que celui soit influencé par le promoteur naturel du CD33. Le CD33 n'étant pas exprimé par les cellules T, la régulation naturelle de ce gène pourrait nuire à l'expression du CAR dans les T. Ceci sera réalisé en inversant les séquences d'homologie pour le HDR, qui sont placées de chaque côté du CAR.

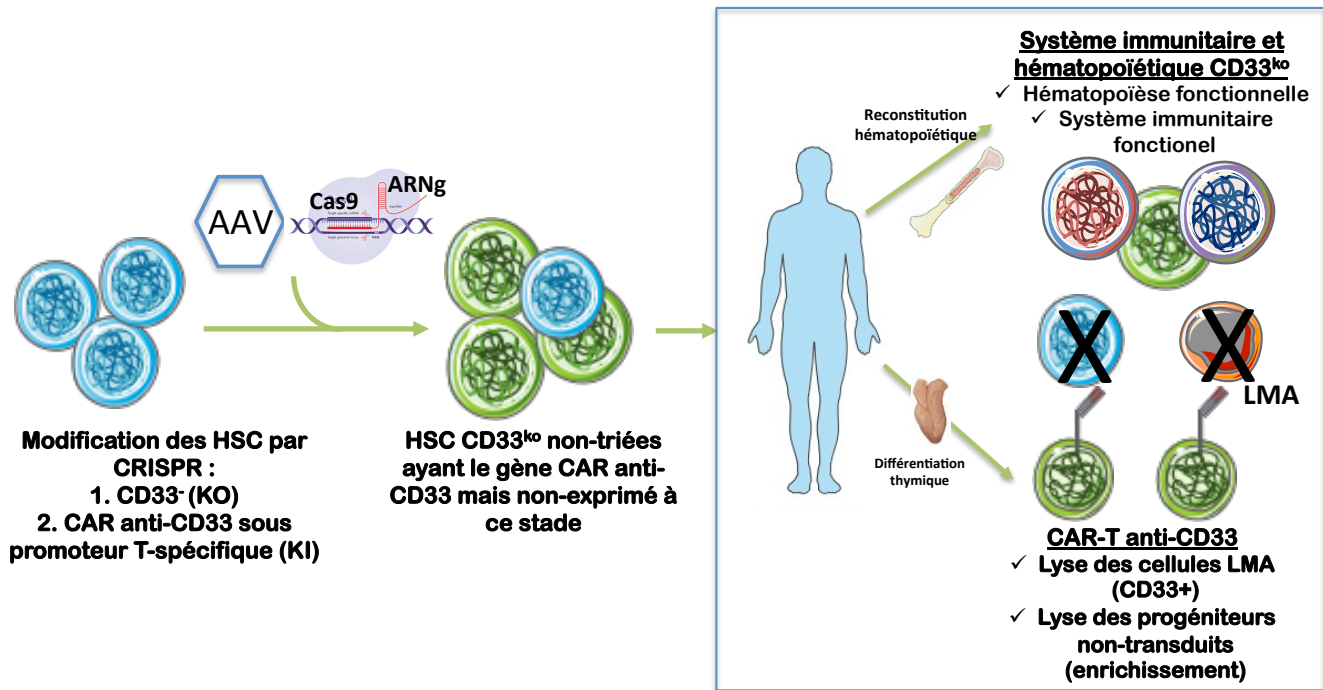


Figure 3 : Stratégie proposée pour le traitement de la LMA par CAR-HSC. Les HSC seront électroporées avec la Cas9 et le guide ciblant CD33 puis transduites avec l'AAV contenant avec le CAR anti-CD33. Les HSC non-triées seront greffées au patient et reconstitueront un système immunitaire fonctionnel. Les HSC produiront des cellules T qui exprimeront le CAR anti-CD33 et tueront les cellules LMA CD33⁺ ainsi que les cellules de la greffe non-transduites permettant l'enrichissement. Les HSC invalidées pour le CD33 seront résistantes au CAR.

1.12 Hypothèse et objectifs

Notre hypothèse principale est qu'une stratégie de « knock-out/knock-in » de CD33/CAR α CD33 dans des cellules souches hématopoïétiques serait un traitement efficace et sécuritaire pour la LMA. Nous pensons que l'introduction dans des HSC d'un CAR 28^e génération sous l'influence d'un promoteur T-spécifique permettra de générer de façon continue et progressive des effecteurs CAR-T efficaces qui seront persistants de par leur régénération constante. Les objectifs du projet à long-terme sont, premièrement, de démontrer l'efficacité d'un CAR anti-CD33 sous le contrôle du promoteur T spécifique *in vitro* et *in vivo*. Ensuite, nous voulons démontrer la faisabilité de notre stratégie « knock-out/knock-in » de CD33/CAR α CD33 dans des HSC à l'aide de AAV. Finalement, nous souhaitons investiguer le potentiel thérapeutique des HSC-CAR. Pour ma part, les objectifs de ma maîtrise étaient de, premièrement, faire la conception du CAR et tester son efficacité *in vitro*. Ensuite, je devais

tester la faisabilité d'utiliser notre promoteur T-spécifique dans le contexte d'un CAR. Finalement, mon dernier objectif était de concevoir et de tester la stratégie de CRISPR du CD33. Les travaux présentés dans ce mémoire sont faits à l'aide de lentivirus puisque c'est la méthode utilisée couramment au laboratoire. Une transition vers l'utilisation du AAV est en cours mais nécessite encore beaucoup de mise au point, c'est pourquoi l'aspect AAV du projet sera étudié dans un deuxième temps et l'approche y sera adaptée dans le futur.

Pour ce faire, nous construisons le CAR anti-CD33 2^e génération avec le ScFv du GO. Nous placerons celui-ci sous le contrôle du promoteur T-spécifique ou d'un promoteur fort comme contrôle positif. Nous testerons son expression dans des cellules lymphocytaires T. Ensuite, nous testerons sa fonctionnalité sous promoteur T-spécifique par des essais de cytotoxicité *in vitro* avec des cellules T primaires transduites et des cellules cibles CD33^{+/-}. Nous construisons les vecteurs pour le AAV avec les séquences d'homologie au CD33 permettant d'insérer le CAR en anti-sens par HDR. Nous optimiserons la production d'AAV. Nous modifierons les HSC par électroporation de RNP, Cas9 et guide ciblant l'exon 2 de CD33, puis transduction avec AAV6 contenant avec le CAR anti-CD33. Nous confirmerons *in vitro* la capacité des HSC à produire des CAR-T fonctionnels. Nous confirmerons leur capacité à reconstituer des souris immunodéficientes NSG irradiées en monitorant les populations immunitaires dans le sang périphérique et comparant avec des souris reconstituées avec des HSC non-modifiées. Finalement, après l'apparition de CAR-T dans le sang périphérique des souris humanisées, nous injecterons des lignées cellulaires de LMA CD33^{+/-} et luciférase⁺, qui mimeront une maladie résiduelle. La bioluminescence sera mesurée afin de déterminer la capacité des CAR-HSC à éliminer la LMA CD33⁺, comparativement à des souris humanisées avec des HSC-modifiées (**Figure 4**).

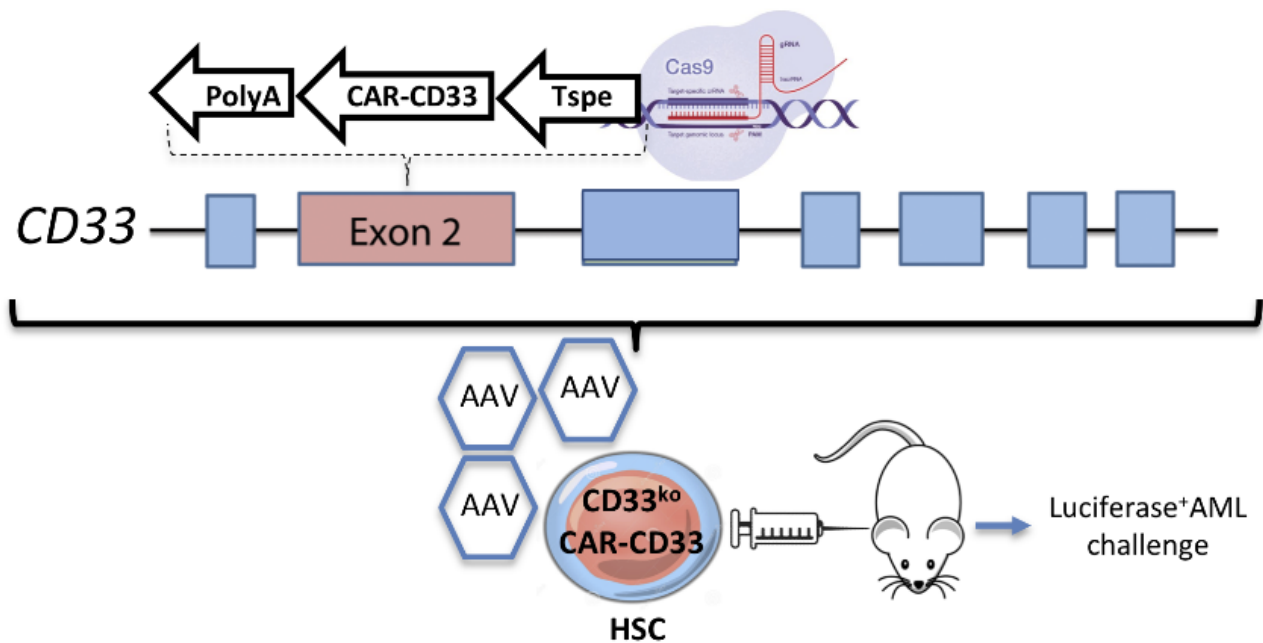


Figure 4 : Design expérimental pour mesurer l'efficacité des CAR-HSC. Les HSC seront électroporées avec la Cas9 et le guide ciblant CD33 sous forme de RNP puis transduites avec l'AAV6 contenant avec le CAR anti-CD33. Les séquences d'homologies seront conçues de tel sorte que les CAR sera inséré de façon anti-sens dans l'exon 2 du gène CD33. Les HSC non-triées seront injectées à des souris immunodéficientes NSG irradiées. La reconstitution sera suivie dans le sang périphérique. Après l'apparition des cellules CAR-T, la réponse à une injection de cellules de lignée LMA Luciferase⁺ sera monitorée par bioluminescence *in vivo*.

Chapitre 2 : Matériel et méthodes

Réactifs et Milieux

Le « Dubelcco's Phosphate-Buffered Saline » (D-PBS), le « Roswell Park Memorial Institute medium-1640 » (RPMI-1640), Opti-MEM I (1X) et le sérum foetal de veau (FBS) étaient tous de Gibco Life Technologies. Le « Dubelcco's Modified Eagle medium » (DMEM) et la pénicilline-streptomycine étaient de Multicell Wisent. Les milieux de culture cellulaire complets (DMEMc et RPMIc) ont été préparés en ajoutant 10% FBS et 100 IU/ml de pénicilline-streptomycine. Le FBS a subi une inactivation du complément par la chaleur à 56°C pour 30 minutes avant toute utilisation. Le Robosep buffer a été fait à partir de PBS 2% FBS et 2mM d'EDTA filtré (Ambion The RNA Company). Le milieu de cytotoxicité a été filtré et préparé frais avec du RPMI 2% FBS, 100 IU/ml de pénicilline-streptomycine et 20 U/mL d'IL2 (Proleukin aldesleukin, Prometheus Therapeutics et Diagnostics, Nestlé Health Science). Le CaCl₂ (Sigma Aldrich) 2M a été préparé dans de l'eau. La protamine sulfate (10mg/ml, Pharmaceutical Partners of Canada inc, DIN 02139537) a été diluée à 1 ug/uL dans du PBS.

Le Ficoll-PaqueTM PLUS était de GE Healthcare Bio-Sciences AB. Le bleu de trypan venait de chez Sigma Aldrich. Pour le lavage des Dynabeads (DynabeadsTM Human T activator CD3/CD28, Gibco, Thermo Fisher Scientific, lot 00596572), une solution de PBS 0,2% BSA (Sigma Aldrich) a été préparée et filtrée. L'anticorps anti-hCD33-phycoérythrine (PE) (clone WM53, # catalogue 303404) provenait de Biolegend et était utilisé à une dilution de 1 :100 dans du FACS buffer. Le 7-aminoactinomycine D (7-AAD) et le FITC Mouse anti-human CD19 (cat 555412, lot 04661) venaient de BD PharmingenTM. Le APC anti-human CD3 (clone UCHT1, cat 300439, lot B230114) et le PE anti-human CD3 (clone UCHT1, cat 300441, lot B238973) étaient de chez BioLegend. L'anticorps secondaire R-PE goat F(ab')₂ anti-human Fc (Jackson 109-116-098, lot 108997) était dilué à 1:10 dans du PBS stérile. L'anticorps isotype du CD33 était le PE mouse IgG1 kappa isotype Ctrl, clone MOPC-21 (cat 400112, BioLegend).

La Gateway LR clonase II Enzyme mix était de Thermo Fisher Scientific. La ligase ADN T3 et les enzymes de restrictions provenaient de New England Biolabs (NEB).

Le FACS buffer était fait à partir de PBS 2% FBS et 0,2g/L d'azide de sodium (Sigma Aldrich). Le TAE buffer (Tris base, Acide acétique, EDTA) 1X était filtré et contenait 40 mM de Tris base (Sigma Aldrich), 1 mM d'EDTA disodium (Ethylenediamine Tetraacetic acid, disodium

salt, dihydrate, electrophoresis crystalline, Fisher Scientific) et 20 mM d'acide acétique glacial (Fluka BioChemika) dilués dans de l'eau. Les gels d'agarose étaient faits de 1% d'agarose (agarose D1-LE, Multicell, Wisent) dans du TAE 1X avec 0,5 mg/ml de bromure d'éthidium (Sigma Aldrich) ou 1X de SYBR Safe DNA gel stain (Invitrogen). L'échelle de poids moléculaire utilisée était le 1 kb plus de Invitrogen par Thermo Fisher Scientific et était préparée comme recommandé par la compagnie.

Conception et clonage des ARNg

Des ARN guides pour le CRISPR ont été générés via l'outil E-CRISP (e-crisp.org) (Heigwer et al. 2014). La recherche a été faite dans l'organisme *Homo sapiens* GRCh38 avec le symbole de gène « CD33 » en utilisant les paramètres par défaut (médium). Les 4 premiers guides ont été sélectionnés (#28, 25, 77, 82 - **Tableau I**) et clonés dans un vecteur LentiCRISPRv2, gracieusement offert par Dr Feng Zhang (Departments of Brain and Cognitive Sciences and Biological Engineering, Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, États-Unis), qui contenait le gène de la Cas9 et une résistance à la puromycine. Le clonage des ARNg dans le vecteur a été fait selon le protocole du LentiCRISPRv2. Les oligos étaient conçus en ajoutant des nucléotides à la suite des séquences d'ARNg de manière à créer des bouts collants complémentaires au vecteur LentiCRISPRv2 digéré avec BsmBI et déphosphorylé avec la phosphatase FastAP (Fermentas). Deux oligos par guide contenant la séquence de l'ARNg et les nucléotides ajoutés (CACCG en 5' pour l'oligo 1 et CAAA en 5' avec un C en 3' pour l'oligo 2) ont été commandés chez Integrated DNA technologies (IDT) (**Tableau I**). Pour chaque guide, les oligos 1 et 2 ont été hybridés et phosphorylés avec la T4 ligase (NEB) pour 30 minutes à 37°C, 5 minutes à 95°C puis en diminuant la température jusqu'à 25°C à 5°C par minute. Les fragments hybridés étaient dilués à 1:200 et liés au vecteur, préalablement digéré et déphosphorylé, par une ligation de 10 minutes à température pièce avec la Quick Ligase de NEB. Le produit était cloné dans des bactéries Stbl3 de Invitrogen.

Tableau I : Séquences des ARN guides pour le CRISPR de CD33

Guide	Séquence génomique	Séquences des oligos 1 et 2
ARNg #25	5' - GTCTGAGGAAGCAGCTTCCA NGG - 3'	#1 : 5' - <u>CACCG</u> GTCTGAGGAAGCAGCTTCCA #2 : 5' - <u>AAAC</u> TGAAGCTGCTTCCTCAGAC <u>C</u>
ARNg #28	5' - GTGGGCAGGTGAGTGGCTGT NGG - 3'	#1 : 5' - <u>CACCG</u> GTGGGCAGGTGAGTGGCTGT #2 : 5' - <u>AAAC</u> ACAGCCACTCACCTGCCAC <u>C</u>
ARNg #77	5' - GGCCGGGTCTAGAGTGCCA NGG - 3'	#1 : 5' - <u>CACCG</u> GGCCGGGTCTAGAGTGCCA #2 : 5' - <u>AAAC</u> TGGCACTCTAGAACCCGGCC <u>C</u>
ARNg #82	5' - GACAACCAGGAGAAGATCGG NGG - 3'	#1 : 5' - <u>CACCG</u> GACAACCAGGAGAAGATCGG #2 : 5' - <u>AAAC</u> CCGATCTTCTCCTGGTTGTC <u>C</u>

Conception et clonage du CAR anti-CD33

Le fragment ScFv My96 (**Annexe A**) a été commandé sous forme de gBlocks chez IDT. Un PCR utilisant les amorces Xho1-My96_aCD33_scFv-Fwd et MfeI-My96_aCD33_scFV-Rev contenant en 5' la séquence de reconnaissance des enzymes de restriction XhoI et MfeI a été effectué sur celui-ci (**Tableau II**). L'amplicon mesurait 827 bp. Les PCR étaient faits avec la polymérase Q5 High-fidelity 2X Master Mix de NEB selon le protocole du fabricant. Les amorces étaient commandées chez IDT, resuspendues à 100 uM dans de l'eau et utilisées à 20uM. Les Tm étaient déterminés à l'aide du logiciel SnapGene de GSL Biotech LLC. La machine utilisée était la Proflex PCR system de Life Technologies. Les fragments CD28 et CD3z utilisés ont été gracieusement offerts par Dr Rimas J Orentas (Seattle Children's Research Institute, États-Unis) et avaient déjà été clonés dans des vecteurs contenant un ScFv ciblant une autre molécule que CD33 (CD22) avant mon arrivée au laboratoire. La substitution du ScFv dans le vecteur pENTR1a CAR CD22 28z a été faite par digestion avec les enzymes MfeI-HF et XhoI (NEB) puis ligation ce qui permettait de créer le vecteur pENTR1a CAR CD33 28z. La ligation était faite avec la ligase ADN T3 (NEB) selon le protocole fourni par la compagnie. Ensuite, le promoteur T-spécifique (Tenh) a été ajouté en amont de la même manière en digérant XhoI et StyI-HF (NEB). La séquence promotrice avait déjà été amplifiée et clonée dans un vecteur avant mon arrivée au laboratoire par un étudiant au doctorat (Aurélien Colamartino). L'insert Tenh-CARCD33-28z résultant a été transféré par LR clonase du plasmide d'entrée (pENTR1a, Thermo Fisher Scientific) au vecteur de destination (pHRSIN pDest construit à partir du pDest, Thermo Fisher Scientific, et pHRSIN SFFV, gracieusement offert par Dr Els Verhoeyen, ENS de Lyon), contenant les gènes viraux nécessaires à la production virale. En

parallèle, le promoteur fort (UCOE-SSFV) a été ajouté en transférant par LR l'insert CARCD33-28z dans le vecteur pHRSIN-UCOE-SFFV-pDest-reverse (**Figure 5**). Les vecteurs finaux étaient vérifiés par digestion enzymatique par XhoI et par séquençage.

Tableau II : Séquences des amorces utilisées pour l'amplification du ScFv My96

Amorce	Séquence	Tm (°C)
XhoI-My96_aCD33_scFv-Fwd	5'-GCGGCCTCGAGATGGCCCTGCCTGTGACA	72
MfeI-My96_aCD33_scFv-Rev	5'-GGCGCCAATTGATGACACGGTCACGGT	69

Bactéries et ADN

Les vecteurs pENTR1a ont été clonés dans des bactéries compétentes DH5 α de Thermo Fisher Scientific selon le protocole fourni et sélectionnés par kanamycine (Sigma Aldrich). Les vecteurs pHRSIN pDest ont été clonés dans des bactéries chimiocompétentes Stbl (NEB) en suivant le protocole fourni par la compagnie et sélectionnés par ampicilline (Sigma Aldrich) ou carbénicilline (Sigma Aldrich). Les vecteurs étaient purifiés avec les kits Miniprep de QIAGEN ou Maxiprep de Invitrogen suivant le protocole des compagnies. L'ADN génomique des cellules était extrait en utilisant le kit DNeasy blood and tissue (QIAGEN) selon le protocole du fabricant (« Purification of Total DNA from Animal Blood or Cells, Spin-Column Protocol », p.25 du manuel). L'ADN était quantifié via un appareil Nanodrop ND-1000. Le séquençage était fait par le Centre d'Innovation de l'Université McGill et Génome Québec.

Culture cellulaire

Les cellules de lignées LMA, HL60 et THP1, étaient cultivées dans du RPMIc. Les THP1 et les HL60 étaient de chez ATCC. Les 293T étaient cultivées dans du DMEMc et provenaient de chez ATCC. Les Jurkat provenaient de ATCC et étaient cultivées dans du RPMIc. Les cellules étaient congelées dans du FBS 10% DMSO (Dimethyl Sulfoxide, Fisher Scientific).

Production virale

À J0, 24 millions de cellules 293T étaient mises en culture réparties également dans 12 pétris de 10 cm avec du milieu DMEMc. L'après-midi du J1, douze mélanges d'ADN étaient préparés en combinant 7 μ g du vecteur d'intérêt, 7 μ g du vecteur pPAX2 (Addgene), 4 μ g du vecteur d'enveloppe VSV-G (Addgene) et 62.5 μ l de CaCl₂ 2M puis en complétant le volume à 500 μ l. Ensuite, chaque mélange d'ADN était ajouté goutte-à-goutte à 500 μ l de HBS 2X (Sigma Aldrich) sur le vortex. Après une incubation de 20 minutes à température pièce, le mélange était, finalement, distribué goutte-à-goutte sur les 293T. Le matin du J2, le milieu des 293T était changé pour 5 ml de DMEMc frais. L'après-midi du J3, le milieu des 293T était récolté puis centrifugé à 2000 rpm pendant 5 minutes. Le milieu était, ensuite, séparé en deux et déposé avec délicatesse sur 7 ml de PBS 20% sucrose (Bio Basic Canada inc.) dans des tubes d'ultracentrifugation. Les tubes étaient centrifugés à 28 000 rpm pendant 1 heure à 4 °C dans

une ultracentrifuge Himac CP 90 NX Hitachi avec un « swinging bucket » rotor P28S. Pour finir, le surnageant était retiré et le culot était séché, solubilisé dans 1 ml de milieu Opti-MEM puis aliquoté pour être congelé à -80°C.

Titration virale sur Jurkat

Les Jurkat étaient comptées au bleu de trypan et mis en culture à 40 000 cellules dans 100 ul de RPMIc dans une plaque de 24-puits contenant déjà 100 ul de RPMIc par puit. Parallèlement, le concentré de virus était dilué en ajoutant 5 ul de virus dans 495 ul de RPMIc, ce qui correspond à la dilution 1. Ensuite, des dilutions en série étaient faites dans 1 mL de RPMIc pour obtenir les dilutions 1:10, 1:100 et 1:1000. Puis, 100 ul de chaque dilution était ajouté aux puits en triplicatas. Un triplicata était aussi fait en ajoutant 100 ul de RPMIc sans virus afin de servir de 0. La plaque était incubée à 37°C. Le lendemain, 700 ul de RPMIc était ajouté à chaque puit. Trois jours après l'addition de virus, les cellules étaient resuspendues et transférées dans des tubes. L'expression du CAR anti-CD33 était mesurée en cytométrie en flux. Le marquage était fait avec une protéine chimérique siglec-3/CD33-Fc humaine recombinante (R&D Biosystems). Le stock était resuspendu à 100 ug/ml dans du PBS stérile. La protéine était diluée 1:100 dans du FACS buffer et incubée avec les cellules pour 30 minutes. Après un lavage au FACS buffer, l'anticorps secondaire R-PE goat anti-hFc était ajouté à une dilution 1:1000 et incubé pour 30 minutes. Finalement, les cellules étaient lavées au FACS buffer avant l'acquisition. Pour chaque tube, 10 000 singlets étaient acquis. Le calcul du titre était fait avec les dilutions dont le taux de transduction se situe entre 3-33% et selon la formule suivante :

(# de cellules (40 000)) X (% de positivité par rapport au 0) X (Facteur de dilution (1-1000))

Cytométrie en flux

Les échantillons marqués étaient passés sur un appareil BD Canto. Pour l'analyse des données, les cellules étaient d'abord sélectionnées selon leur propriété physique avec les paramètres SSC-A et FSC-A. Ensuite, les doublets étaient exclus sur le graphique du FSC-H en fonction du FSC-A. Les cellules vivantes étaient sélectionnées sur la base de l'absence de positivité au 7-AAD.

Génération des clones d'AML CD33 KO et Luciférase⁺-GFP⁺

Les cellules HL60 ou THP1 étaient comptées au bleu de trypan. Dans une plaque de 96-puits, 500 000 cellules étaient mises en culture dans 100 ul de milieu RPMIc avec 8 ug/ml de protamine sulfate et 50 ul de concentré de virus CRISPRv2 ou pHR SIN UCOE SFFV Luciférase-GFP. La plaque était centrifugée à 800g pendant 1h puis incubée à 37°C pour deux jours. Dans le cas de CRISPRv2, les cellules étaient ensuite sélectionnées pendant 5 à 7 jours avec 0.2 ug/ml (pour les HL60) et 5 ug/ml (pour les THP1) de puromycine (Santa Cruz Biotechnologies). Pour le test d'efficacité des ARN guide, 500 000 THP1 ont été transduites avec 500 ul de solution virale non-concentrée et sélectionnées pendant 5 jours à la puromycine. Des clones étaient dérivés de la population de cellules transduites avec le guide ARN le plus efficace (CRISPRv2 ARNg#77) et de celle transduite avec le vecteur pHR SIN UCOE SFFV Luciférase-GFP par triage de cellules uniques au BD FACS Aria. Pour ce faire, les cellules étaient resuspendues dans du Robosep buffer, marquées à l'anti-hCD33-PE (Biolegend) pendant 30 minutes puis lavées avec du Robosep buffer. Les cellules étaient triées, en fonction de leur expression de CD33 ou de GFP, dans une plaque de 96-puits à fond rond contenant 75 ul de FBS par puit. Après le tri, 100ul de RPMIc était ajouté à chaque puit et les cellules étaient incubées pendant 2 semaines à 37°C avant d'être vérifiées.

Essais T7 et séquençage des clones AML CD33 KO

L'ADN génomique des cellules CRISPR et non-CRISPR était extrait comme décrit ci-haut. Une PCR était faite sur le locus de CD33 autour du site ciblé par l'ARNg #77. Le produit total mesurait 514 bp et les amorces étaient placées 137 bp avant le site de l'ARNg et 353 bp après celui-ci (**Tableau III**). Pour cette PCR, la réaction était montée avec la Platinum Taq DNA polymérase High Fidelity (Invitrogen), 50 mM MgSO₄ (Invitrogen) et 1 mmol de dNTPs (Invitrogen) en suivant le protocole du fabricant. L'essai T7 était réalisé en incubant 10 ul du produit PCR avec 2 ul de NEB2 buffer (NEB) et 7 ul d'eau. Le mélange était incubé à 95°C pour 1 minute puis à des températures descendantes jusqu'à 85°C à 2°C/seconde et jusqu'à 4°C à 1°C /seconde. Un microlitre d'endonucléase I T7 (NEB) était ajouté à la réaction qui était incubée à 37°C pour 30 minutes. La réaction était migrée sur gel d'agarose pour visualisation. Le taux d'indels était quantifié à l'aide du logiciel Image J (National Institutes of Health, États-

Unis) en divisant l'intensité du signal des bandes introduites par la coupure sur le total de l'intensité de toutes les bandes de l'échantillon.

Pour l'identification des mutations introduites, le séquençage des clones CD33 KO et WT a été fait en effectuant un PCR sur l'ADN génomique des cellules CRISPR et non-CRISPR. Les amorces utilisées pour le PCR étaient Nest-CD33-77-Fwd et Nest-CD33-77-Rev. Le produit a été envoyé au service de séquençage avec les amorces CD33-T7-Fwd et CD33-T7-Rev (**Tableau III**).

Tableau III : Séquences des amorces utilisées pour l'amplification

Amorce	Séquence
CD33-T7-Fwd	5'-CTGGGAGGGGTTTAGGG
CD33-T7-Rev	5'-CCACAGAAATGCAGAAGGG
Nest-CD33-77-Fwd	5'-CCTACCTCCCTCTGTGCC
Nest-CD33-77-Rev	5'-TTGAAGAAACGTCTGCACCTC

Transduction des cellules T primaires

Un tube de sang (10 ml) a été prélevé de donneurs sains conformément au protocole approuvé par le comité d'éthique (CER#3527). Pour l'isolation des PBMC, le sang était mélangé à un volume équivalent de PBS 0.6% citrate. Le mélange était délicatement déposé sur 15 mL de Ficoll-Paque dans des tubes de 50 ml. Les tubes étaient centrifugés à 400 g pendant 30 minutes à 6 d'accélération et 1 de décélération. L'interface était transférée dans un nouveau tube et lavé avec 35 mL de PBS. Les PBMC étaient culottées par centrifugation 12 minutes à 400 g puis resuspendues dans 10 mL de Robosep buffer. Les PBMC isolées étaient comptées par cytométrie en flux avec des billes de comptage (Invitrogen) et un marquage 7-AAD, anti-CD3-APC et anti-CD19-FITC. Les cellules T étaient purifiées avec le kit « EasySepTM negative selection Human T Cell Enrichment » de Stemcell Technologies selon le protocole fourni. Les cellules T purifiées étaient comptées et la pureté était mesurée par cytométrie en flux avec le même marquage que précédemment. Cinq cent mille (500 000) cellules T étaient ensuite mises en culture dans une plaque de 12-puits dans 900 ul de RPMIc avec 30 U/mL d'IL2 et 500 000

Dynabeads (ratio cellules:billes de 1:1) pendant 8 jours au total. Les Dynabeads étaient lavées et resuspendues selon le protocole du fabricant. Le lendemain de la purification, les cellules T étaient transduites par lentivirus avec le vecteur contenant le CAR et 8 ug/ml de protamine sulfate. La MOI utilisée était de 17 pour le virus avec promoteur fort et de 6 pour le virus avec promoteur T-spécifique. De l'IL2 était ajouté afin de ramener la concentration à 30 U/mL. Du RPMIc 30 U/mL d'IL2 frais était ajouté à la culture tous les 2 ou 3 jours et les cellules étaient transférées dans des 6-puits lorsque la confluence atteignait environ 80%. Les cellules étaient incubées au moins 3 jours avant de vérifier l'expression du transgène. Le taux de transduction était mesuré par cytométrie en flux avec la protéine chimérique siglec-3 comme décrit précédemment.

Essais de cytotoxicité

Les cellules cibles étaient marquées la veille au PKH26 (Sigma Aldrich, PKH26 Red Fluorescent Cell Linker Kit for General Cell Membrane Labeling, PKH26GL-1KT). Pour ce faire, 2 millions de cellules étaient lavées 2 fois dans 10 mL de RPMI seul (sans FBS) puis resuspendues dans 100 ul de diluant C (Sigma Aldrich). Cent (100) ul de PKH26 dilué dans du diluant C à 1:124 était ajouté et le mélange était incubé 10 minutes à température ambiante. La réaction était arrêtée par l'ajout de 200 ul de FBS et une incubation de 1 minute à température ambiante. Les cellules étaient lavées deux fois avec 1 mL de RPMI seul. Les cellules étaient resuspendues dans 4 mL de RPMIc et mise en culture dans des plaques de 6-puits. Le lendemain, les cibles étaient centrifugées à 400g pour 5 minutes puis resuspendues dans 2 ml de milieu de cytotoxicité fraîchement préparé. En parallèle, après 8 jours de culture, les cellules T transduites étaient centrifugées 10 minutes à 400g puis resuspendues dans 5 ml de milieu de cytotoxicité. Les cellules T et cibles étaient ensuite comptées en duplicatas par cytométrie en flux avec les billes de comptage et un marquage 7-AAD et CD3-PE. Les cibles étaient diluées à une concentration de 100 000 cellules/mL dans le milieu de cytotoxicité et 100 ul/puit était mis en plaque de 96-puits à fond rond (10 000 cibles par puit). Les cellules T étaient diluées à la concentration nécessaire pour le plus haut ratio (400 000 cellules/mL pour un ratio effecteur:cible de 4:1) dans le milieu de cytotoxicité. Ensuite, des dilutions en série étaient faites pour chacun des ratios. Pour chaque ratio et chaque cible, 100 ul d'effecteurs étaient ajoutés, en triplicatas, à la plaque de 96-puits contenant les cibles. Cent (100) ul de milieu de cytotoxicité

était utilisé pour faire un triplicata de cibles seules. La plaque était centrifugée à 200g pour 1 minute et placée à 37°C pour la nuit. Après une incubation de 24h, 1ul de 7-AAD par puit était ajouté. Les cibles étaient comptées au BD Fortessa HTS, en acquérant un volume constant pour chaque puit, et leur viabilité était mesurée. Le calcul de la lyse était fait en comparant le nombre de cibles viables incubées seules à celui des cibles viables incubées avec les effecteurs pour chaque ratio.

Statistiques

Les valeurs sont présentées comme des moyennes \pm SEM. La signification statistique a été déterminée par des t-test à l'aide du logiciel GraphPad Prism. Les graphiques à barres ont également été réalisés avec GraphPad Prism.

Chapitre 3 : Résultats

3.1 CAR et effecteurs

Le CAR anti-CD33 2^e génération a été cloné dans des vecteurs lentiviraux pHRSIN en aval de deux promoteurs distincts, soit fort (UCOE-SFFV) ou T-spécifique (Tenh). Le promoteur fort servait de contrôle positif pour le promoteur T-spécifique à l'étude. La vérification des vecteurs clonés a été faite de deux façons, par digestion enzymatique et par séquençage, afin de s'assurer d'avoir le bon produit. Les vecteurs ont été digérés par enzyme de restriction et migrés sur gel afin de comparer le patron de digestion obtenu à celui prédit (**Figure 6a**). Le ScFv anti-CD33 My96 digéré avec MfeI et XhoI permettait d'obtenir la bande attendue à 811 pb mais les bandes de 10 pb et 6 pb étaient trop petites pour être visualisées (**Figure 6b**). Le pENTR Tenh CD33 28z digéré avec SalI et BglII donnait les deux bandes attendues à 3897 pb et 705 pb (**Figure 6c**). Une troisième bande était aussi visible autour de 4600 pb, ce qui correspondait au vecteur linéarisé par une seule des deux enzymes. Le patron obtenu par digestion avec XhoI permettait de confirmer que les vecteurs pHRSIN Tenh CAR anti-CD33 28z et pHRSIN UCOE SFFV CAR anti-CD33 28z avaient été générés avec succès. Des bandes étaient visualisées à 8542 pb et 2242 pb pour le pHRSIN Tenh CD33 28z et à 8981 pb et 2168 pb pour le pHRSIN UCOE SFFV CD33 28z (**Figure 6d**). Le séquençage confirmait aussi que la séquence des inserts correspondait à celle attendue. Les vecteurs validés ont été encapsidés dans des lentivirus permettant d'infecter des cellules humaines.

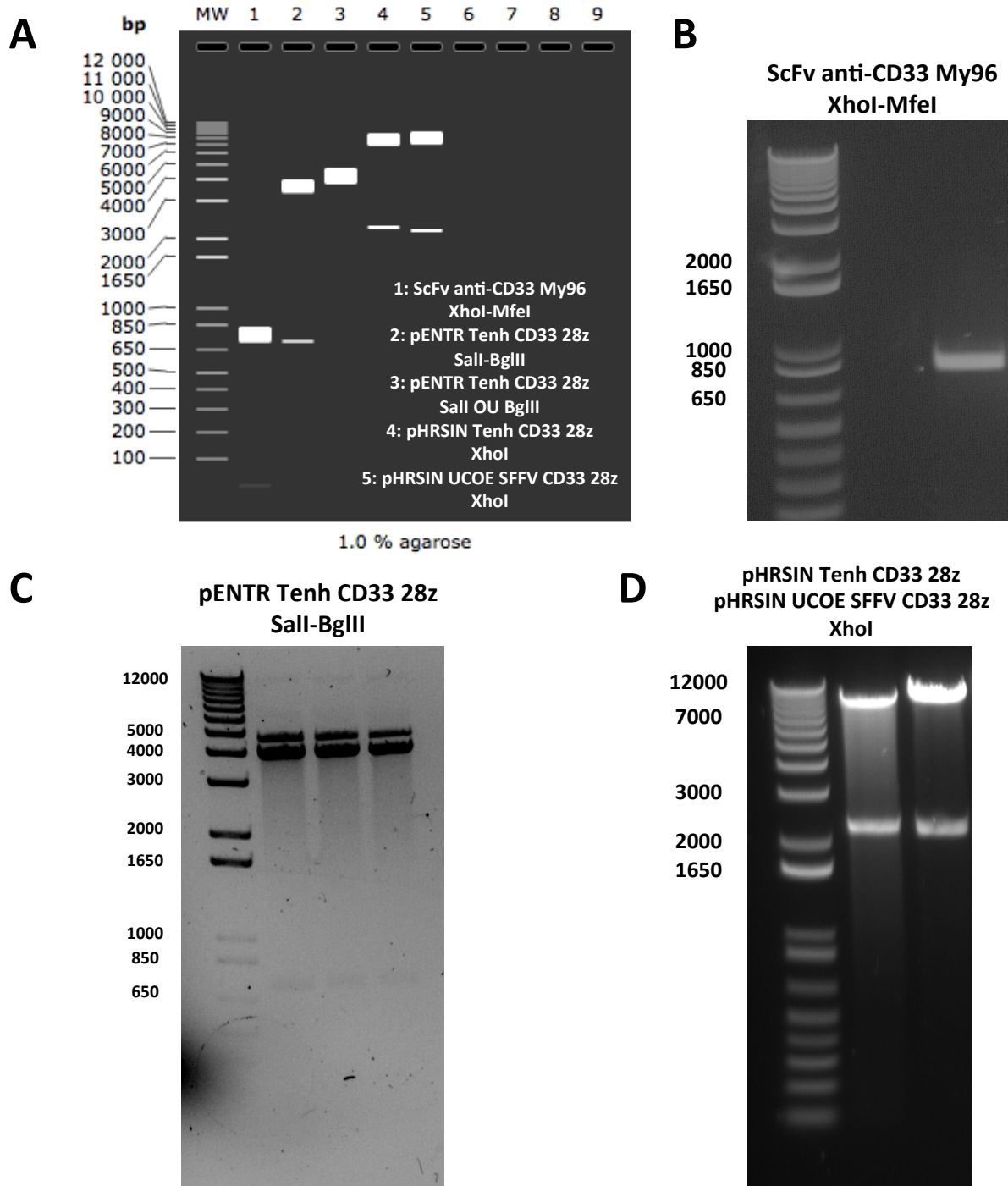


Figure 6 : Clonage des vecteurs CAR CD33 28z. **A.** Les patrons prédits par le logiciel SnapGene. **B.** le gBlock ScFv anti-CD33 My96 a été digéré avec XhoI et MfeI. **C.** Le pENTR Tenh CD33 28z a été digéré avec Sall et BglII. **D.** Les pHRSIN Tenh CD33 28z et pHRSIN UCOE SFFV CD33 28z ont été digérés avec XhoI.

Nous voulions ensuite tester la construction CAR quant à sa capacité de produire une protéine qui serait exprimée à la surface des cellules primaires humaines et capable de lier le CD33 humain. Pour ce faire, nous avons transduit des cellules T primaires de donneurs sains avec des lentivirus codant pour la séquence du CAR anti-CD33 28z sous promoteur fort (UCOE-SFFV). Les cellules T ont été isolées de PBMC par immunomagnétisme par sélection négative afin de préserver leur phénotype. Les cellules T (CD3⁺) obtenues après purification étaient pures à $96,5 \pm 0,4$ % (N=6) avec pratiquement pas de contamination de lymphocytes B (CD19⁺) (**Figure 7**). Suite à la purification, les cellules T ont été activées par stimulation de leur CD3 et CD28 (Dynabeads) afin de les rendre plus permissives au virus et de les amplifier. Quelques jours après la transduction par lentivirus, l'expression du CAR a été mesurée en utilisant un CD33 soluble (siglec-3) couplé à un fragment Fc suivi d'un marquage secondaire par un anticorps anti-Fc couplé à un fluorochrome PE. Le taux de transduction moyen pour 3 donneurs était de $94,6 \pm 1,2$ % (N=7). On peut également voir que l'anticorps secondaire était spécifique puisque très peu de positivité était détectée lorsque les cellules transduites ou non y étaient exposées en l'absence de CD33 soluble (**Figure 8**). Ce résultat nous indiquait, premièrement, que le transgène était intégré dans le génome des cellules, de façon stable, grâce aux « Long Terminal Repeats » (LTRs) du vecteur lentiviral, puisqu'il était toujours exprimé 4 jours après la transduction. Ensuite, il confirmait que la construction CAR permettait bien la transcription d'un ARNm stable grâce à la queue polyA et permettait la traduction de la protéine correctement repliée et son exportation à la membrane grâce au peptide signal et au domaine transmembranaire. Également, le type de marquage utilisé, un CD33 soluble, démontrait une certaine fonctionnalité de la protéine CAR, car il prouvait que celle-ci était bien capable de lier une molécule de CD33.

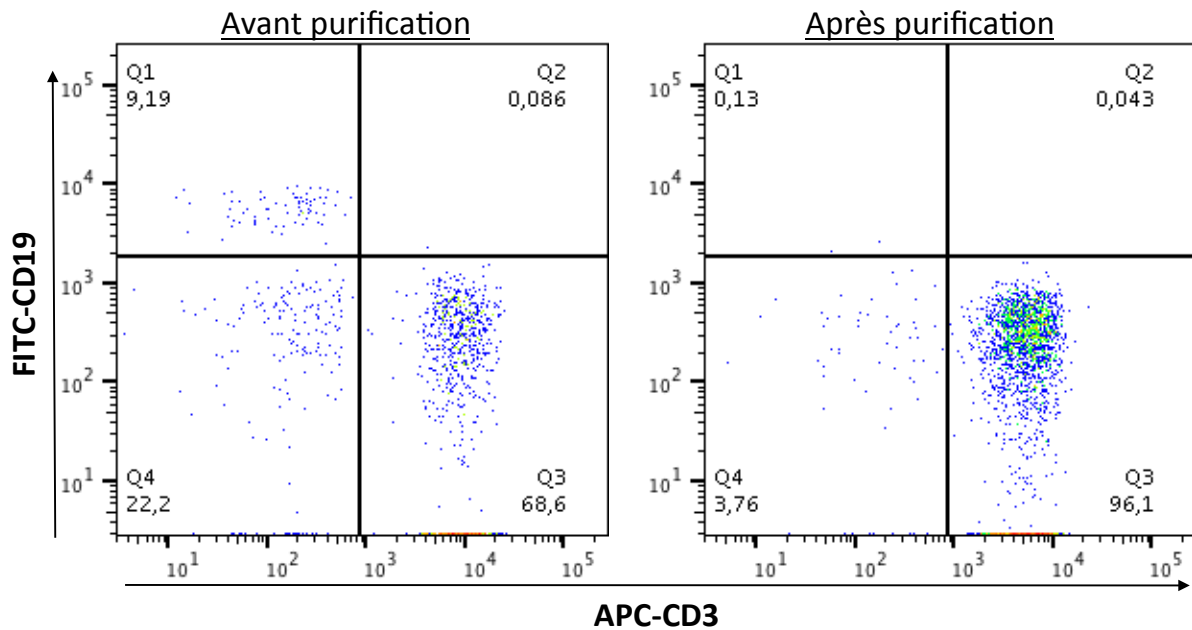


Figure 7 : Purification des cellules T à partir de PBMC de donneur sain. Les PBMC étaient isolées par Ficoll. La purification des cellules T était faite avec le kit « EasySep™ negative selection Human T Cell Enrichment » de Stemcell Technologies par sélection négative aux billes immunomagnétiques. Les cellules étaient comptées par cytométrie en flux avant et après la purification avec un marquage anti-CD3-APC et anti-CD19-FITC. Les cellules obtenues après la purification étaient mises en culture. La purification permettait d'augmenter la pureté des cellules T de 69% à 96% et d'éliminer pratiquement tous les lymphocytes B. Cette figure est un exemple représentatif de 6 expériences indépendantes faites à partir d'échantillons de 3 donneurs différents.

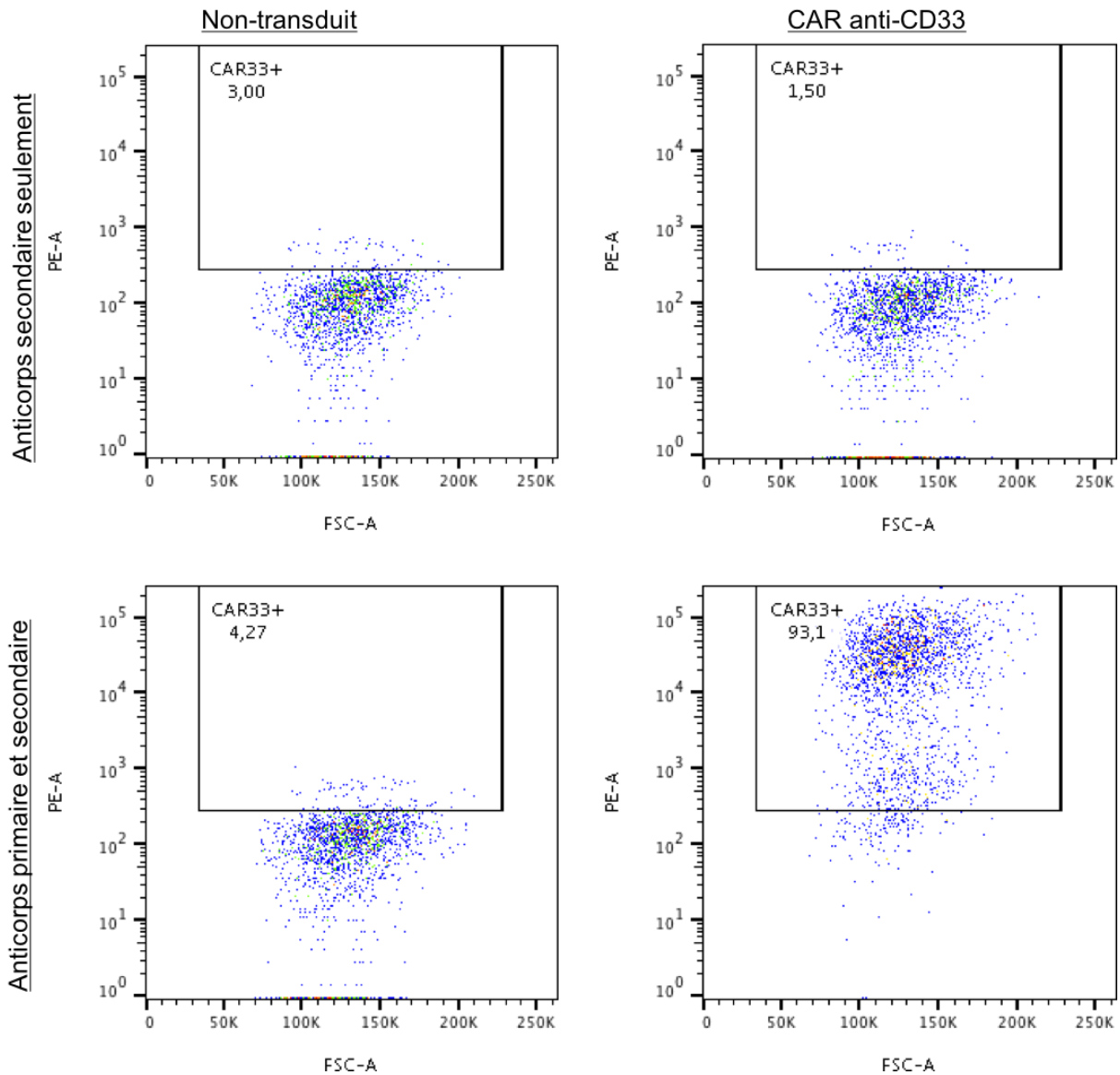


Figure 8 : Expression du CAR anti-CD33 à la surface des cellules T primaires. Le CAR était placé sous la dépendance d'un promoteur fort contrôlé (UCOE-SFFV). L'expression du CAR (CAR33+) est exprimée en % de positivité par rapport aux cellules non-transduites marquées et a été mesurée par cytométrie en flux à J4 post-transduction. Le marquage primaire était fait avec un CD33 soluble couplé à un Fc. Le marquage secondaire était un anticorps anti-Fc couplé à un fluorochrome PE. La colonne de gauche montre les cellules T non-transduites comme contrôle négatif et, celle de droite, les cellules T transduites avec le CAR. La première rangée montre les cellules marquées avec l'anticorps secondaire seulement afin d'estimer le marquage non-spécifique produit par l'anticorps secondaire seul. La deuxième rangée montre les cellules T avec le marquage complet dont le taux de transduction était de 93%. Cette figure est un exemple représentatif de 7 expériences indépendantes faites à partir d'échantillons de 3 donneurs différents.

Une fois les constructions validées et l'expression du CAR sous promoteur fort confirmée, des virus ont aussi été produits pour le CAR sous promoteur T-spécifique (Tenh). Ces virus ne pouvaient pas être titrés sur les 293T, utilisées classiquement et d'origine rénale embryonnaire, puisque le promoteur T-spécifique permet uniquement une expression dans les cellules lymphocytaires T. Les Jurkat sont une lignée de cellules facile à cultiver et à transduire et sont d'origine lymphocytaire T, donc permettaient l'expression du transgène sous promoteur Tenh. Nous voulions utiliser la même technique de titration pour les deux virus afin d'assurer une bonne comparaison entre les titres. Le calcul du titre viral correspondait au nombre de cellules Jurkat mises en culture multiplié par le pourcentage de transduction et par le facteur de dilution du virus (40 000 cellules x % transduction x facteur de dilution). Ceci nous permettait d'estimer le nombre d'unités infectieuses par volume contenues dans la solution virale concentrée. Pour le calcul, nous utilisons les dilutions permettant un taux de transduction de 3 à 33% afin d'éliminer l'erreur survenant lorsque le nombre de virus est saturant ou sous-optimal. Ainsi, en considérant les dilutions 1:10 et 1:100, le titre du virus UCOE-SFFV était estimé à 170 000 UI/ μ l et celui du virus Tenh, à 30 000 UI/ μ l. Lorsqu'exprimé dans les Jurkat, le niveau d'expression du CAR, mesuré par l'intensité de fluorescence dans la dilution 1:10, était beaucoup plus élevé pour le promoteur fort (majoritairement entre 10^4 et 10^5) que pour le promoteur T-spécifique (majoritairement entre 10^3 et 10^4), suggérant un nombre de molécules CAR par cellule plus élevé pour le promoteur fort (**Figure 9**). Ces virus ont été utilisés pour transduire des cellules T primaires de donneurs sains afin de produire des effecteurs fonctionnels pouvant être utilisés pour tester l'efficacité du CAR contre des cellules LMA.

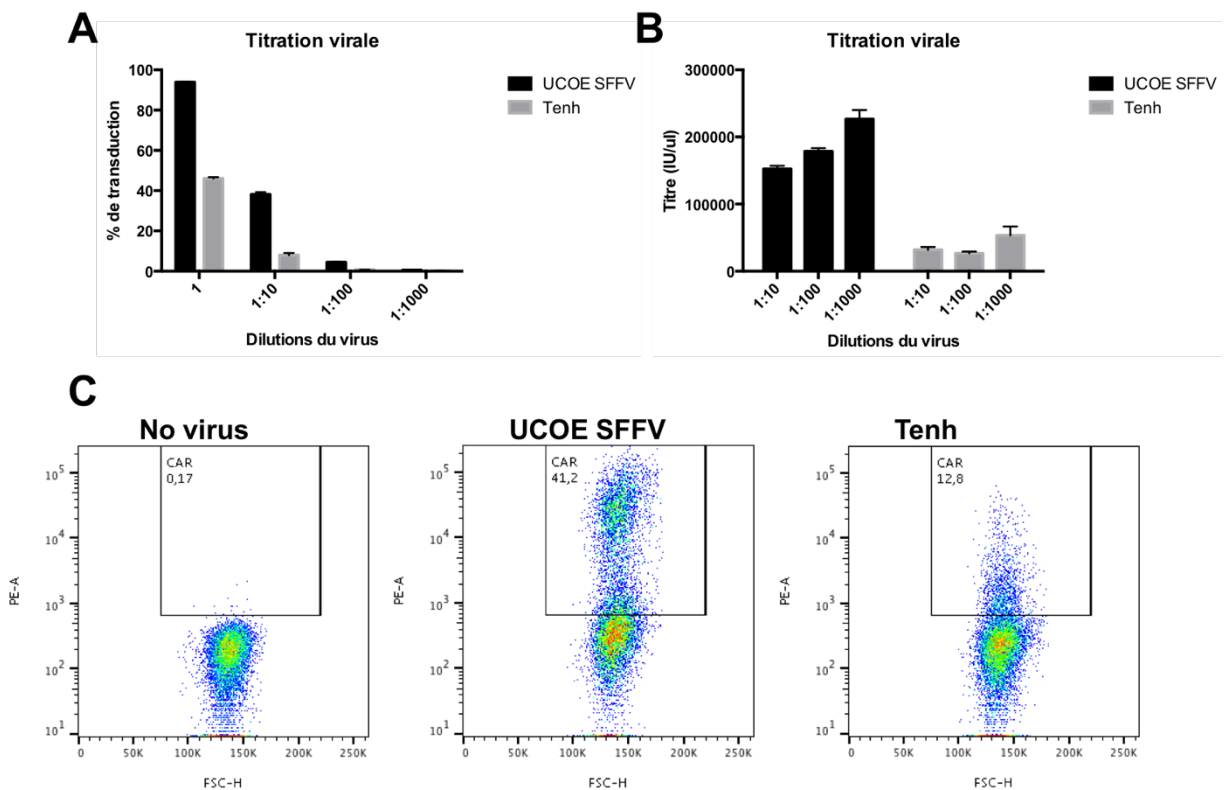


Figure 9 : Titration sur Jurkat des lentivirus codant pour le transgène du CAR anti-CD33. Des lentivirus codant pour le transgène du CAR anti-CD33 sous-contrôle d'un promoteur fort (UCOE-SFFV) ou du promoteur spécifique (Tenh) ont été produits et titrés sur Jurkat. **A.** Le pourcentage de transduction des Jurkat est présenté en fonction des dilutions de la préparation virale. Chaque dilution était faite en triplicatas et les barres représentent la moyenne. **B.** Le titre viral pour chacun des deux virus, exprimé en UI/ ul, était calculé en multipliant le nombre de cellules mises en culture par le pourcentage de transduction puis par le facteur de dilution du virus. Les barres représentent la moyenne des triplicatas pour chaque dilution. **C.** Le marquage du CAR anti-CD33 en cytométrie en flux était fait par un CD33 soluble couplé à un Fc puis par un anticorps anti-Fc couplé à un fluorochrome PE. Un exemple de nuage de points est montré pour les dilutions 1 :10 pour chacun des virus ainsi que sans virus.

Dans les cellules primaires, les cellules T transduites avec le promoteur T-spécifique (Tenh) montraient un taux de transduction et une intensité d'expression plus faible que celles transduites avec le promoteur fort (UCOE-SFFV) (**Figure 10**). Cependant, nous avons obtenu tout de même un taux de transduction moyen de $75,9 \pm 6,5$ % pour 3 donneurs avec le promoteur Tenh. Ce résultat montrait que le promoteur T-spécifique permettait l'expression d'un CAR sur des cellules T primaires humaines. Nous avons ensuite testé si l'expression du CAR médiée par

le promoteur T-spécifique, plus faible que celle obtenu par le promoteur fort, était suffisante pour entraîner une lyse efficace des cellules de leucémie myéloïde aiguë.

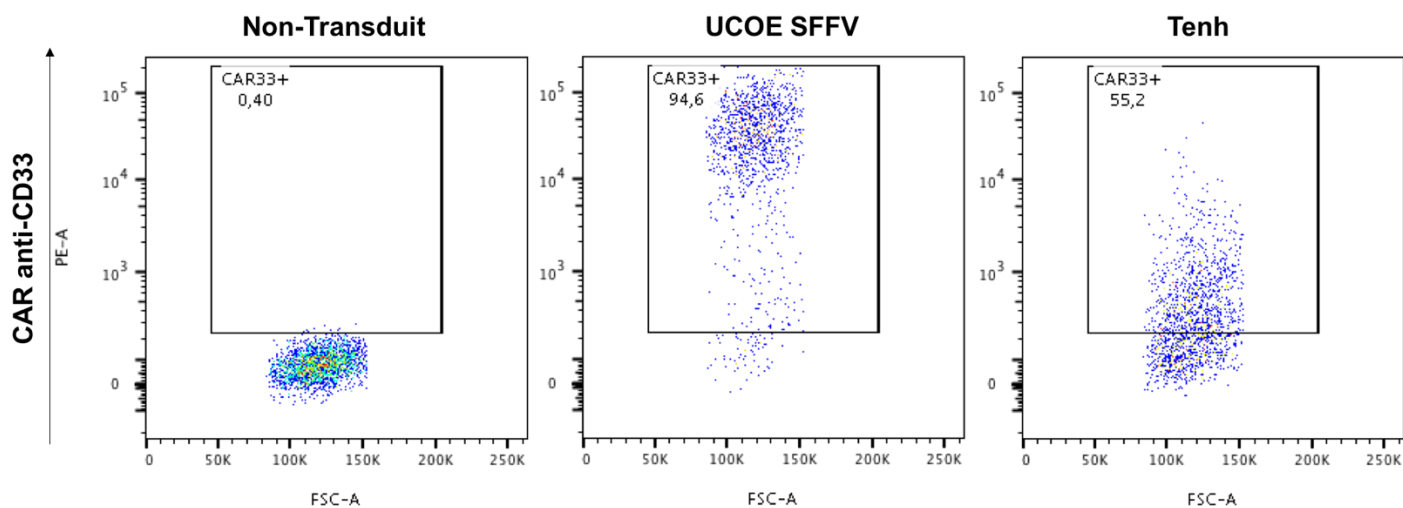


Figure 10 : Expression du CAR anti-CD33 sous promoteur fort ou spécifique sur cellules T primaires. Le CAR était placé sous la dépendance d'un promoteur fort contrôle (UCOE-SFFV) ou du promoteur T-spécifique (Tenh). L'expression du CAR est exprimée en % de cellules positives par rapport aux non-transduites et a été mesurée par cytométrie en flux à J5 post-transduction. Le marquage primaire était fait avec un CD33 soluble couplé à un Fc et le marquage secondaire était un anticorps anti-Fc couplé à un fluorochrome PE. Le graphique de gauche montre l'expression du CAR par les cellules T non-transduites comme contrôle négatif (0,4%), celui du milieu montre les cellules T transduites avec le CAR sous promoteur fort (94,6%) et celui de droite montre le promoteur spécifique (55,2%). Cette figure est un exemple représentatif de 4 expériences indépendantes faites à partir d'échantillons de 3 donneurs différents.

3.2 CRISPR et cibles

À partir de l'outil E-CRISP, nous avons obtenu et choisi 4 ARN guides CRISPR visant le gène CD33. La technologie CRISPR sera ultimement utilisée pour invalider CD33 dans les cellules souches hématopoïétiques dans le cadre de notre stratégie KO/KI de CD33/CAR anti-CD33. Nous voulions aussi utiliser CRISPR pour créer des lignées de LMA CD33^{KO} qui serviraient à démontrer la spécificité du CAR anti-CD33 contre des cibles n'exprimant pas l'antigène. Afin de déterminer lequel des quatre guides était le plus efficace, ils ont été clonés dans un vecteur LentiCRISPRv2 afin de produire des lentivirus permettant de transduire des cellules de lignées LMA, comme HL60 et THP1. Le vecteur LentiCRISPRv2 contient aussi le gène Cas9, ce qui permet de faire une seule transduction, sans électroporation de la protéine. Aussi, il contient un gène de résistance à la puromycine, nous permettant d'enrichir la population de cellules ayant reçu le vecteur. Nous avons débuté par un test comparant les guides dans des THP1, puisque c'était la lignée LMA la plus facile à transduire et à sélectionner avec la puromycine. Les 4 virus contenant chacun des guides n'ont pas été concentrés ni titrés puisque le LentiCRISPR ne possède pas de marqueur permettant de détecter le taux de transduction des cellules. Cependant, ils ont été produits en même temps, de la même manière, avec le même matériel et les vecteurs sont de la même taille. Puisque ces paramètres sont les principaux facteurs influençant le titre viral, nous pouvions émettre l'hypothèse que les titres pour les quatre virus n'étaient pas significativement différents et, donc, que la variation de l'expression de CD33 observée dépendait de l'efficacité du guide. Ce test a été réalisé par un étudiant post-doctorant du laboratoire (Maxime Veillette). Le niveau d'expression de CD33 a été mesuré 7 jours post-transduction par cytométrie en flux. Les THP1 non-modifiées (non-transduites) n'exprimaient pas uniformément CD33 : 13,9% étaient déjà négatives. Le contrôle isotypique permet de détecter la liaison non-spécifique dépendante du type de chaîne lourde et légère de l'anticorps utilisé plutôt que de son affinité pour sa cible. L'isotype est un anticorps dont la cible est non-pertinente pour l'expérience mais qui possède le même type de chaîne lourde et légère et le même fluorochrome que l'anticorps d'intérêt. Ce contrôle permet de déterminer le seuil de positivité réel attribuable à la spécificité de notre anticorps pour sa cible, ici CD33, et de placer la fenêtre sur le graphique de nuage de point. Pour cette expérience, l'anticorps PE mouse IgG1 kappa isotype Ctrl a été utilisé comme contrôle isotypique pour placer la fenêtre d'analyse. Les

cellules transduites avec les vecteurs CRISPRv2 contenant les guides #25, 28, 77 et 82 montraient, respectivement, 64,4%, 60%, 90,9% et 91,3% de cellules CD33^{KO} (**Figure 11**). Les ARNg #77 et 82 étaient donc similaires et supérieurs en efficacité par rapport aux deux autres guides. Nous avons choisi arbitrairement de continuer avec l'ARNg #77 puisqu'il ciblait le gène plus en amont dans l'exon 2, ce qui favorise l'invalidation complète du gène en déstabilisant l'ARNm et la protéine résultante et évite la persistance d'une protéine tronquée.

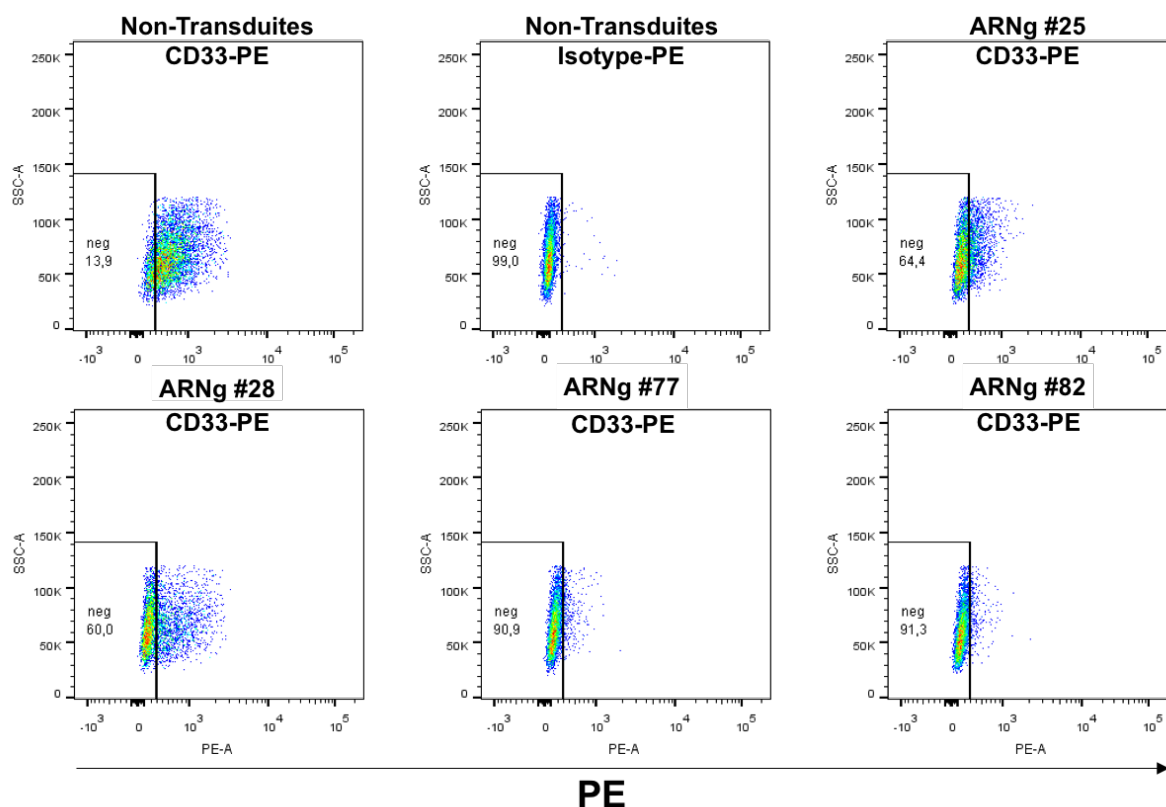


Figure 11 : Test d'efficacité des ARN guides sur les THP1. 500 000 THP1 ont été transduites avec 500 ul de solution virale et sélectionnées pendant 5 jours à la puromycine. Le niveau d'expression de CD33 a été mesuré 7 jours post-transduction par cytométrie en flux. Sur la rangée du haut, de gauche à droite, les cellules non-transduites ont été marquées par l'anticorps anti-CD33 et par l'anticorps isotype contrôle, puis les cellules transduites avec le vecteur contenant l'ARNg #25 ont été marquées avec l'anticorps anti-CD33. Sur la rangée du bas, de gauche à droite, les cellules transduites avec les vecteurs contenant les ARNg #28, 77 et 82 ont été marquées avec l'anticorps anti-CD33. Les cellules transduites avec les vecteurs CRISPRv2 contenant les guides #25, 28, 77 et 82 donnaient, respectivement, 64,4%, 60%, 90,9% et 91,3% de cellules THP1 CD33^{KO}. Expérience réalisée par Maxime Veillette.

Une fois l'ARN guide choisi, nous avons refait une nouvelle production virale du LentiCRISPRv2 en concentrant le virus par gradient de sucrose et ultracentrifugation afin d'augmenter le taux de transduction et de maximiser les chances de transduire efficacement les HL60, qui semblaient plus résistantes. Nous avons transduit les deux lignées LMA, THP1 et HL60, avec la même préparation virale. Nous avons ensuite testé plusieurs concentrations de puromycine afin de déterminer la concentration optimale pour la sélection des HL60. Nous avons ainsi pu déterminer que la concentration optimale était de 0,2 µg/ml, puisque c'était la concentration minimale pour laquelle les cellules non-transduites étaient tuées à 100% alors que les cellules transduites survivaient. Cette concentration est faible comparativement à ce qui est habituellement décrit dans la littérature pour la sélection de cellules de mammifères à la puromycine (entre 1-10 µg/ml) (Thermo Fisher Scientific 2018; Horizon Discovery and Thermo Fisher Scientific 2018). Les THP1, quant à elle, nécessitaient une concentration de 5 µg/ml de puromycine. Six jours après la transduction, les populations de cellules transduites et non-transduites ont été marquées avec l'anticorps anti-CD33 afin de déterminer le taux d'inactivation du CD33 par cytométrie en flux. Le niveau de CD33 a été réduit pour les deux lignées (KO) comparativement aux cellules non transduites (WT). Pour les HL60, le niveau de détection des KO atteignait même celui des cellules WT non-marquées, indiquant une disparition totale du CD33 pour la majorité des cellules. Pour les THP1, la détection de CD33 des KO était réduite mais pas totalement éliminée. Aussi, l'expression de base de CD33 était plus élevée dans les HL60 WT (intensité de fluorescence d'environ 10^4) que dans les THP1 WT (intensité de fluorescence d'environ 10^3) (**Figure 12A**). Un essai à l'endonucléase T7 a aussi été réalisé afin de quantifier le taux d'indels introduits lors de la réparation de la coupure double brin causée par la Cas9. Un taux de 89% pour les THP1 et 98% pour les HL60 a été obtenu (**Figure 12B**). Ceci signifiait que 89% et 98% des brins d'ADN étaient associés à des brins de séquence différents et donc ont été coupés par la T7 endonucléase alors que dans l'échantillon WT, non-traité à la Cas9, tous les brins étaient identiques, donc aucune coupure n'avait eu lieu. Lorsqu'il y avait coupure du produit PCR à l'emplacement visé par le CRISPR, nous obtenions des bandes à, environ, 400 bp et 150 bp alors que si aucune coupure n'avait lieu, une seule bande était visible, à environ 550 bp.

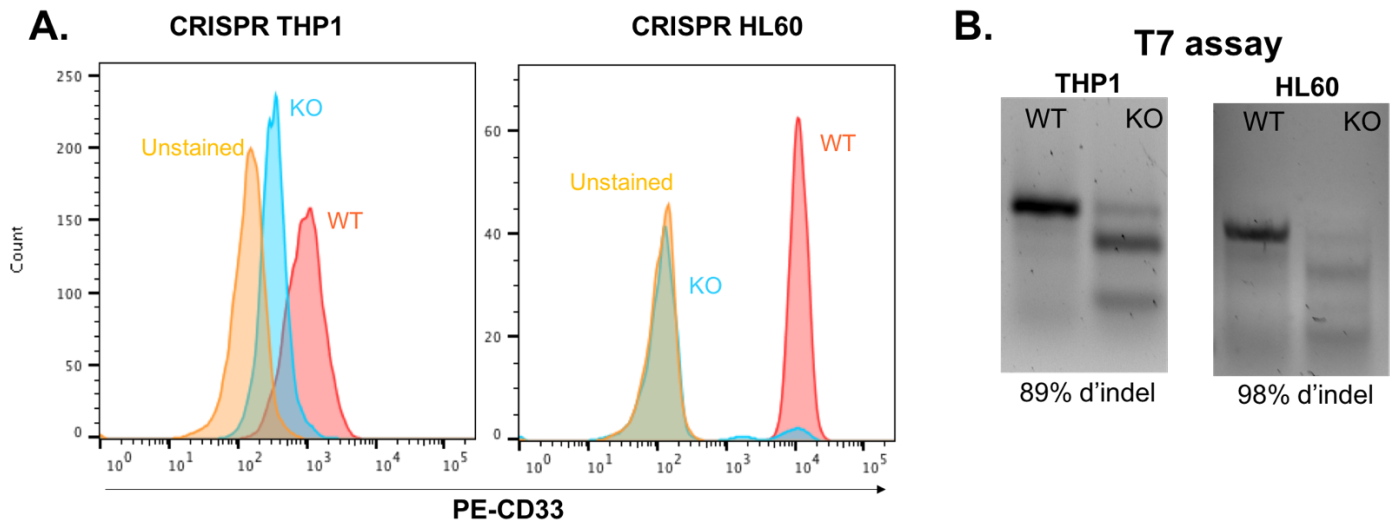


Figure 12 : Invalidation du gène CD33 dans les lignées de LMA THP1 et HL60 à l'aide de l'ARNg #77. A. Cytométrie en flux montrant l'expression de CD33 dans les lignées non-transduites marquées (WT, en rouge), les lignées non-transduites non-marquées (Unstained, en jaune) et les lignées transduites avec le vecteur LentiCRISPRv2 contenant le gène de la Cas9 et l'ARNg #77 (KO, en bleue) 6 jours post-transduction. **B.** Essai de T7 montrant le taux d'indel obtenu dans les lignées transduites (KO) comparativement au niveau basal dans les lignées non-transduites (WT).

Suite à la création des lignées LMA CD33 KO, les cellules ont été triées en cellule unique par cytométrie en flux selon leur niveau d'expression de CD33 afin d'obtenir une population homogène et stable. Ceci permettait d'arrêter la sélection à la puromycine et d'éliminer les cellules n'ayant pas été transduites et exprimant toujours CD33. Les lignées résultantes étaient constituées de clones tous génétiquement identiques, contenant les mêmes mutations et exprimant le même niveau de CD33. Les lignées WT non-transduites étaient aussi triées afin d'homogénéiser l'expression du CD33 et de mieux se comparer à la clonalité des cellules KO. Le niveau d'expression du CD33 pour chacun des clones choisis était mesuré par cytométrie en flux et permettait de confirmer que des clones positifs et négatifs pour CD33 ont été générés avec succès pour les deux lignées de LMA (**Figure 13**).

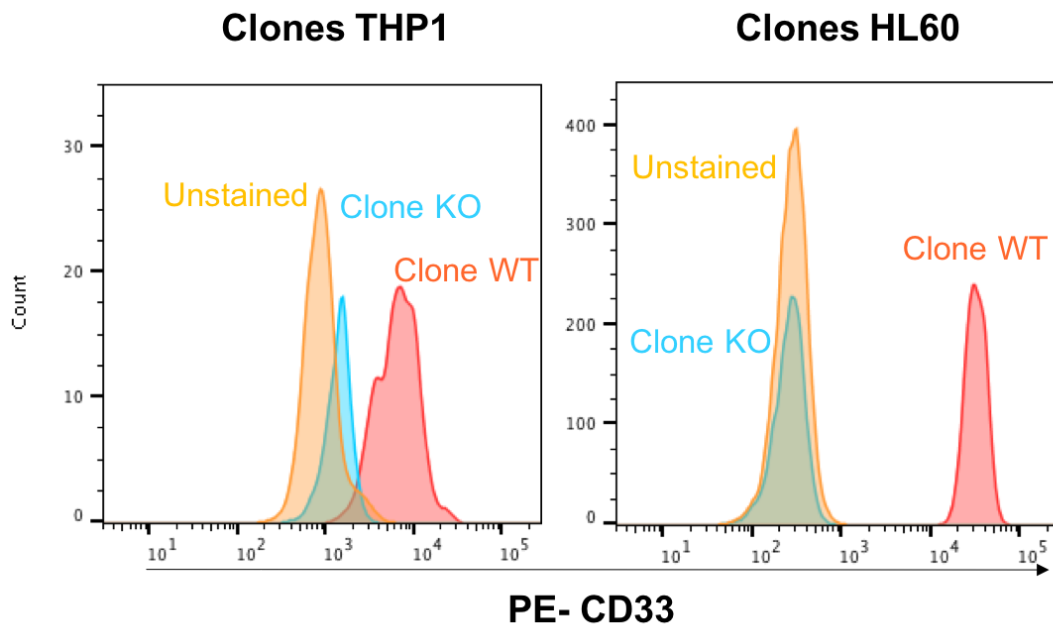


Figure 13 : Clones de LMA CD33+/-. Les clones ont été générés par triage de cellules individuelles par cytométrie en flux sur la base du marquage du CD33. Le niveau d'expression de CD33 pour chaque clone est montré. Les clones CD33- sont représenté en bleu (clone KO), les clone CD33+ marqués sont en rouge (clone WT) et les clones CD33+ non-marqués sont en jaune (Unstained).

Afin de mieux caractériser le clone HL60 CD33 KO généré, un séquençage a été réalisé afin d'identifier la mutation causale. Nous avons choisi les HL60 car l'expression de CD33 était beaucoup plus réduite que celle des THP1. Un essai T7 a permis de constater que le clone était hétérozygote puisque 50% de coupure était observée après incubation avec la T7 endonucléase (**Figure 14A**). Au séquençage, une double séquence était observée à partir de 4 bases après le PAM, ce qui correspondait au site ciblé par la Cas9 et l'ARNg. Nous avons pu déterminer que les deux allèles correspondaient à une insertion d'un C pour l'un ou à une délétion de 2 bases A et C pour l'autre (**Figure 14B**). Ces deux mutations introduisaient un décalage du cadre de lecture de l'ADN ce qui menait à la formation d'un codon stop dans le gène.

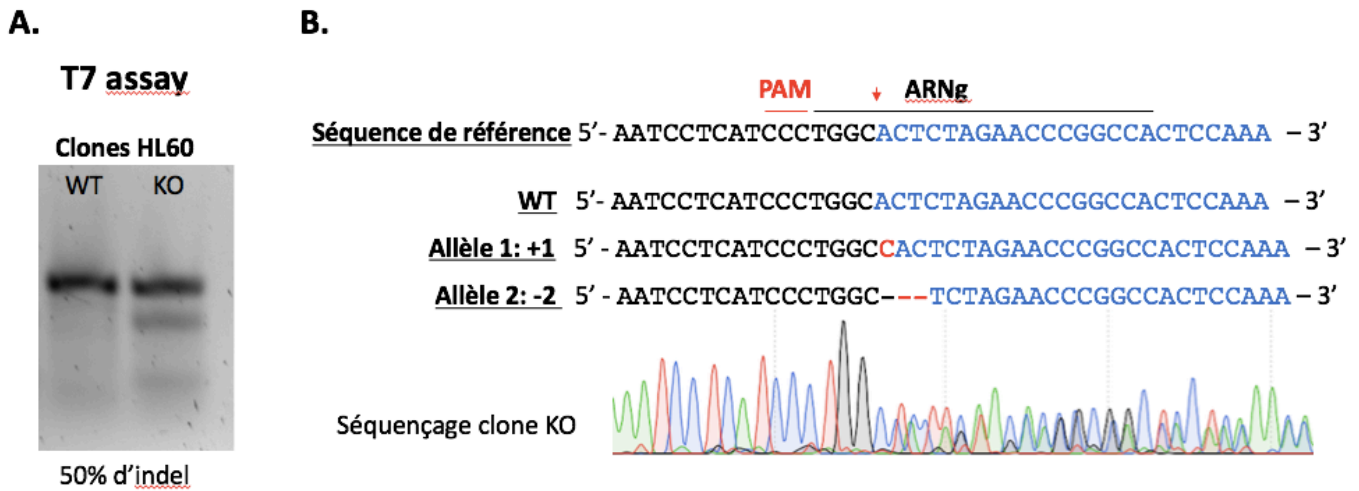


Figure 14 : Caractérisation du clone HL60 CD33^{KO}. **A.** Un essai T7 a été réalisé sur les clones HL60 WT et CD33^{KO} avec un taux de coupure de 50% dans le KO et nul dans le WT. **B.** Le séquençage du clone WT correspondait à la séquence de référence alors que celui du KO montrait une double séquence à partir de 4 bases après le PAM. Les allèles étaient déterminés à l'aide des pics du chromatogramme et correspondaient soit à une insertion d'un C ou à une délétion de 2 bases, A et C. Les mutations dans les allèles sont indiquées en rouge.

3.3 Cytotoxicité du CAR anti-CD33 contre les cellules LMA

Afin de tester l'efficacité fonctionnelle et la spécificité du CAR, nous avons transduit des cellules T primaires humaines avec le vecteur contenant le CAR sous promoteur fort et nous les avons placés en face des clones LMA dans un essai de cytotoxicité. Le protocole utilisé pour les essais de cytotoxicité était basé sur celui utilisé par le groupe de Dr Saar Gill et de Dr Carl H June, Université de Pennsylvanie, Philadelphie (Kenderian et al. 2015). Nous avons choisi les HL60, plutôt que les THP1, car l'expression de CD33 du clone KO était complètement abolie. Aussi, le niveau d'expression de base de CD33 des HL60 WT était plus élevé que celui des THP1. La mesure de la lyse spécifique des cibles LMA CD33⁺ et CD33⁻ permet de mesurer la capacité du récepteur CAR à induire les voies de signalisation de cytotoxicité dans la cellule T. Également, le fait d'utiliser des cibles qui possède l'antigène et d'autres qui ne l'ont pas permet de déterminer la spécificité de cette activité cytotoxique. Plusieurs ratios effecteur:cible ont été testés afin d'obtenir une cinétique sous forme de courbe exponentielle. La mesure de la lyse des cibles était effectuée après 24h de contact, ce qui est la norme dans le domaine (Laborda et al. 2017; O'Hear et al. 2015; Ruella, Kenderian, et al. 2016). Pour 3 donneurs, la lyse du CAR

atteignait $78,5 \pm 7,2$ % à 1:2 contre les cibles $CD33^+$ ce qui est significativement plus fort que $19,4 \pm 8,7$ % contre les $CD33^{KO}$ ($p=0.0064$). Ceci démontrait donc sa spécificité car il induisait peu de lyse en l'absence de l'antigène. La transduction du CAR augmentait significativement la lyse des cibles comparativement aux T non-transduites (**Figure 15, $p=0.0017$**). Ceci démontrait, également, que le récepteur CAR conférait un avantage cytotoxique contre les LMA $CD33^+$. La lyse de base observée avec les cellules T non-transduites pouvait être due à l'allogénicité des cibles.

Cytotoxicité du CAR anti-CD33 contre HL60 $CD33^+$ et $CD33^{KO}$

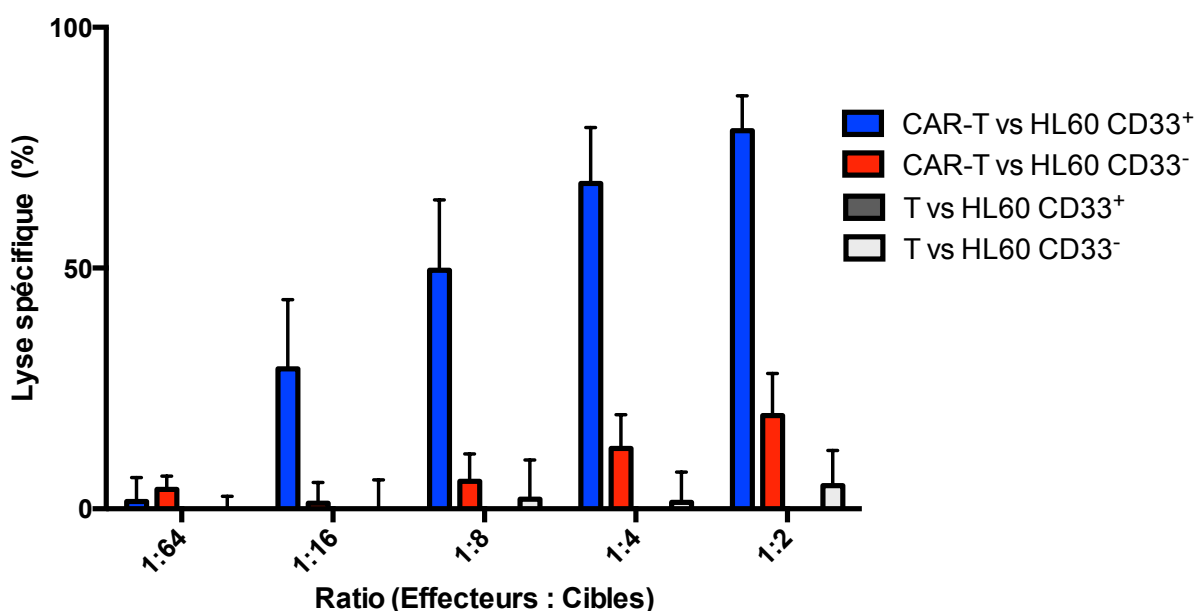


Figure 15 : Cytotoxicité du CAR anti-CD33 sous promoteur fort contre HL60 $CD33^+$ ou $CD33^{KO}$. Le CAR-CD33 sous le contrôle d'un promoteur fort (UCOE-SFFV) était transduit dans des cellules T primaires humaines activées tel que montré précédemment. Les cellules T transduites (CAR-T) et non-transduites (T) étaient mises en co-culture avec les clones HL60 $CD33^+$ ou $CD33^-(KO)$ en triplicatas à différents ratios effecteurs:cibles. La lyse des cibles était mesurée à 24h par un marqueur de viabilité (7-AAD) par cytométrie en flux avec le BD Fortessa HTS. La lyse pour chaque ratio était normalisée par la lyse des cellules cibles HL60 en culture seules (lyse spécifique). (N=3)

Une fois l'efficacité du CAR démontrée avec le promoteur fort contrôle, nous avons testé si le promoteur Tenh T-spécifique permettait aussi d'induire une lyse des cellules LMA dépendante du CAR. En effet, comme le promoteur Tenh activait plus faiblement la

transcription que le promoteur fort contrôle, l'expression du CAR était moindre lorsque placé sous sa dépendance. Nous avons testé si l'expression moindre du CAR-CD33 était suffisante pour induire une lyse efficace et spécifique des cibles LMA. Nous avons réalisé l'expérience en utilisant des cellules T primaires transduites avec le promoteur fort (UCOE SFFV) ou avec le promoteur T-spécifique (Tenh), comme décrit précédemment. Ces cellules T ont été mises face à des HL60 CD33⁺ ou CD33⁻ (KO), ou avec les clones THP1 CD33⁺ ou CD33⁻ (KO). Nos résultats montraient que le promoteur T-spécifique permettait d'induire une lyse importante, quoique inférieure à celle du promoteur fort, atteignant $71,1 \pm 14,3\%$ contre les HL60 à 2:1 et $56,8\%$ contre les THP1 à 4:1. On observait, également, que le CAR anti-CD33 était plus efficace contre les HL60 qui expriment beaucoup plus fortement CD33 que contre les THP1. La lyse était également spécifique, comme montré par le niveau de lyse beaucoup plus faible contre les cibles CD33 KO (**Figure 16**).

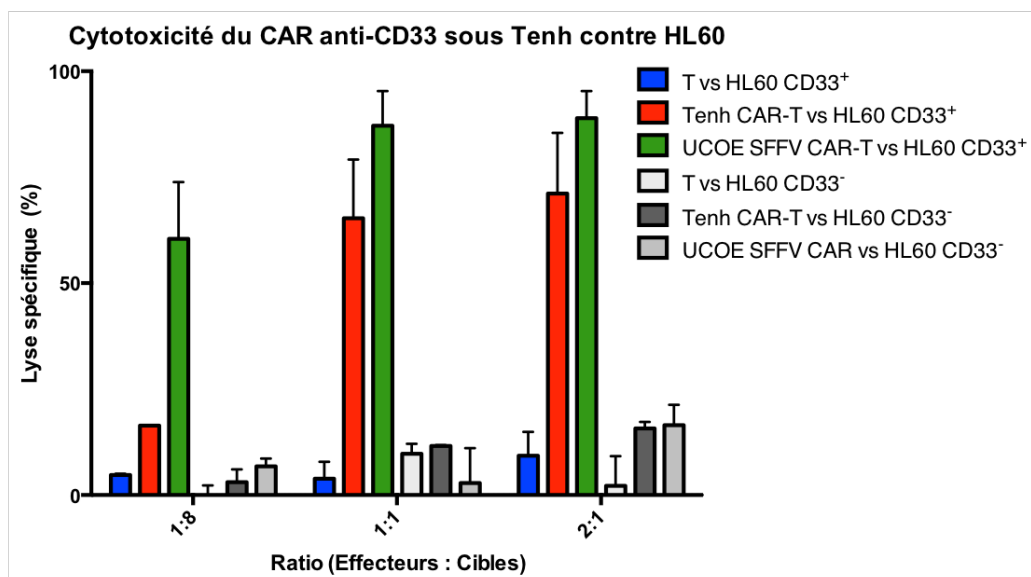
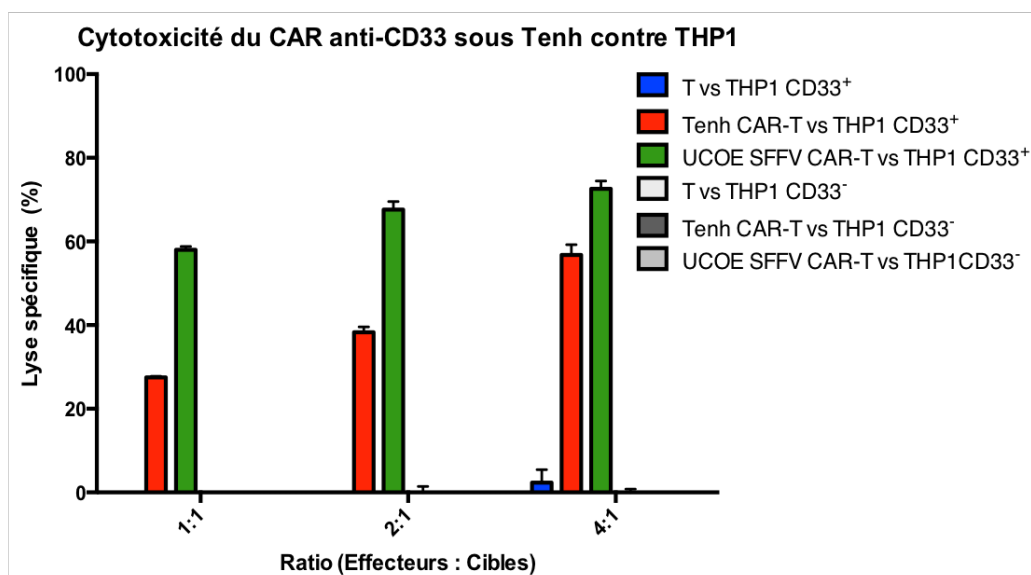
A.**B.**

Figure 16 : Cytotoxicité du CAR anti-CD33 sous promoteur T-spécifique contre HL60 et THP1. Le CAR sous promoteur fort (UCOE SFFV) ou T-spécifique (Tenh) était transduit dans des cellules T primaires. Les cellules T transduites (CAR-T) et non-transduites (T) étaient mises en co-culture avec **A.** les clones HL60 CD33⁺ ou CD33⁻ (N=2) **B.** les clones THP1 CD33⁺ ou CD33⁻ (N=1) en triplicatas à différents ratios effecteur:cible. La lyse des cibles était mesurée à 24h par un marqueur de viabilité (7-AAD) par cytométrie en flux avec le BD Fortessa HTS. La lyse pour chaque ratio était normalisée par la lyse des cellules cibles en culture seules (lyse spécifique).

3.4 Préparation des modèles animaux

En préparation pour les expériences *in vivo*, des clones de LMA GFP-Luciférase ont été préparés. En effet, le laboratoire est équipé d'un appareil d'imagerie *in vivo* (Labeo, Montréal) permettant la détection de bioluminescence *in vivo*. Cet outil permet de suivre la progression et la prolifération des cellules cancéreuses exprimant le gène de la luciférase dans les souris sans avoir à les sacrifier. Une injection de luciférine intra-péritonéale permet de produire de la bioluminescence pendant quelques minutes, qui peut être quantifiée par la suite via l'extension Fiji du logiciel Image J. Les clones HL60 CD33 WT et KO ont été transduits avec un virus contenant le vecteur pHRSIN UCOE SFFV Luciférase-GFP. Le gène de la luciférase produit l'enzyme nécessaire à la production de bioluminescence à partir de la luciférine. La luciférase était séparée de la protéine GFP par un peptide T2A auto-clivant, qui permettait de s'assurer que les deux protéines soient produites de façon équimolaire. Le gène GFP permettait de vérifier facilement le taux de transduction des cellules par cytométrie en flux. Plus tard, il permettra également de compter les cellules de LMA présentes dans le sang périphérique ou la moelle osseuse des souris. L'intensité de la GFP est représentative de l'intensité de la bioluminescence que nous obtiendrons *in vivo* puisque la luciférase et la GFP sont équimolaires. Les deux gènes ont été placés sous la dépendance d'un promoteur fort constitutif UCOE SFFV. Les cellules transduites avec le virus exprimaient un niveau de GFP variable selon le nombre de copies intégrées au génome. Comme nous voulions utiliser la bioluminescence pour mesurer la croissance de la LMA dans les souris, nous avons généré des clones afin d'obtenir une expression homogène dans chaque cellule. Ceci permettra de faire une corrélation directe entre la bioluminescence observée dans les souris et le nombre de cellules LMA présentes. Les clones GFP-Luciférase ont été dérivés comme décrit précédemment pour les HL60 CD33⁺ et CD33^{KO}. Les HL60 WT non-transduites non-marquées ou marquées avec l'anticorps isotype du CD33 étaient utilisées pour placer les fenêtres d'analyse. Le niveau d'expression de CD33 et GFP était mesuré avant et après la transduction avec le vecteur Luciférase-GFP pour chacun des clones HL60 CD33⁺ et CD33^{KO}. Le clone CD33^{KO} exprimait moins fortement la GFP que le clone CD33⁺ mais ils étaient tous les deux positifs (**Figure 17**). Des résultats similaires ont été obtenus pour les THP1 Luciférase-GFP qui ont aussi été générées. (**Données non-présentées**)

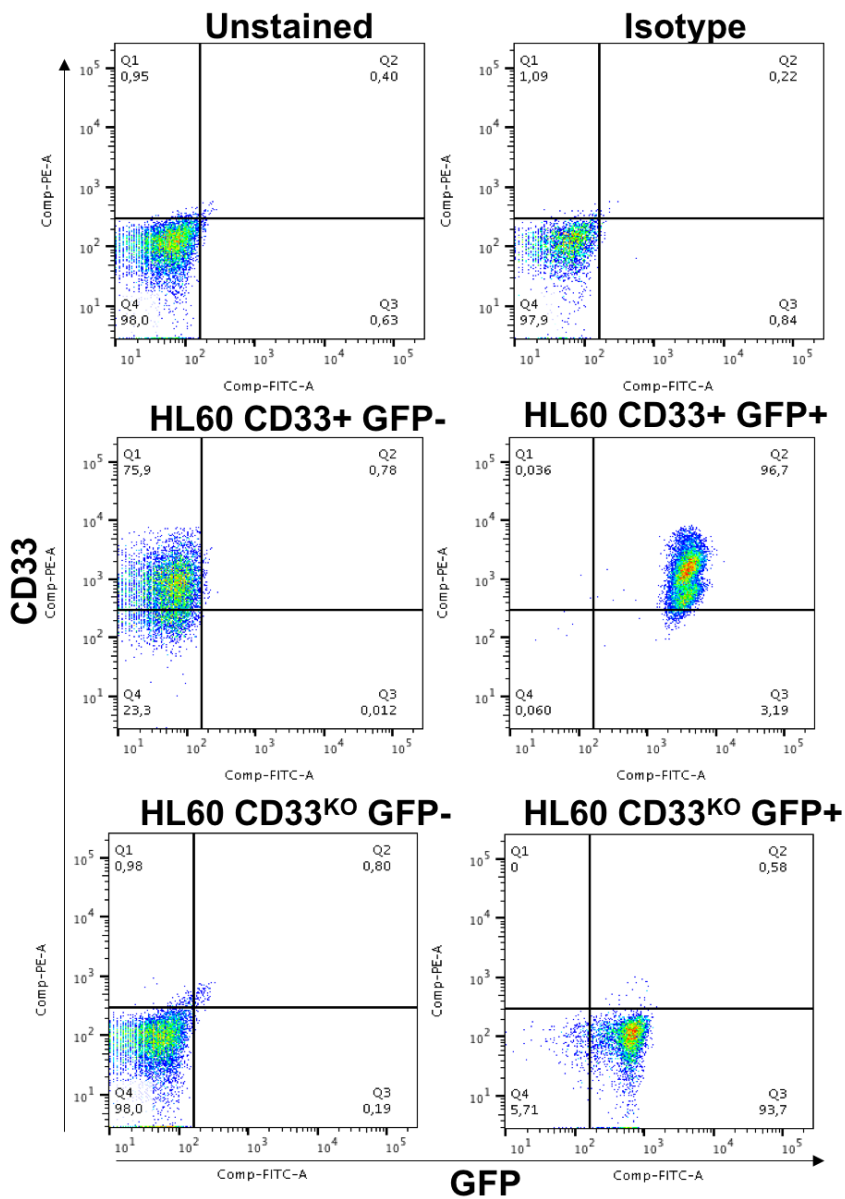


Figure 17 : Génération de clones HL60 GFP-Luciférase pour les expériences *in vivo*. Des clones des HL60 CD33⁺ et CD33^{KO} ont été générés par trie de cellules uniques selon leur niveau d'expression de GFP par cytométrie en flux. Dans la première rangée, on voit les HL60 WT non-transduites, soit non-marquées (Unstained) ou marquées au contrôle isotypique de CD33, qui servaient à placer les fenêtres d'analyse. Le niveau d'expression de CD33 et GFP est montré avant et après la transduction avec le vecteur Luciférase-GFP pour chacun des clones HL60 CD33⁺ et CD33^{KO}. Cette figure est aussi représentative de ce qui a été obtenu pour les THP1 GFP-Luciférase.

Chapitre 4 : Discussion

4.1. CAR et effecteurs

Dans ce projet, nous devons d'abord concevoir un CAR anti-CD33 fonctionnel qui servirait de base à notre stratégie. Aussi, nous devons tester la faisabilité d'utiliser un promoteur T-spécifique synthétique, nouvellement conçu dans notre laboratoire, pour exprimer le CAR. Pour ce faire, des vecteurs lentiviraux contenant le CAR anti-CD33 2^e génération (28z) utilisant le ScFv du GO (My96) sous les promoteurs fort (UCOE-SFFV) ou T-spécifique (Tenh) ont été générés. Nous avons démontré, à l'aide d'une méthode de détection spécifique, que ce CAR était exprimé à la surface des lymphocytes T primaires de donneurs sains purifiés et pouvait lier la molécule de CD33 tant lorsque l'expression était régulée par un promoteur fort non-spécifique que par le promoteur T-spécifique. Ce résultat montre que le promoteur T-spécifique, sur lequel notre stratégie repose, permet une expression suffisante de gros transgènes comme des CAR sur des cellules T primaires humaines. Puisque l'expression du CAR sous le contrôle du promoteur T-spécifique ne nous permettait pas de titrer les virus de façon classique avec des HEK293T, nous avons dû mettre au point une méthode de titration virale dans les cellules Jurkat afin de quantifier les virus transportant un transgène sous promoteur T-spécifique. La titration a permis de déterminer que 2,8 fois plus de particules virales contenant le promoteur fort (17 millions) ont été utilisées pour transduire les cellules T primaires comparativement aux particules virales avec promoteur T-spécifique (6 millions). Toutefois, la différence observée entre le taux de transduction avec promoteur fort et le taux avec promoteur T-spécifique était de seulement 1,24 fois. Ce résultat peut s'expliquer par le fait que le nombre de virus contenant le promoteur fort était saturant et en excès puisque la MOI était de 17, mais indique aussi que les virus contenant le promoteur T-spécifique avaient une capacité d'infection relativement similaire à celle du promoteur fort. Nous avons également observé que le niveau d'expression du transgène CAR était moins intense avec le promoteur T-spécifique (intensité de fluorescence entre 10^3 et 10^4) qu'avec le promoteur fort (entre 10^4 et 10^5), suggérant un nombre moindre de molécules CAR par cellule. Ce niveau d'expression plus faible peut s'expliquer soit, par le nombre plus bas de particules virales utilisées, menant à un nombre de copies intégrées par cellule plus faible, ou soit par la différence de force entre les deux promoteurs. Le promoteur fort pourrait recruter de

façon plus efficace les complexes de transcription comparativement au promoteur T-spécifique. Le promoteur fort utilisé dans ce projet comme contrôle positif était constitué de deux parties : le UCOE et le SFFV. Le « Ubiquitous chromatin opening element » (UCOE), provenant du locus humain A2UCOE, contient des îlots CpG non-méthylés qui permettent un remodelage de la chromatine et une activation de la transcription même dans des sites d'hétérochromatine (Hoffmann et al. 2017). Le « spleen focus forming virus » (SFFV) est un promoteur fort d'origine virale fréquemment utilisé pour l'expression de transgènes dans des vecteurs lentivirus ou rétroviraux (Hoffmann et al. 2017; Winiarska et al. 2017). La combinaison de ces deux éléments stimule artificiellement la transcription de façon beaucoup plus soutenue que la majorité des promoteurs endogènes. Un promoteur plus faible peut, cependant, être un avantage. Il a été démontré qu'un CAR placé sous la dépendance d'un promoteur endogène, tel que celui du TCR, amène une expression moindre et plus homogène des CAR sur les cellules T et est plus efficace *in vivo* qu'une forte expression médiée par un promoteur viral (Eyquem et al. 2017). Cette observation est probablement due à une diminution de l'épuisement cellulaire des CAR-T avec une expression plus faible de CAR par la diminution de la signalisation tonique, ce qui permet une meilleure activité à long-terme. De façon similaire, notre promoteur T-spécifique pourrait permettre une expression modérée du CAR, ce qui pourrait être un avantage dans le contexte thérapeutique. D'un autre côté, le résultat obtenu par Eyquem et al. pourrait aussi être expliqué par l'élimination du gène du TCR endogène lors de l'introduction du CAR dans son locus. En effet, une étude intéressante démontre que la co-signalisation d'un CAR et d'un TCR endogène mène à l'épuisement cellulaire, l'apoptose et la réduction d'efficacité des cellules effectrices CD8⁺, ce qui n'est pas le cas pour les cellules CD4⁺ (Yang et al. 2017).

4.2. CRISPR et cibles

Dans le but de générer des HSC et des lignées LMA CD33^{ko}, nous avons initialement créé et testé 4 ARNg différents générés par E-CRIPS pour CD33 (Heigwer et al. 2014). Lors du premier test, les HL60 étaient toutes mortes après la sélection à la puromycine. Nous avons, par la suite, déterminé que ce phénomène était dû à une plus grande résistance à la transduction et à une sensibilité plus élevée à la puromycine comparativement aux autres types de lignées cellulaires. En effet, à l'aide d'une courbe de survie, nous avons établi que la concentration

optimale pour la sélection des HL60 à la puromycine était de 0,2 µg/ml ce qui est plus bas que ce qui est habituellement décrit pour les cellules mammifères en suspension (1 à 5 µg/ml) (Thermo Fisher Scientific 2018; Horizon Discovery and Thermo Fisher Scientific 2018). Pour cette raison, nous avons comparé les 4 ARNg dans les THP1 seulement. Nos résultats ont montré que les ARNg #77 et #82 étaient plus efficaces que les autres avec des niveaux similaires de KO du gène à 90,9% et 91,3%, respectivement. Ces deux ARNg se trouvaient dans l'exon 2 du gène CD33. À fin de comparaison, le groupe du Dr Saar Gill a ciblé les exon 2 et 3 dans leurs travaux (Kim et al. 2018). Nous avons choisi l'ARNg #77 à cause de son emplacement dans le gène CD33 plus en amont, ce qui est habituellement privilégié dans le choix d'un site d'inactivation d'un gène (Ran et al. 2013; Labuhn et al. 2018). Une protéine tronquée d'une longueur de 132 acides aminés sera tout de même traduite avant d'atteindre le codon stop prématuré introduit par CRISPR-Cas9. Toutefois, ce fragment n'est pas reconnu par l'anticorps anti-CD33 ni par le CAR anti-CD33 utilisés dans cette étude. L'efficacité du guide a aussi été confirmée par essai de T7. L'expression basale de CD33 dans les HL60 était plus élevée par rapport aux THP1 qui avaient un niveau d'expression plus hétérogène avec une proportion de cellules qui ne l'exprimaient pas de base. Lors de la transduction des HL60 et des THP1 avec le virus concentré contenant l'ARNg #77 et CRISPR-Cas9, nous avons observé des niveaux de CD33 réduits comparativement aux cellules non-transduites pour les deux lignées, indiquant l'efficacité de l'inactivation. Dans les HL60, les cellules KO non-triées avaient un taux d'expression de CD33 pratiquement nul, avec un niveau de fluorescence atteignant celui du bruit de fond. Des HL60 et THP1 CD33⁺ et CD33⁻ ont été clonés afin d'homogénéiser les populations. La mutation causale dans le gène du CD33 des clones HL60 CD33⁻ a été déterminée, par séquençage, comme étant l'insertion d'un C sur une allèle et la délétion d'un A et d'un C sur l'autre allèle.

4.3. Cytotoxicité du CAR anti-CD33 contre les cellules LMA

Afin de mesurer l'efficacité du CAR anti-CD33 contre des cellules de lignée LMA, nous avons effectué des essais de cytotoxicité *in vitro*. D'autres étudiants du laboratoire ont montré que les Jurkat n'ont pas la capacité d'induire une lyse dépendante d'un CAR *in vitro*, probablement dû à une trop grande dérive génétique (Données non-présentées). Pour cette raison, nous avons utilisé des lymphocytes T primaires purifiés de PBMC de donneurs sains

pour les essais. Pour 3 donneurs, nous avons obtenu un taux de lyse de $78,5 \pm 7,2$ % avec le CAR sous promoteur fort à un ratio de 1:2 contre les cibles HL60 CD33⁺. Cette lyse était significativement plus élevée que celle observée contre les CD33⁻ de $19,4 \pm 8,7$ % ($p=0.0064$), indiquant la spécificité du CAR. La spécificité du CAR est un aspect essentiel pour réduire la toxicité chez les patients en clinique. Elle permet de diminuer les effets toxiques « Off-target, off-tumor » de la thérapie. Aussi, il est important de s'assurer que les cellules invalidées pour le CD33 par notre CRISPR ne seront pas affectées par le CAR afin d'éviter la toxicité « On-target, off-tumor » telle que la myélotoxicité. Par ailleurs, la présence du CAR augmentait significativement la capacité des cellules T à tuer les cellules LMA, indiquant son efficacité ($p=0.0017$).

Le promoteur T-spécifique étant probablement un promoteur plus faible que la plupart des promoteurs viraux normalement utilisés pour exprimer les CAR dans les cellules T, nous voulions nous assurer que la densité de molécules CAR induite par celui-ci était suffisante pour permettre l'activité anti-tumorale du CAR-T. Nous avons donc répété l'essai de cytotoxicité en comparant des CAR-T avec le gène CAR sous promoteur fort ou sous promoteur T-spécifique. Nous avons pu démontrer que l'expression du CAR obtenue avec le promoteur T-spécifique permet une lyse efficace, bien que moindre que celle avec le promoteur fort, de $71,1 \pm 14,3\%$ contre les HL60 à un ratio de 2:1 et $56,8\%$ contre les THP1 à un ratio de 4:1 *in vitro*. Cependant les taux de transduction des deux populations de cellules T, soit promoteur T-spécifique ou promoteur fort, n'était pas égaux, ce qui rend difficile la comparaison directe de l'efficacité. L'expérience idéale serait de trier les cellules T positives pour le CAR afin d'éliminer les cellules non-transduites. Par contre, l'effet du tri sur la fonction effectrice des T ainsi que le nombre de cellules récupérées est difficile à prévoir. Également, nous croyions que la différence d'efficacité, si elle existe, sera éliminée lors de tests *in vivo* dû à une plus grande résistance à l'épuisement cellulaire et un meilleur effet à plus long-terme des CAR-T exprimant moins fortement le CAR sous promoteur T-spécifique (Eyquem et al. 2017). Les CAR-T dont le CAR était sous le contrôle du promoteur T-spécifique conservaient également leur spécificité en épargnant les cibles négatives pour CD33.

Nos résultats ont montré que le CAR anti-CD33 était plus efficace contre les HL60 qui expriment beaucoup plus fortement CD33 que contre les THP1. Le niveau d'expression du CD33, soit le nombre de molécules par cellule, semble donc influencer grandement l'efficacité du CAR anti-CD33. En effet, nous avons observé une différence d'environ 15% entre les HL60 et les THP1 dans la lyse des cellules suite au contact avec les CAR-T *in vitro*. Nous attribuons ce résultat à la différence d'expression de CD33 d'environ un log entre ces deux lignées mais plus d'analyses seraient nécessaires afin de confirmer cette hypothèse. Plusieurs études ont démontré qu'une densité élevée d'antigène était nécessaire pour assurer une activité optimale, mesurée par la sécrétion de cytokines ainsi que le taux d'éradication *in vivo* dans des modèles de xélogreffe, des CAR-T ciblant, notamment, le CD22 et la « anaplastic lymphoma kinase » (ALK) (Majzner and Mackall 2018). Cette distinction des CAR comparativement aux TCR endogènes, qui ont la capacité de reconnaître efficacement les antigènes de faible densité, pourrait s'expliquer par divers facteurs tels que l'absence de certains domaines de signalisation du TCR (gamma, delta, epsilon), une moins bonne organisation de la synapse immunologique lors de la reconnaissance de l'antigène et/ou l'affinité différente du récepteur pour son antigène. Chez les patients, le niveau d'expression de CD33 sur les blastes leucémiques LMA est également variable allant d'une expression forte à une absence complète de CD33 (C D Godwin et al. 2017). On retrouve CD33 sur plus de 40% des blastes chez 3 patients sur 4 et sur plus de 75% chez la moitié des patients. Il y a, donc, chez ces patients, un nombre non-négligeable de blastes leucémiques qui expriment peu ou pas le CD33 et contre lesquels notre CAR anti-CD33 serait peu efficace. Par contre, dans une étude de Taussig et al., les blastes leucémiques LMA de patients ont été séparés en deux groupes, soit CD33⁺ ou CD33⁻, et injectés à des souris immunodéficientes pour mesurer leur potentiel régénératif. Les auteurs ont ainsi pu démontrer que, dans une population LMA donnée, les LSC se trouvent principalement dans la fraction CD33⁺, ce qui représente un avantage considérable pour les thérapies visant CD33 (Taussig et al. 2005). Le problème d'hétérogénéité de l'expression des antigènes est commun à la plupart des cancers et oblige les chercheurs qui développent des immunothérapies à trouver des solutions alternatives. Une des solutions fréquemment mise de l'avant et que nous développons actuellement dans notre laboratoire, est la création de CAR-T visant plusieurs antigènes. Comme pour l'antibiothérapie, où l'utilisation combinée d'agents avec des cibles différentes réduit l'émergence de résistance, les CAR-T ciblant plusieurs antigènes permettraient de

diminuer les rechutes causées par la présence ou l'émergence de cellules tumorales négatives pour l'antigène ou par une mutation de celui-ci qui empêche sa détection. Plusieurs stratégies sont présentement en développement mais les deux principales sont le développement de CAR doubles qui consistent en deux CAR indépendants, sur la même cellule T, reconnaissant chacun une cible différente ; ou de CAR en tandem qui, au contraire, se composent d'un seul CAR à deux têtes qui nécessite la reconnaissance des deux antigènes pour être activé (Fan et al. 2017). Dans la LMA, la combinaison d'un CAR anti-CD33 et d'un CAR anti-CD123 pourrait permettre d'augmenter l'efficacité de notre stratégie (Hoseini and Cheung 2017). En effet, CD123 est une autre cible intéressante dans la LMA puisqu'il fait partie des antigènes les plus fortement exprimés dans les échantillons primaires de patients et qu'il semble être une molécule importante dans la biologie de la LMA, agissant comme récepteur à cytokines (Gill et al. 2014). Conséquemment, très peu de variants CD123⁻ sont détectés après un traitement ciblant CD123 et une augmentation globale du niveau d'expression membranaire de CD123 est observée avec le temps durant l'expansion *in vivo* et *in vitro*. Cependant, comme CD123 est aussi exprimé par les HSC, son exploitation comme cible pour des CAR-T dans la LMA devrait être fait avec prudence vu son effet myéloablatif puissant, avec une déplétion particulièrement importante des plaquettes, des lymphocytes B et des cellules myéloïdes (Hoseini and Cheung 2017). Les CAR-T devraient être exprimés de façon transitoire grâce à un gène suicide ou à l'utilisation d'un CAR « dégradable » comme un ARN messager. Le traitement devrait probablement être combiné à une greffe de HSC et pourrait possiblement être utilisé comme conditionnement à celle-ci (Mardiros et al. 2013; Gill et al. 2014).

4.4. Préparation des modèles animaux

Des clones Luciférase-GFP ont été générés pour les deux lignées de LMA, HL60 et THP1, chacun soit CD33⁺ ou CD33^{KO}. Ces lignées serviront à tester notre stratégie *in vivo* dans des modèles animaux. Pour ce faire, nous reconstituerons des souris immunodéficientes NSG irradiées avec des HSC humaines soit non-modifiées ou soit CD33^{KO}/CAR-CD33. Nous monitorerons l'apparition des populations immunitaires dans le sang périphérique. Après l'apparition des cellules T dans le sang périphérique des souris humanisées, nous mesurerons le taux d'expression du CAR et nous injecterons les cellules de LMA CD33^{+/-} luciférase⁺, qui

mimeront une maladie résiduelle. La bioluminescence sera mesurée de façon sérieuse afin de déterminer la capacité des CAR-T issus des HSC à éliminer les cellules LMA CD33⁺, comparativement à des souris humanisées avec des HSC non-modifiées et injectées avec les mêmes cellules LMA. Comme contrôle négatif, nous utiliserons les cellules LMA CD33^{KO}. Notre hypothèse est que nous obtiendrons une diminution de la bioluminescence, idéalement jusqu'à une disparition, dans les souris reconstituées avec les HSC CD33^{KO}/CAR-CD33 et injectées avec les LMA CD33⁺. Alors que les souris reconstituées avec des HSC non-modifiées ou injectées avec les LMA CD33^{KO}, devraient montrer une augmentation de la bioluminescence jusqu'à atteindre les critères limites pour le sacrifice. Dû au nombre différent de copies intégrées, nos populations de LMA CD33⁺ et CD33^{KO} ne possèdent pas les mêmes niveaux d'expression de GFP et, donc, de luciférase, puisque les deux molécules sont équimolaires. Pour cette raison, nous ne pourrions pas comparer directement les souris injectées avec les cellules LMA CD33⁺ et CD33^{KO}. La méthode pour s'assurer d'obtenir deux groupes identiques aurait été de trier les populations sur la base d'une valeur de fluorescence précise pour éliminer les cellules avec des niveaux d'expression élevé ou faible. Cependant, cette différence de fluorescence ne cause pas de problème puisque nous comparerons chacune des conditions en termes de différence entre les groupes reconstitués avec les HSC CD33^{KO}/CAR-CD33 vs non-modifiées. Avec les cellules LMA CD33^{KO}, aucune différence statistiquement significative ne devrait être notée entre la bioluminescence des souris reconstituées avec les HSC CD33^{KO}/CAR-CD33 comparativement à celles non-modifiées. Avec les cellules LMA CD33⁺, la bioluminescence au sacrifice des souris devrait être significativement plus élevée dans le groupe reconstitué avec les HSC non-modifiées comparativement au groupe HSC CD33^{KO}/CAR-CD33. Également, les populations immunitaires humaines dans le sang périphérique seront monitorées durant l'expérience. Nous nous attendons à ce que ces dernières restent relativement stables au cours du temps puisque les HSC CD33^{KO} et les cellules en dérivant seront protégées de l'effet du CAR-CD33 par l'inactivation du gène CD33.

Le syndrome d'obstruction sinusoïdal (SOS) est une préoccupation importante dans les thérapies visant CD33. Il serait donc intéressant de mesurer ce phénomène dans nos modèles animaux. Par exemple, des biomarqueurs sériques tel que l'acide hyaluronique, le

« plasminogen activator inhibitor-1 » (PAI-1) et la protéine C ont été décrits comme permettant de monitorer la survenue de cette toxicité *in vivo* (Guffroy et al. 2017; Fried et al. 2001).

4.5. Autres écueils et difficultés

La viabilité du projet repose en grande partie sur les propriétés du promoteur T-spécifique. Dans les données préliminaires obtenues par Aurélien Colamartino et présentées dans l'introduction, on voit qu'un petit signal GFP est présent dans les cellules de type lymphocytaire B *in vitro*, même sous promoteur T-spécifique. Ce phénomène n'est cependant pas confirmé *in vivo* dans le sang périphérique de souris immunodéficientes NSG reconstituées par des HSC de sang de cordon humain, où les lymphocytes B n'ont aucune expression du GFP sous promoteur T-spécifique. Il sera donc important pour le projet de clarifier cet aspect de la spécificité par rapport aux lymphocytes B. En effet, le transgène CAR pourrait possiblement signaler dans les cellules B via les motifs ITAM de la queue cytoplasmique qui sont aussi utilisés dans le CD19, le CD21 et le CD79. L'impact d'un CAR dans des cellules B n'a pas encore été caractérisé et est au-delà du cadre de ce projet.

Comme CD33 est un antigène myéloïde, ce gène n'est pas normalement exprimé dans les lymphocytes T. Il est prédit par UCSC genome browser que la chromatine au niveau du locus de CD33 dans les cellules T de sang de cordon est sous l'état condensé et inaccessible à la machinerie de transcription puisqu'elle n'est pas associée aux marqueurs typiques d'activation tel que l'acétylation de la lysine 27 et la monométhylation de la lysine 4 sur les histones H3, n'est pas accessible aux DNase et que le séquençage des ARN révèle une absence de l'ARNm de CD33 (Kent et al. 2002). Étant donné que notre stratégie implique l'insertion du CAR anti-CD33 dans le locus du gène CD33, nous devons réfléchir à des méthodes afin de maximiser les chances que notre CAR soit exprimé malgré sa localisation défavorable. Pour ce faire, nous avons conçu un promoteur T-spécifique qui devrait mener à l'expression du gène du CAR dans les lymphocytes T. Aussi, nous considérons la possibilité d'ajouter le motif d'ouverture de la chromatine UCOE devant notre séquence promotrice afin de forcer l'expression de notre transgène. Le motif UCOE a été démontré comme étant efficace dans l'hétérochromatine pour empêcher l'inactivation et la méthylation de l'ADN dans des HSC, des iPSC et des lignées

cellulaires cancéreuses en prévenant la méthylation des ilots CpG du promoteur et en diminuant les modifications répressives des histones (Hoffmann et al. 2017). Cette stratégie devra être testée au préalable afin de s'assurer que la présence de UCOE devant le Tenh ne diminue pas la spécificité de celui-ci. Finalement, nous émettons l'hypothèse que l'insertion du CAR en orientation anti-sens dans le locus diminuera l'influence du promoteur du gène de CD33 sur notre construction. Pour cette raison, nous avons conçu les séquences d'homologie pour le HDR dans le vecteur AAV de manière à ce que le transgène soit inséré en anti-sens.

De façon intéressante, il a été reporté qu'un polymorphisme (génotype CT ou TT pour rs12459419) favorisant le variant d'épissage alternative excluant l'exon 2 (D2; D2,7a4,8)(C D Godwin et al. 2017) menait à une diminution de la réponse au traitement par GO dans l'essai clinique AAML0531 chez les enfants et adolescents nouvellement diagnostiqués (Lamba et al. 2017; Gamis et al. 2014). Comme nous utilisons le même ScFv dans notre construction CAR, le même phénomène sera probablement observé dans le cas de traitement avec notre stratégie. Il est proposé que le polymorphisme de CD33 pourrait servir de biomarqueur pour prédire les chances de réponse au traitement d'un patient.

Après une greffe de cellules souches hématopoïétiques, la thymopoïèse met entre 6 mois et 1 an à reprendre et à reconstituer complètement la population de cellules T fonctionnelles. Les rechutes d'AML ont souvent lieu précocement après la greffe, donc avant l'apparition des T. Comme notre stratégie repose sur le pouvoir cytotoxique d'effecteurs T dérivés des cellules souches hématopoïétiques modifiées, celle-ci devra être combinée à un autre traitement pour être pleinement efficace et protéger le patient pendant la période où les T sont absents. Notre stratégie visera plutôt la prévention de rechutes à plus long-terme. Des CAR-T classiques anti-CD33 pourraient être dérivés du donneur de HSC, lors de la manufacture des cellules souches hématopoïétiques modifiées, et injectés au patient pendant la première année. Aussi, le laboratoire travaille actuellement sur l'élaboration d'un promoteur NK-spécifique et d'un promoteur NK-T-spécifique. Comme les NK sont les premières cellules à apparaître après une greffe de cellules souches hématopoïétiques, leur utilisation dans l'immunothérapie des leucémies serait grandement avantageuse puisque ces cellules possèdent, également, une forte activité anti-tumorale et, plus particulièrement, anti-leucémique (Pical-Izard et al. 2015). Les

CAR-NK ont déjà été montrés efficaces dans des modèles précliniques (Liu et al. 2018). Nous aimerions donc inclure dans notre stratégie un promoteur NK-spécifique ou NK-T-spécifique qui permettrait aux NK dérivant de cellules souches hématopoïétiques modifiées d'exprimer aussi un CAR.

Chapitre 5 : Perspectives

Plusieurs étapes restent encore à faire pour le projet. Premièrement, nous souhaitons tester notre CAR *in vitro* et *in vivo* contre des blastes de patients provenant de la banque de cellules leucémiques du Québec (BCLQ). Ceci nous permettra de s'assurer que notre CAR est efficace contre des cellules tumorales LMA avec des niveaux de CD33 variables et représentatifs de ce qui est retrouvé chez les patients. Aussi, ceci nous permettra de mieux définir dans quels différents types de LMA notre CAR serait le plus efficace. Par exemple, nous nous attendons à ce que, comme le GO, le CAR anti-CD33 soit particulièrement efficace dans les LMA myélomonocytaires et monocytaires (M4 et M5) qui exprime davantage le CD33. Cependant, nous pourrions aussi tester son activité contre des types de LMA moins différenciées tel que M0 et M1. De plus, nous avons récemment débuté l'optimisation et la production de la méthode de production des virus AAV avec un vecteur contenant uniquement la GFP. Nous sommes en processus de clonage des vecteurs AAV contenant les inserts CAR anti-CD33 sous promoteur fort ou spécifique ainsi que les séquences d'homologie. Une fois le processus terminé, nous transduirons des HSC humaines de sang de cordon ou de foie fœtal afin de tester notre stratégie de « knock-out/ knock-in ». Nous optimiserons l'insertion anti-sens du transgène dans le locus de CD33 par HDR avec l'électroporation de RNP Cas-9 et ARNg. Aussi, les sites de modification non-spécifique les plus probables prédits par E-CRISP seront séquencés dans les HSC modifiées afin de mesurer le taux de « off-target effect » de notre CRISPR (Sharma et al. 2015; Heigwer et al. 2014). Une fois la stratégie de « knock-out/ knock-in » en place, les HSC modifiées seront différenciées en lymphocytes T *in vitro* dans le système développé au laboratoire, dans lequel nous pouvons monitorer les différentes phases de différenciation. Ceci nous permettra de déterminer si le transgène CAR dans le locus du CD33 affecte la différenciation des HSC en lymphocytes T. Le même genre de d'essai pourra être réalisé avec les lymphocytes B afin de s'assurer que ceux-ci n'expriment pas le transgène à certains stades de leur différenciation. Nous devons également faire des tests de reconstitution dans des souris NSG afin de s'assurer que la présence du transgène n'influence pas le potentiel souche des cellules de former un système immunitaire normal. Des transplantations secondaires de moelle osseuse seront réalisées afin d'avoir une mesure à plus long terme. Sur un autre plan, nous souhaitons aussi faire une comparaison *in vivo* de la stratégie du groupe de Saar Gill à la nôtre.

Pour ce faire, nous comparerons l'efficacité *in vivo*, dans un modèle de LMA, de CAR-T anti-CD33 combinés à une greffe de HSC CD33⁻ autologue à celle d'une greffe simple de HSC^{KO/KI} contenant le CAR anti-CD33 sous promoteur T-spécifique dans le locus CD33. Des mesures de la concentration sanguine de plusieurs cytokines seront également faites dans ces deux conditions afin de prédire le syndrome de relargage des cytokines. Nous croyons que la formation progressive des CAR-T dans notre stratégie permettra de réduire cette complication. Finalement, un de nos objectifs à long-terme serait aussi d'intégrer un volet CAR-NK dans notre stratégie par un promoteur NK-spécifique ou NK-T-spécifique ce qui permettrait une reconstitution plus rapide d'effecteurs fonctionnels post-greffe de HSC modifiées.

Chapitre 6 : Conclusion

Ce projet représente une approche originale et novatrice pour le traitement de la LMA puisqu'elle combine à la fois la thérapie génique et la technologie CAR. La combinaison de « knock-out/knock-in », livré par une approche non-intégrative avec les AAV, permet d'obtenir des HSC CD33KO et Tenh-CAR+, en une seule modification, tout en contournant les risques carcinogènes habituellement associés à la modification génétique de HSC. Dans ce projet, nous avons généré un ARNg CRISPR efficace pour invalider le CD33 qui nous a permis de produire des lignées LMA CD33KO et qui sera utilisé pour le volet « knock-out » dans les HSC. Nous avons produit un CAR anti-CD33 qui induit la lyse de cible LMA de façon efficace et spécifique même lorsque placé sous le contrôle du promoteur T-spécifique. Nos résultats montrent, donc, que l'utilisation de notre nouveau promoteur T-spécifique est possible pour moduler l'expression d'un CAR. Plus de recherche est nécessaire afin de déterminer si les HSC-CAR sont une approche viable mais notre promoteur T-spécifique semble constituer un avantage considérable. Nous souhaitons faire la preuve de concept qu'un promoteur spécifique synthétique dans des HSC permet d'obtenir un CAR efficace uniquement dans la progéniture T. Les modèles murins de xénogreffe de LMA exprimant la luciférase permettront de tester cette hypothèse in vivo. La LMA est une maladie hautement létale qui bénéficierait grandement de nouveaux traitements. Notre approche permettrait d'améliorer le pronostic de celle-ci de plusieurs façons. Premièrement, elle permettrait l'élimination efficace des blastes par les CAR-T. Ensuite, elle diminuerait les risques de syndrome de relargage de cytokines associés à l'utilisation de CAR-T grâce à la génération graduelle de ces effecteurs. Finalement, elle permettrait la mise en place d'un système de surveillance à long-terme contre les rechutes, avec un remplacement continu des cellules effectrices, tout en préservant la fonction normale du système immunitaire par l'invalidation du CD33.

Bibliographie

- Abken, H. 2016. Costimulation engages the gear in driving cars. *Immunity* 44(2), pp. 214–216.
- Assi, R., Kantarjian, H., Ravandi, F. and Daver, N. 2018. Immune therapies in acute myeloid leukemia: a focus on monoclonal antibodies and immune checkpoint inhibitors. *Current Opinion in Hematology* 25(2), pp. 136–145.
- Atanackovic, D., Radhakrishnan, S.V., Bhardwaj, N. and Luetkens, T. 2016. Chimeric Antigen Receptor (CAR) therapy for multiple myeloma. *British Journal of Haematology* 172(5), pp. 685–698.
- Bak, R.O., Dever, D.P., Reinisch, A., Cruz Hernandez, D., Majeti, R. and Porteus, M.H. 2017. Multiplexed genetic engineering of human hematopoietic stem and progenitor cells using CRISPR/Cas9 and AAV6. *eLife* 6.
- Bak, R.O. and Porteus, M.H. 2017. CRISPR-Mediated Integration of Large Gene Cassettes Using AAV Donor Vectors. *Cell reports* 20(3), pp. 750–756.
- Bennett, J., Wellman, J., Marshall, K.A., McCague, S., Ashtari, M., DiStefano-Pappas, J., Elci, O.U., Chung, D.C., Sun, J., Wright, J.F., Cross, D.R., Aravand, P., Cyckowski, L.L., Bennicelli, J.L., Mingozi, F., Auricchio, A., Pierce, E.A., Ruggiero, J., Leroy, B.P., Simonelli, F., High, K.A. and Maguire, A.M. 2016. Safety and durability of effect of contralateral-eye administration of AAV2 gene therapy in patients with childhood-onset blindness caused by RPE65 mutations: a follow-on phase 1 trial. *The Lancet* 388(10045), pp. 661–672.
- Beyar-Katz, O. and Gill, S. 2018. Novel approaches to acute myeloid leukemia immunotherapy. *Clinical Cancer Research*.
- Boesteanu, A.C. and Katsikis, P.D. 2009. Memory T cells need CD28 costimulation to remember. *Seminars in Immunology* 21(2), pp. 69–77.
- Boroujeni, M.E. and Gardaneh, M. 2018. The Superiority of Sucrose Cushion Centrifugation to Ultrafiltration and PEGylation in Generating High-Titer Lentivirus Particles and Transducing Stem Cells with Enhanced Efficiency. *Molecular Biotechnology* 60(3), pp. 185–193.
- Brinkman-Van der Linden, E.C.M., Angata, T., Reynolds, S.A., Powell, L.D., Hedrick, S.M. and Varki, A. 2003. CD33/Siglec-3 binding specificity, expression pattern, and consequences of gene deletion in mice. *Molecular and Cellular Biology* 23(12), pp. 4199–4206.
- Brudno, J.N. and Kochenderfer, J.N. 2016. Toxicities of chimeric antigen receptor T cells: recognition and management. *Blood* 127(26), pp. 3321–3330.
- Buckley, S.A. and Walter, R.B. 2015. Update on antigen-specific immunotherapy of acute myeloid leukemia. *Current Hematologic Malignancy Reports* 10(2), pp. 65–75.
- Carpenito, C., Milone, M.C., Hassan, R., Simonet, J.C., Lakhali, M., Suhoski, M.M., Varela-Rohena, A., Haines, K.M., Heitjan, D.F., Albelda, S.M., Carroll, R.G., Riley, J.L., Pastan, I. and June, C.H. 2009. Control of large, established tumor xenografts with genetically retargeted human T cells containing CD28 and CD137 domains. *Proceedings of the National*

- Academy of Sciences of the United States of America* 106(9), pp. 3360–3365.
- Chavez, J.C. and Locke, F.L. 2018. CAR T cell therapy for B-cell lymphomas. *Best Practice & Research. Clinical Haematology* 31(2), pp. 135–146.
- Dobbins, J., Gagnon, E., Godec, J., Pyrdol, J., Vignali, D.A.A., Sharpe, A.H. and Wucherpfennig, K.W. 2016. Binding of the cytoplasmic domain of CD28 to the plasma membrane inhibits Lck recruitment and signaling. *Science Signaling* 9(438), p. ra75.
- Eyquem, J., Mansilla-Soto, J., Giavridis, T., van der Stegen, S.J.C., Hamieh, M., Cunanan, K.M., Odak, A., Gönen, M. and Sadelain, M. 2017. Targeting a CAR to the TRAC locus with CRISPR/Cas9 enhances tumour rejection. *Nature* 543(7643), pp. 113–117.
- Fan, M., Li, M., Gao, L., Geng, S., Wang, J., Wang, Y., Yan, Z. and Yu, L. 2017. Chimeric antigen receptors for adoptive T cell therapy in acute myeloid leukemia. *Journal of hematology & oncology* 10(1), p. 151.
- Fried, M.W., Duncan, A., Soroka, S., Connaghan, D.G., Farrand, A., Peter, J., Strauss, R.M., Boyer, T.D. and McDonald, G.B. 2001. Serum hyaluronic acid in patients with veno-occlusive disease following bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplantation* 27(6), pp. 635–639.
- Gamis, A.S., Alonzo, T.A., Meshinchi, S., Sung, L., Gerbing, R.B., Raimondi, S.C., Hirsch, B.A., Kahwash, S.B., Heerema-McKenney, A., Winter, L., Glick, K., Davies, S.M., Byron, P., Smith, F.O. and Aplenc, R. 2014. Gemtuzumab ozogamicin in children and adolescents with de novo acute myeloid leukemia improves event-free survival by reducing relapse risk: results from the randomized phase III Children’s Oncology Group trial AAML0531. *Journal of Clinical Oncology* 32(27), pp. 3021–3032.
- Geier, C.B., Bra, D., Linder, A., Eibl, M.M. and Wolf, H.M. 2014. Human CD33 deficiency. In: *Inflammation & Autoimmunity and Dysregulation*. Prague, Czech Republic: European Society for Immunodeficiencies.
- Gill, S., Tasian, S.K., Ruella, M., Shestova, O., Li, Y., Porter, D.L., Carroll, M., Danet-Desnoyers, G., Scholler, J., Grupp, S.A., June, C.H. and Kalos, M. 2014. Preclinical targeting of human acute myeloid leukemia and myeloablation using chimeric antigen receptor-modified T cells. *Blood* 123(15), pp. 2343–2354.
- Godwin, C.D., Gale, R.P. and Walter, R.B. 2017. Gemtuzumab ozogamicin in acute myeloid leukemia. *Leukemia* 31(9), pp. 1855–1868.
- Godwin, C.D., McDonald, G.B. and Walter, R.B. 2017. Sinusoidal obstruction syndrome following CD33-targeted therapy in acute myeloid leukemia. *Blood* 129(16), pp. 2330–2332.
- Guedan, S., Chen, X., Madar, A., Carpenito, C., McGettigan, S.E., Frigault, M.J., Lee, J., Posey, A.D., Scholler, J., Scholler, N., Bonneau, R. and June, C.H. 2014. ICOS-based chimeric antigen receptors program bipolar TH17/TH1 cells. *Blood* 124(7), pp. 1070–1080.
- Guffroy, M., Falahatpisheh, H., Biddle, K., Kreeger, J., Obert, L., Walters, K., Goldstein, R., Boucher, G., Coskran, T., Reagan, W., Sullivan, D., Huang, C., Sokolowski, S., Giovanelli, R., Gerber, H.-P., Finkelstein, M. and Khan, N. 2017. Liver Microvascular Injury and Thrombocytopenia of Antibody-Calicheamicin Conjugates in Cynomolgus Monkeys-

- Mechanism and Monitoring. *Clinical Cancer Research* 23(7), pp. 1760–1770.
- Gunten, S. von and Bochner, B.S. 2008. Basic and clinical immunology of Siglecs. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1143, pp. 61–82.
- Heigwer, F., Kerr, G. and Boutros, M. 2014. E-CRISP: fast CRISPR target site identification. 11, 122-123 (2014). *Nat. Methods* 11, pp. 122–123.
- Hills, R.K., Castaigne, S., Appelbaum, F.R., Delaunay, J., Petersdorf, S., Othus, M., Estey, E.H., Dombret, H., Chevret, S., Ifrah, N., Cahn, J.-Y., Récher, C., Chilton, L., Moorman, A.V. and Burnett, A.K. 2014. Addition of gemtuzumab ozogamicin to induction chemotherapy in adult patients with acute myeloid leukaemia: a meta-analysis of individual patient data from randomised controlled trials. *The Lancet Oncology* 15(9), pp. 986–996.
- Hoffmann, D., Schott, J.W., Geis, F.K., Lange, L., Müller, F.J., Lenz, D., Zychlinski, D., Steinemann, D., Morgan, M., Moritz, T. and Schambach, A. 2017. Detailed comparison of retroviral vectors and promoter configurations for stable and high transgene expression in human induced pluripotent stem cells. *Gene Therapy* 24(5), pp. 298–307.
- Holtan, S.G., Pasquini, M. and Weisdorf, D.J. 2014. Acute graft-versus-host disease: a bench-to-bedside update. *Blood* 124(3), pp. 363–373.
- Horizon Discovery and Thermo Fisher Scientific 2018. Dose response curve for antibiotic selection of mammalian cells (kill curve) [Online]. Available at: <http://dharmacon.horizondiscovery.com/uploadedFiles/Resources/antibiotic-kill-curve-protocol.pdf> [Accessed: 5 August 2018].
- Hoseini, S.S. and Cheung, N.K. 2017. Acute myeloid leukemia targets for bispecific antibodies. *Blood cancer journal* 7(2), p. e522.
- Jain, M.D., Bachmeier, C.A., Phuoc, V.H. and Chavez, J.C. 2018. Axicabtagene ciloleucel (KTE-C19), an anti-CD19 CAR T therapy for the treatment of relapsed/refractory aggressive B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *Therapeutics and Clinical Risk Management* 14, pp. 1007–1017.
- Jen, E.Y., Ko, C.-W., Lee, J.E., Del Valle, P.L., Aydanian, A., Jewell, C., Norsworthy, K.J., Przepiorka, D., Nie, L., Liu, J., Sheth, C.M., Shapiro, M., Farrell, A.T. and Pazdur, R. 2018. FDA Approval: Gemtuzumab Ozogamicin for the Treatment of Adults with Newly Diagnosed CD33-Positive Acute Myeloid Leukemia. *Clinical Cancer Research*.
- Jiang, W., Hua, R., Wei, M., Li, C., Qiu, Z., Yang, X. and Zhang, C. 2015. An optimized method for high-titer lentivirus preparations without ultracentrifugation. *Scientific reports* 5, p. 13875.
- Kantarjian, H.M., DeAngelo, D.J., Stelljes, M., Martinelli, G., Liedtke, M., Stock, W., Gökbüget, N., O'Brien, S., Wang, K., Wang, T., Paccagnella, M.L., Sleight, B., Vandendries, E. and Advani, A.S. 2016. Inotuzumab Ozogamicin versus Standard Therapy for Acute Lymphoblastic Leukemia. *The New England Journal of Medicine* 375(8), pp. 740–753.
- Kasakovski, D., Xu, L. and Li, Y. 2018. T cell senescence and CAR-T cell exhaustion in hematological malignancies. *Journal of hematology & oncology* 11(1), p. 91.
- Kassner, U., Hollstein, T., Grenkowitz, T., Wühle-Demuth, M., Salewsky, B., Demuth, I.,

- Dippel, M. and Steinhagen-Thiessen, E. 2018. Gene Therapy in Lipoprotein Lipase Deficiency: Case Report on the First Patient Treated with Alipogene Tiparvovec Under Daily Practice Conditions. *Human Gene Therapy* 29(4), pp. 520–527.
- Kenderian, S.S., Ruella, M., Shestova, O., Klichinsky, M., Aikawa, V., Morrisette, J.J.D., Scholler, J., Song, D., Porter, D.L., Carroll, M., June, C.H. and Gill, S. 2015. CD33-specific chimeric antigen receptor T cells exhibit potent preclinical activity against human acute myeloid leukemia. *Leukemia* 29(8), pp. 1637–1647.
- Kent, W.J., Sugnet, C.W., Furey, T.S., Roskin, K.M., Pringle, T.H., Zahler, A.M. and Haussler, D. 2002. The human genome browser at UCSC. *Genome Research* 12(6), pp. 996–1006.
- Kim, M.Y., Kenderian, S.S., Schreeder, D., Klichinsky, M., Kozlowski, M., Shestova, O., Ruella, M. and Gill, S.I. 2016. Engineering Resistance to Antigen-Specific Immunotherapy in Normal Hematopoietic Stem Cells By Gene Editing to Enable Targeting of Acute Myeloid Leukemia. *Blood*.
- Kim, M.Y., Yu, K.-R., Kenderian, S.S., Ruella, M., Chen, S., Shin, T.-H., Aljanahi, A.A., Schreeder, D., Klichinsky, M., Shestova, O., Kozlowski, M.S., Cummins, K.D., Shan, X., Shestov, M., Bagg, A., Morrisette, J.J.D., Sekhri, P., Lazzarotto, C.R., Calvo, K.R., Kuhns, D.B., Donahue, R.E., Behbehani, G.K., Tsai, S.Q., Dunbar, C.E. and Gill, S. 2018. Genetic inactivation of CD33 in hematopoietic stem cells to enable CAR T cell immunotherapy for acute myeloid leukemia. *Cell* 173(6), pp. 1439–1453.e19.
- Knapp, D.J.H.F., Hammond, C.A., Hui, T., van Loenhout, M.T.J., Wang, F., Aghaeepour, N., Miller, P.H., Moksa, M., Rabu, G.M., Beer, P.A., Pellacani, D., Humphries, R.K., Hansen, C., Hirst, M. and Eaves, C.J. 2018. Single-cell analysis identifies a CD33+ subset of human cord blood cells with high regenerative potential. *Nature Cell Biology* 20(6), pp. 710–720.
- Kowolik, C.M., Topp, M.S., Gonzalez, S., Pfeiffer, T., Olivares, S., Gonzalez, N., Smith, D.D., Forman, S.J., Jensen, M.C. and Cooper, L.J.N. 2006. CD28 costimulation provided through a CD19-specific chimeric antigen receptor enhances in vivo persistence and antitumor efficacy of adoptively transferred T cells. *Cancer Research* 66(22), pp. 10995–11004.
- Laborda, E., Mazagova, M., Shao, S., Wang, X., Quirino, H., Woods, A.K., Hampton, E.N., Rodgers, D.T., Kim, C.H., Schultz, P.G. and Young, T.S. 2017. Development of A Chimeric Antigen Receptor Targeting C-Type Lectin-Like Molecule-1 for Human Acute Myeloid Leukemia. *International Journal of Molecular Sciences* 18(11).
- Labuhn, M., Adams, F.F., Ng, M., Knoess, S., Schambach, A., Charpentier, E.M., Schwarzer, A., Mateo, J.L., Klusmann, J.-H. and Heckl, D. 2018. Refined sgRNA efficacy prediction improves large- and small-scale CRISPR-Cas9 applications. *Nucleic Acids Research* 46(3), pp. 1375–1385.
- Laing, A.A., Harrison, C.J., Gibson, B.E.S. and Keeshan, K. 2017. Unlocking the potential of anti-CD33 therapy in adult and childhood acute myeloid leukemia. *Experimental Hematology* 54, pp. 40–50.
- Lamba, J.K., Chauhan, L., Shin, M., Loken, M.R., Pollard, J.A., Wang, Y.-C., Ries, R.E., Aplenc, R., Hirsch, B.A., Raimondi, S.C., Walter, R.B., Bernstein, I.D., Gamis, A.S., Alonzo,

- T.A. and Meshinchi, S. 2017. CD33 splicing polymorphism determines gemtuzumab ozogamicin response in de novo acute myeloid leukemia: report from randomized phase III children's oncology group trial AAML0531. *Journal of Clinical Oncology* 35(23), pp. 2674–2682.
- Larson, S.M., Truscott, L.C., Chiou, T.-T., Patel, A., Kao, R., Tu, A., Tyagi, T., Lu, X., Elashoff, D. and De Oliveira, S.N. 2017. Pre-clinical development of gene modification of haematopoietic stem cells with chimeric antigen receptors for cancer immunotherapy. *Human vaccines & immunotherapeutics* 13(5), pp. 1094–1104.
- Laszlo, G.S., Estey, E.H. and Walter, R.B. 2014. The past and future of CD33 as therapeutic target in acute myeloid leukemia. *Blood Reviews* 28(4), pp. 143–153.
- Lek, M., Karczewski, K.J., Minikel, E.V., Samocha, K.E., Exome Aggregation Consortium, et al. 2016. Analysis of protein-coding genetic variation in 60,706 humans. *Nature* 536(7616), pp. 285–291.
- Liu, E., Tong, Y., Dotti, G., Shaim, H., Savoldo, B., Mukherjee, M., Orange, J., Wan, X., Lu, X., Reynolds, A., Gagea, M., Banerjee, P., Cai, R., Bdaiwi, M.H., Basar, R., Muftuoglu, M., Li, L., Marin, D., Wierda, W., Keating, M., Champlin, R., Shpall, E. and Rezvani, K. 2018. Cord blood NK cells engineered to express IL-15 and a CD19-targeted CAR show long-term persistence and potent antitumor activity. *Leukemia* 32(2), pp. 520–531.
- Long, A.H., Haso, W.M., Shern, J.F., Wanhainen, K.M., Murgai, M., Ingaramo, M., Smith, J.P., Walker, A.J., Kohler, M.E., Venkateshwara, V.R., Kaplan, R.N., Patterson, G.H., Fry, T.J., Orentas, R.J. and Mackall, C.L. 2015. 4-1BB costimulation ameliorates T cell exhaustion induced by tonic signaling of chimeric antigen receptors. *Nature Medicine* 21(6), pp. 581–590.
- Luger, S.M. 2017. How can one optimize induction therapy in AML? *Best Practice & Research. Clinical Haematology* 30(4), pp. 301–305.
- Majzner, R.G. and Mackall, C.L. 2018. Tumor Antigen Escape from CAR T-cell Therapy. *Cancer discovery*.
- Mardiros, A., Santos, C. Dos, McDonald, T., Brown, C.E., Wang, X., Budde, L.E., Hoffman, L., Aguilar, B., Chang, W.-C., Bretzlaff, W., Chang, B., Jonnalagadda, M., Starr, R., Ostberg, J.R., Jensen, M.C., Bhatia, R. and Forman, S.J. 2013. T cells expressing CD123-specific chimeric antigen receptors exhibit specific cytolytic effector functions and antitumor effects against human acute myeloid leukemia. *Blood* 122(18), pp. 3138–3148.
- Maude, S.L., Laetsch, T.W., Buechner, J., Rives, S., Boyer, M., Bittencourt, H., Bader, P., Verneris, M.R., Stefanski, H.E., Myers, G.D., Qayed, M., De Moerloose, B., Hiramatsu, H., Schlis, K., Davis, K.L., Martin, P.L., Nemecek, E.R., Yanik, G.A., Peters, C., Baruchel, A., Boissel, N., Mechinaud, F., Balduzzi, A., Krueger, J., June, C.H., Levine, B.L., Wood, P., Taran, T., Leung, M., Mueller, K.T., Zhang, Y., Sen, K., Lebwohl, D., Pulsipher, M.A. and Grupp, S.A. 2018. Tisagenlecleucel in Children and Young Adults with B-Cell Lymphoblastic Leukemia. *The New England Journal of Medicine* 378(5), pp. 439–448.
- Maus, M.V. and June, C.H. 2016. Making Better Chimeric Antigen Receptors for Adoptive T-cell Therapy. *Clinical Cancer Research* 22(8), pp. 1875–1884.
- McKoy, J.M., Angelotta, C., Bennett, C.L., Tallman, M.S., Wadleigh, M., Evens, A.M.,

- Kuzel, T.M., Trifilio, S.M., Raisch, D.W., Kell, J., DeAngelo, D.J. and Giles, F.J. 2007. Gemtuzumab ozogamicin-associated sinusoidal obstructive syndrome (SOS): an overview from the research on adverse drug events and reports (RADAR) project. *Leukemia Research* 31(5), pp. 599–604.
- Mejstříková, E., Hrusak, O., Borowitz, M.J., Whitlock, J.A., Brethon, B., Trippett, T.M., Zugmaier, G., Gore, L., Stackelberg, A. von and Locatelli, F. 2017. CD19-negative relapse of pediatric B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia following blinatumomab treatment. *Blood cancer journal* 7(12), p. 659.
- Morgan, R.A., Yang, J.C., Kitano, M., Dudley, M.E., Laurencot, C.M. and Rosenberg, S.A. 2010. Case report of a serious adverse event following the administration of T cells transduced with a chimeric antigen receptor recognizing ERBB2. *Molecular Therapy* 18(4), pp. 843–851.
- Muhammad, N., Mao, Q. and Xia, H. 2017. CAR T-cells for cancer therapy. *Biotechnology & Genetic Engineering Reviews* 33(2), pp. 190–226.
- Narasimhan, V.M., Hunt, K.A., Mason, D., Baker, C.L., Karczewski, K.J., Barnes, M.R., Barnett, A.H., Bates, C., Bellary, S., Bockett, N.A., Giorda, K., Griffiths, C.J., Hemingway, H., Jia, Z., Kelly, M.A., Khawaja, H.A., Lek, M., McCarthy, S., McEachan, R., O'Donnell-Luria, A., Paigen, K., Parisinos, C.A., Sheridan, E., Southgate, L., Tee, L., Thomas, M., Xue, Y., Schnall-Levin, M., Petkov, P.M., Tyler-Smith, C., Maher, E.R., Trembath, R.C., MacArthur, D.G., Wright, J., Durbin, R. and van Heel, D.A. 2016. Health and population effects of rare gene knockouts in adult humans with related parents. *Science* 352(6284), pp. 474–477.
- Naso, M.F., Tomkowicz, B., Perry, W.L. and Strohl, W.R. 2017. Adeno-Associated Virus (AAV) as a Vector for Gene Therapy. *Biodrugs: Clinical Immunotherapeutics, Biopharmaceuticals and Gene Therapy* 31(4), pp. 317–334.
- Neelapu, S.S., Tummala, S., Kebriaei, P., Wierda, W., Gutierrez, C., Locke, F.L., Komanduri, K.V., Lin, Y., Jain, N., Daver, N., Westin, J., Gulbis, A.M., Loghin, M.E., de Groot, J.F., Adkins, S., Davis, S.E., Rezvani, K., Hwu, P. and Shpall, E.J. 2018. Chimeric antigen receptor T-cell therapy - assessment and management of toxicities. *Nature Reviews. Clinical Oncology* 15(1), pp. 47–62.
- Newcombe, A.A., Gibson, B.E.S. and Keeshan, K. 2018. Harnessing the potential of epigenetic therapies for childhood acute myeloid leukemia. *Experimental Hematology* 63, pp. 1–11.
- Norelli, M., Camisa, B., Barbiera, G., Falcone, L., Purevdorj, A., Genua, M., Sanvito, F., Ponzoni, M., Doglioni, C., Cristofori, P., Traversari, C., Bordignon, C., Ciceri, F., Ostuni, R., Bonini, C., Casucci, M. and Bondanza, A. 2018. Monocyte-derived IL-1 and IL-6 are differentially required for cytokine-release syndrome and neurotoxicity due to CAR T cells. *Nature Medicine* 24(6), pp. 739–748.
- O'Hear, C., Heiber, J.F., Schubert, I., Fey, G. and Geiger, T.L. 2015. Anti-CD33 chimeric antigen receptor targeting of acute myeloid leukemia. *Haematologica* 100(3), pp. 336–344.
- Olweus, J., Lund-Johansen, F. and Terstappen, L.W. 1994. Expression of cell surface markers during differentiation of CD34+, CD38-/lo fetal and adult bone marrow cells. *ImmunoMethods*

5(3), pp. 179–188.

Pelosi, E., Castelli, G. and Testa, U. 2015. Targeting LSCs through membrane antigens selectively or preferentially expressed on these cells. *Blood Cells, Molecules & Diseases* 55(4), pp. 336–346.

Penaud-Budloo, M., François, A., Clément, N. and Ayuso, E. 2018. Pharmacology of Recombinant Adeno-associated Virus Production. *Molecular therapy. Methods & clinical development* 8, pp. 166–180.

Pical-Izard, C., Crocchiolo, R., Granjeaud, S., Kochbati, E., Just-Landi, S., Chabannon, C., Frassati, C., Picard, C., Blaise, D., Olive, D. and Fauriat, C. 2015. Reconstitution of natural killer cells in HLA-matched HSCT after reduced-intensity conditioning: impact on clinical outcome. *Biology of Blood and Marrow Transplantation* 21(3), pp. 429–439.

Pizzitola, I., Anjos-Afonso, F., Rouault-Pierre, K., Lassailly, F., Tettamanti, S., Spinelli, O., Biondi, A., Biagi, E. and Bonnet, D. 2014. Chimeric antigen receptors against CD33/CD123 antigens efficiently target primary acute myeloid leukemia cells in vivo. *Leukemia* 28(8), pp. 1596–1605.

Pulè, M.A., Straathof, K.C., Dotti, G., Heslop, H.E., Rooney, C.M. and Brenner, M.K. 2005. A chimeric T cell antigen receptor that augments cytokine release and supports clonal expansion of primary human T cells. *Molecular Therapy* 12(5), pp. 933–941.

Ran, F.A., Hsu, P.D., Wright, J., Agarwala, V., Scott, D.A. and Zhang, F. 2013. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nature Protocols* 8(11), pp. 2281–2308.

Robbins, P.F., Dudley, M.E., Wunderlich, J., El-Gamil, M., Li, Y.F., Zhou, J., Huang, J., Powell, D.J. and Rosenberg, S.A. 2004. Cutting edge: persistence of transferred lymphocyte clonotypes correlates with cancer regression in patients receiving cell transfer therapy. *Journal of Immunology* 173(12), pp. 7125–7130.

Ruella, M., Barrett, D.M., Kenderian, S.S., Shestova, O., Hofmann, T.J., Perazzelli, J., Klichinsky, M., Aikawa, V., Nazimuddin, F., Kozlowski, M., Scholler, J., Lacey, S.F., Melenhorst, J.J., Morrisette, J.J.D., Christian, D.A., Hunter, C.A., Kalos, M., Porter, D.L., June, C.H., Grupp, S.A. and Gill, S. 2016. Dual CD19 and CD123 targeting prevents antigen-loss relapses after CD19-directed immunotherapies. *The Journal of Clinical Investigation* 126(10), pp. 3814–3826.

Ruella, M., Kenderian, S.S., Shestova, O., Fraietta, J.A., Qayyum, S., Zhang, Q., Maus, M.V., Liu, X., Nunez-Cruz, S., Klichinsky, M., Kawalekar, O.U., Milone, M., Lacey, S.F., Mato, A., Schuster, S.J., Kalos, M., June, C.H., Gill, S. and Wasik, M.A. 2016. The Addition of the BTK Inhibitor Ibrutinib to Anti-CD19 Chimeric Antigen Receptor T Cells (CART19) Improves Responses against Mantle Cell Lymphoma. *Clinical Cancer Research* 22(11), pp. 2684–2696.

Sadelain, M., Brentjens, R. and Rivière, I. 2013. The basic principles of chimeric antigen receptor design. *Cancer discovery* 3(4), pp. 388–398.

Sahin, A., Sanchez, C., Bullain, S., Waterman, P., Weissleder, R. and Carter, B.S. 2018. Development of third generation anti-EGFRvIII chimeric T cells and EGFRvIII-expressing artificial antigen presenting cells for adoptive cell therapy for glioma. *Plos One* 13(7), p. e0199414.

Saleheen, D., Natarajan, P., Armean, I.M., Zhao, W., Rasheed, A., Khetarpal, S.A., Won, H.-H., Karczewski, K.J., O'Donnell-Luria, A.H., Samocha, K.E., Weisburd, B., Gupta, N., Zaidi, M., Samuel, M., Imran, A., Abbas, S., Majeed, F., Ishaq, M., Akhtar, S., Trindade, K., Mucksavage, M., Qamar, N., Zaman, K.S., Yaqoob, Z., Saghir, T., Rizvi, S.N.H., Memon, A., Hayyat Mallick, N., Ishaq, M., Rasheed, S.Z., Memon, F.-U.-R., Mahmood, K., Ahmed, N., Do, R., Krauss, R.M., MacArthur, D.G., Gabriel, S., Lander, E.S., Daly, M.J., Frossard, P., Danesh, J., Rader, D.J. and Kathiresan, S. 2017. Human knockouts and phenotypic analysis in a cohort with a high rate of consanguinity. *Nature* 544(7649), pp. 235–239.

Santomasso, B.D., Park, J.H., Salloum, D., Rivière, I., Flynn, J., Mead, E., Halton, E., Wang, X., Senechal, B., Purdon, T., Cross, J.R., Liu, H., Vachha, B., Chen, X., DeAngelis, L.M., Li, D., Bernal, Y., Gonen, M., Wendel, H.-G., Sadelain, M. and Brentjens, R.J. 2018. Clinical and Biologic Correlates of Neurotoxicity Associated with CAR T Cell Therapy in Patients with B-cell Acute Lymphoblastic Leukemia (B-ALL). *Cancer discovery*.

Schmitt, T.M., Stromnes, I.M., Chapuis, A.G. and Greenberg, P.D. 2015. New Strategies in Engineering T-cell Receptor Gene-Modified T cells to More Effectively Target Malignancies. *Clinical Cancer Research* 21(23), pp. 5191–5197.

Seiler, M.P., Miller, A.D., Zabner, J. and Halbert, C.L. 2006. Adeno-associated virus types 5 and 6 use distinct receptors for cell entry. *Human Gene Therapy* 17(1), pp. 10–19.

Sharma, R., Anguela, X.M., Doyon, Y., Wechsler, T., DeKolver, R.C., Sproul, S., Paschon, D.E., Miller, J.C., Davidson, R.J., Shivak, D., Zhou, S., Rieders, J., Gregory, P.D., Holmes, M.C., Rebar, E.J. and High, K.A. 2015. In vivo genome editing of the albumin locus as a platform for protein replacement therapy. *Blood* 126(15), pp. 1777–1784.

Shem-Tov, N., Saraceni, F., Danylesko, I., Shouval, R., Yerushalmi, R., Nagler, A. and Shimoni, A. 2017. Isolated Extramedullary Relapse of Acute Leukemia after Allogeneic Stem Cell Transplantation: Different Kinetics and Better Prognosis than Systemic Relapse. *Biology of Blood and Marrow Transplantation* 23(7), pp. 1087–1094.

Smith, J.K. and Agbandje-McKenna, M. 2018. Creating an arsenal of Adeno-associated virus (AAV) gene delivery stealth vehicles. *PLoS Pathogens* 14(5), p. e1006929.

van der Stegen, S.J.C., Hamieh, M. and Sadelain, M. 2015. The pharmacology of second-generation chimeric antigen receptors. *Nature Reviews. Drug Discovery* 14(7), pp. 499–509.

Stein, E.M., Walter, R.B., Erba, H.P., Fathi, A.T., Advani, A.S., Lancet, J.E., Ravandi, F., Kovacsovics, T., DeAngelo, D.J., Bixby, D., Faderl, S., Jillella, A.P., Ho, P.A., O'Meara, M.M., Zhao, B., Biddle-Snead, C. and Stein, A.S. 2018. A phase 1 trial of vadastuximab talirine as monotherapy in patients with CD33-positive acute myeloid leukemia. *Blood* 131(4), pp. 387–396.

Sulem, P., Helgason, H., Oddson, A., Stefansson, H., Gudjonsson, S.A., Zink, F., Hjartarson, E., Sigurdsson, G.T., Jonasdottir, A., Jonasdottir, A., Sigurdsson, A., Magnusson, O.T., Kong, A., Helgason, A., Holm, H., Thorsteinsdottir, U., Masson, G., Gudbjartsson, D.F. and Stefansson, K. 2015. Identification of a large set of rare complete human knockouts. *Nature Genetics* 47(5), pp. 448–452.

Tasian, S.K., Bornhäuser, M. and Rutella, S. 2018. Targeting leukemia stem cells in the bone

marrow niche. *Biomedicines* 6(1).

Taussig, D.C., Pearce, D.J., Simpson, C., Rohatiner, A.Z., Lister, T.A., Kelly, G., Luongo, J.L., Danet-Desnoyers, G.-A.H. and Bonnet, D. 2005. Hematopoietic stem cells express multiple myeloid markers: implications for the origin and targeted therapy of acute myeloid leukemia. *Blood* 106(13), pp. 4086–4092.

Thermo Fisher Scientific 2018. Puromycin [Online]. Available at: <https://www.thermofisher.com/ca/en/home/life-science/cell-culture/transfection/selection/puromycin.html> [Accessed: 4 August 2018].

Velten, L., Haas, S.F., Raffel, S., Blaszkiewicz, S., Islam, S., Hennig, B.P., Hirche, C., Lutz, C., Buss, E.C., Nowak, D., Boch, T., Hofmann, W.-K., Ho, A.D., Huber, W., Trumpp, A., Essers, M.A.G. and Steinmetz, L.M. 2017. Human haematopoietic stem cell lineage commitment is a continuous process. *Nature Cell Biology* 19(4), pp. 271–281.

Voutsadakis, I.A. 2002. Gemtuzumab Ozogamicin (CMA-676, Mylotarg) for the treatment of CD33+ acute myeloid leukemia. *Anti-Cancer Drugs* 13(7), pp. 685–692.

Wadleigh, M., Richardson, P.G., Zahrieh, D., Lee, S.J., Cutler, C., Ho, V., Alyea, E.P., Antin, J.H., Stone, R.M., Soiffer, R.J. and DeAngelo, D.J. 2003. Prior gemtuzumab ozogamicin exposure significantly increases the risk of veno-occlusive disease in patients who undergo myeloablative allogeneic stem cell transplantation. *Blood* 102(5), pp. 1578–1582.

Wang, J., Jensen, M., Lin, Y., Sui, X., Chen, E., Lindgren, C.G., Till, B., Raubitschek, A., Forman, S.J., Qian, X., James, S., Greenberg, P., Riddell, S. and Press, O.W. 2007. Optimizing adoptive polyclonal T cell immunotherapy of lymphomas, using a chimeric T cell receptor possessing CD28 and CD137 costimulatory domains. *Human Gene Therapy* 18(8), pp. 712–725.

Wang, Q., Wang, Y., Lv, H., Han, Q., Fan, H., Guo, B., Wang, L. and Han, W. 2015. Treatment of CD33-directed chimeric antigen receptor-modified T cells in one patient with relapsed and refractory acute myeloid leukemia. *Molecular Therapy* 23(1), pp. 184–191.

Wang, Y., Zhang, W., Han, Q., Liu, Y., Dai, H., Guo, Y., Bo, J., Fan, H., Zhang, Y., Zhang, Y., Chen, M., Feng, K., Wang, Q., Fu, X. and Han, W. 2014. Effective response and delayed toxicities of refractory advanced diffuse large B-cell lymphoma treated by CD20-directed chimeric antigen receptor-modified T cells. *Clinical Immunology* 155(2), pp. 160–175.

Warren, E.H. and Deeg, H.J. 2013. Dissecting graft-versus-leukemia from graft-versus-host-disease using novel strategies. *Tissue Antigens* 81(4), pp. 183–193.

Wilkie, S., Picco, G., Foster, J., Davies, D.M., Julien, S., Cooper, L., Arif, S., Mather, S.J., Taylor-Papadimitriou, J., Burchell, J.M. and Maher, J. 2008. Retargeting of human T cells to tumor-associated MUC1: the evolution of a chimeric antigen receptor. *Journal of Immunology* 180(7), pp. 4901–4909.

Winiarska, M., Nowis, D., Firczuk, M., Zagozdzon, A., Gabrysiak, M., Sadowski, R., Barankiewicz, J., Dwojak, M. and Golab, J. 2017. Selection of an optimal promoter for gene transfer in normal B cells. *Molecular medicine reports* 16(3), pp. 3041–3048.

Xia, A.-L., He, Q.-F., Wang, J.-C., Zhu, J., Sha, Y.-Q., Sun, B. and Lu, X.-J. 2018.

Applications and advances of CRISPR-Cas9 in cancer immunotherapy. *Journal of Medical Genetics*.

Yang, Y., Kohler, M.E., Chien, C.D., Sauter, C.T., Jacoby, E., Yan, C., Hu, Y., Wanhainen, K., Qin, H. and Fry, T.J. 2017. TCR engagement negatively affects CD8 but not CD4 CAR T cell expansion and leukemic clearance. *Science Translational Medicine* 9(417).

Zah, E., Lin, M.-Y., Silva-Benedict, A., Jensen, M.C. and Chen, Y.Y. 2016. T cells expressing CD19/CD20 bispecific chimeric antigen receptors prevent antigen escape by malignant B cells. *Cancer immunology research* 4(6), pp. 498–508.

Zhang, C., Liu, J., Zhong, J.F. and Zhang, X. 2017. Engineering CAR-T cells. *Biomarker research* 5, p. 22.

Zhang, T., Cao, L., Xie, J., Shi, N., Zhang, Z., Luo, Z., Yue, D., Zhang, Z., Wang, L., Han, W., Xu, Z., Chen, H. and Zhang, Y. 2015. Efficiency of CD19 chimeric antigen receptor-modified T cells for treatment of B cell malignancies in phase I clinical trials: a meta-analysis. *Oncotarget* 6(32), pp. 33961–33971.

Zhao, Z., Condomines, M., van der Stegen, S.J.C., Perna, F., Kloss, C.C., Gunset, G., Plotkin, J. and Sadelain, M. 2015. Structural design of engineered costimulation determines tumor rejection kinetics and persistence of CAR T cells. *Cancer Cell* 28(4), pp. 415–428.

Zhong, X.-S., Matsushita, M., Plotkin, J., Riviere, I. and Sadelain, M. 2010. Chimeric antigen receptors combining 4-1BB and CD28 signaling domains augment PI3kinase/AKT/Bcl-XL activation and CD8⁺ T cell-mediated tumor eradication. *Molecular Therapy* 18(2), pp. 413–420.

Annexe A : Séquence du fragment ScFv My96 ciblant le CD33

5'-

ATGGCCCTGCCTGTGACAGCCCTGCTGCTGCCTCTGGCTCTGCTGCTGCATGCCGC
TAGACCCGGATCCGAGATCGTGCTGACACAGAGCCCTGGAAGCCTGGCCGTGTCT
CCTGGCGAGCGCGTGACAATGAGCTGCAAGAGCAGCCAGAGCGTGTTCTTCAGCAG
CTCCCAGAAGAACTACCTGGCCTGGTATCAGCAGATCCCCGGCCAGAGCCCCAGAC
TGCTGATCTACTGGGCCAGCACCAGAGAAAGCGGCGTGCCCGATAGATTCACCGG
CAGCGGCTCTGGCACCGACTTCACCCTGACAATCAGCAGCGTGCAGCCCGAGGAC
CTGGCCATCTACTACTGCCACCAGTACCTGAGCAGCCGGACCTTTGGCCAGGGCA
CCAAGCTGGAAATCAAGAGAGGCGGCGGAGGCTCTGGCGGAGGCGGATCTAGTG
GCGGAGGATCTCAGGTGCAGCTGCAGCAGCCTGGCGCCGAGGTCGTGAAACCTGG
CGCTCTGTGAAGATGTCCTGCAAGGCCAGCGGCTACACCTTCACCAGCTACTAC
ATCCACTGGATCAAGCAGACCCCTGGACAGGGCCTGGAATGGGTGGGAGTGATCT
ACCCCGGCAACGACGACATCAGCTACAACCAGAAGTTCCAGGGCAAGGCCACCCT
GACCGCCGACAAGTCTAGCACCACCGCCTACATGCAGCTGTCCAGCCTGACCAGC
GAGGACAGCGCCGTGTACTACTGCGCCAGAGAAGTGCGGCTGCGGTACTIONCGATG
TGTGGGGCCAGGGAACCACCGTGACCGTGTCATCA - 3'