

Ecole doctorale sciences de la vie et de la santé

Institute of Human Biology (Roche)

THÈSE présentée par / DISSERTATION presented by : **Aurélie Hérault**

soutenue le /defended on : 27 janvier 2025

pour obtenir le grade de / to obtain the grade of :
Docteur de l'Université de Strasbourg / Strasbourg University Doctor
Discipline/S spécialité / Discipline/Specialty : sciences de la vie et de la santé

Régulation ciblée des cellules myéloïdes dans la moelle osseuse et activation accrue des lymphocytes T dans les tumeurs mammaires pour une amélioration des traitements anticancéreux

THÈSE dirigée par / DISSERTATION supervisor :

Philippe GEORGEL

PR, Université de Strasbourg

RAPPORTEURS :Alexandre DETAPPE
Marie-Thérèse RUBIOPR, Université de Strasbourg
PR, PhD, CHU Nancy**AUTRES MEMBRES DU JURY / OTHER MEMBERS OF THE JURY :**Thierry CHARDES
Maria GARCIA-LEON
Isabelle COMBROUX
Carole MAILLIERDR, Institut de recherche en cancérologie Montpellier
PhD, Domain Therapeutics
PR, Université de Strasbourg
Directrice SFC, Université de Strasbourg

Avertissement au lecteur / Warning to the reader

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition des membres de la communauté universitaire. Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Cela implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document. D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction ou représentation illicite encourt une poursuite pénale.

This document is the result of a long process approved by the jury and made available to members of the university community. It is subject to the intellectual property rights of its author. This implies an obligation to quote and reference when using this document. Furthermore, any infringement, plagiarism, unlawful reproduction or representation will be prosecuted.

Code de la Propriété Intellectuelle

Article L122-4 :

Toute représentation ou reproduction intégrale ou partielle faite sans le consentement de l'auteur ou de ses ayants droit ou ayants cause est illicite. Il en est de même pour la traduction, l'adaptation ou la transformation, l'arrangement ou la reproduction par un art ou un procédé quelconque.

Any representation or reproduction in whole or in part without the consent of the author or his successors in title or assigns is unlawful. The same applies to translation, adaptation or transformation, arrangement or reproduction by any art or process whatsoever.

Articles L335-1 à L335-9 : Dispositions pénales / Penal provisions.

Licence attribuée par l'auteur / Licence attributed by the author

[Veillez à ne conserver que la licence qui vous convient / Make sure you only keep the licence that suits you best]



<https://creativecommons.org/licenses/?lang=fr-FR>

SOMMAIRE

INTRODUCTION	2
1. Mes débuts en oncologie	3
1.1. Compréhension des altérations génétiques dans les cancers	3
1.2. Compréhension des altérations génétiques dans le cancer de vessie	4
1.3. Compréhension des altérations épigénétiques dans le cancer de vessie	5
1.4. Les diplômes et présentations	5
1.5. Encadrement d'étudiant et collaborations	6
2. Etude de cellules progénitrices myéloïdes durant la régénération et la leucémie dans la moelle osseuse	6
2.1. Travaux de recherche	7
a- Altération de l'organisation spatiale des GMP lors de la leucémie et la régénération d'urgence myélocytaire	7
b- Les caractéristiques cellulaires des clusters de GMP (cGMP)	8
c- Signature moléculaire des clusters de GMP	9
d- Réseau d'auto-renouvellement des GMPs	10
e- Niches de la moelle osseuse contrôlant la formation de clusters GMP	10
2.2. Collaborations/publications	13
2.3. Les présentations	13
2.4. Les encadrements	14
3. Etude de l'efficacité de l'activité de NKG2D dans le cancer du sein	14
3.1. Travaux de recherche	15
a- NKG2D est un facteur pronostique dans le cancer du sein triple négatif (TNBC) et son expression est restreinte aux cellules CD8+ T	15
b- Le récepteur co-stimulateur bispécifique NKG2D (CRB) active et engage les cellules NK	16
c- Le NKG2D-CRB augmente l'activation et la cytotoxicité des cellules CD8+ T lorsqu'il est combiné avec HER2-4D5-TDB	18
d- Le NKG2D-CRB induit une activité anti-tumorale et augmente la fonction effectrice des cellules NK et CD8+ T	19
3.2. Les publications/les collaborations	20
3.3. Les présentations	21
CONCLUSIONS	22

INTRODUCTION

Mesdames et Messieurs, les membres du jury de la formation VAE de l'Université de Strasbourg, je m'appelle Aurélie Hérault et je désire candidater pour une validation de mes acquis afin d'obtenir un diplôme de doctorat.

J'ai toujours eu une passion pour la biologie et dès la fin du collège, j'ai su que je voulais travailler dans la science. Je me suis donc très tôt dirigée vers des études de biologie et j'ai obtenu mon Baccalauréat STL option Biochimie, génie Biologie. J'avais pour ambition de participer à la compréhension des mécanismes impliqués dans les maladies telles que le cancer afin de traiter les patients. Persuadée de vouloir travailler dans la recherche scientifique, j'ai décidé d'effectuer un BTS Biotechnologie au lycée Pierre Gilles de Gennes-ENCPB à Paris durant lequel j'ai eu deux stages dans des laboratoires de recherche. L'environnement en laboratoire m'a tout de suite plu ainsi que la dynamique de faire des expériences, l'innovation et les connaissances illimitées des sciences et techniques.

Cette volonté de travailler dans la recherche sur le cancer ne m'a pas quitté, et j'ai eu la chance d'obtenir un premier travail en tant qu'assistante ingénieur dans le laboratoire du Dr. Jessica Zucman-Rossi à l'INSERM/Fondation Jean Dausset (U674) qui est maintenant directrice de recherche au centre de recherche des cordeliers, INSERM UMR S1138.

Dans ce laboratoire, j'étais responsable de la maintenance d'une banque d'échantillon humain de cancer du foie sur lesquels j'étudiais les mutations génétiques par séquençage direct.

Grace à cette expérience, j'ai obtenu un poste au CNRS au sein de l'UMR 144 à l'institut Curie et ai intégré l'équipe du Dr. François Radvanyi. J'étais responsable de la banque de tumeurs humaine de vessie et étudiais les mutations génétiques de ces dernières par séquençage direct. J'ai rapidement compris que si je voulais évoluer scientifiquement et avoir plus de responsabilité dans le futur il me fallait continuer mes études. Pour cela, j'ai commencé un diplôme EPHE (Ecole pratique de hautes études) et ai eu la chance de travailler sous la direction d'une étudiante de thèse, Céline Vallot. Ceci m'a permis de découvrir le domaine de l'épigénétique. J'ai ainsi étudié les altérations épigénétiques dans les cancers de vessie et en ai étudiés les mécanismes impliqués. Il m'a fallu trois ans pour valider ce diplôme à la suite duquel j'ai décidé de m'inscrire à l'université Paris XI afin de valider une deuxième année de Master en cancérologie que j'ai obtenu en 2011.

J'avais la sensation d'avoir de bonnes connaissances des tumeurs solides et étais très curieuse d'apprendre la biologie des cancers hématologiques. J'ai donc postulé pour un travail dans le laboratoire du Dr. Emmanuelle Passegué à l'UCSF (University of California San Francisco) à San Francisco. J'ai eu la chance d'intégrer son laboratoire en tant que lab manager/specialist, ce qui m'a permis de découvrir la biologie des cellules souches hématopoïétiques impliquées dans la régénération de la moelle osseuse, la leucémie et le vieillissement.

Lorsque le Dr. Passegué a décidé de déménager son laboratoire à New York, j'ai décidé de rester dans la région de San Francisco. Vivant dans la Bay Area, entourée de compagnies pharmaceutiques et start-up, cela m'a donné envie de découvrir la recherche appliquée. Du fait de mon expérience et de mes publications en premier auteur dont une publiée dans le très renommé journal scientifique, Nature, j'ai eu la chance d'obtenir un travail en tant que Principal Scientist Researcher à Genentech en Immunologie du cancer malgré l'absence du diplôme de thèse.

Je suis rentrée en France depuis juin 2022 et en cherchant du travail je me suis rendu compte que j'avais le profile pour postuler sur des postes de scientist mais le manque du diplôme de thèse me portait préjudice. J'ai finalement eu la chance de commencé récemment à l'IHB (Institute of Human Biology), un institut créé en 2021 sous le nom de ITB (Institute for Translational Bioengineering) puis renommé IHB en Mai 2023. Je travaille actuellement comme Principle Research Associate au sein du laboratoire du Dr. Cabon. Nous faisons l'interface entre la recherche innovante développée sur les organoids à l'IHB et l'industrie avec une priorité pour le groupe Roche. Notre mission est d'accélérer l'utilisation des organoids dans le but de tester de manière plus prédictive sur le plan de l'efficacité mais aussi de la toxicité les molécules développer en industrie. Malgré mon expérience, mon rôle dans la direction de projets et mes futurs rôles de manager, le manque de thèse m'empêchera d'être promu scientist.

Je suis toujours aussi passionnée par la recherche et désire vraiment travailler dans un environnement motivant, innovant et pouvoir évoluer dans ma position de scientifique. Je postule pour une validation de thèse via une VAE parce que je pense que je le mérite après tous ses travaux scientifiques que j'ai mené mais aussi parce que j'ai besoin de pouvoir me projeter à long terme dans la recherche, avec toujours de nouveaux challenges et de nouveaux buts qui feront que je resterai motivée et passionnée par mon travail. Je développerai dans les prochaines parties mon développement de compétences lors de mes travaux de recherche de ces 20 dernières années afin de vous démontrer que mon expérience professionnelle justifie une validation de thèse dans votre Université.

1. Mes débuts en oncologie

1.1. Compréhension des altérations génétiques dans les cancers

Peu après mon BTS Biotechnologie, j'ai obtenu un travail d'assistante ingénieure dans le laboratoire du Dr Jessica Zucman-Rossi, dont le laboratoire se focalise sur l'étude des cancers du foie.

Lorsque j'ai commencé, dans son laboratoire, ma mission a été de séquencer par la méthode de Sanger des gènes candidats, potentiellement altérés génétiquement dans les cancers du foie. J'ai donc appris comment extraire les acides nucléiques (ADN et ARN) ainsi que les protéines des échantillons humain de cancer du foie. De plus, j'ai appris à organiser et maintenir une banque de tissus humains. Enfin, j'ai appris à dessiner des primers en utilisant des bases de données du génome humain et à mettre au point toutes les conditions nécessaires au séquençage de plusieurs gènes candidats. J'ai pu aussi analyser, interpréter et présenter les résultats obtenus devant les laboratoires composant le département dont nous faisons partie.

Cette expérience m'a apporté des connaissances techniques mais aussi scientifiques sur les altérations génétiques en oncologie. L'environnement de laboratoire était très rigoureux et collaboratif, j'ai développé une rigueur scientifique ainsi qu'un esprit collaboratif qui ne m'ont jamais quitté.

Mon travail m'a permis d'être l'un des auteurs de deux papiers. En séquençant le gène KLF6 qui avait été décrit comme muté, nous nous sommes aperçus que le gène KLF6 n'était en fait pas altéré dans les cancers du foie. Nous avons attribué cette différence de résultats au fait que nous séquencions de l'ADN extrait de tissu congelé alors que l'autre équipe l'effectuait à partir d'ADN extrait de tissu en paraffine, un ADN de mauvaise qualité, ce qui entraînait des mutations spontanées lors de la PCR. Nous avons donc décrit nos résultats qui ont été publiés dans le journal Hepatology en 2005 (Boyault et al., 2005). De plus, mon travail a participé à l'étude sur la classification des cancers du foie menée par Sandrine Boyault, j'ai donc été un des auteurs de sa publication dans le journal Hepatology en 2007 (Boyault et al., 2007).

Cette expérience m'a permis d'obtenir un poste de technicien de recherche au CNRS au sein du laboratoire du Dr François Radvanyi à l'Institut Curie.

1.2. Compréhension des altérations génétiques dans le cancer de vessie

J'ai pu utiliser mes connaissances lorsque j'ai commencé dans le laboratoire du Dr François Radvanyi. Mon travail consistait en l'établissement et la maintenance d'une banque de plus de deux cent échantillons humains de cancer de vessie. J'ai donc participé avec d'autres techniciens en l'extraction des acides nucléiques (ADN et ARN) ainsi que des protéines par ultracentrifugation par le Chlorure de Césium. J'étais aussi chargé de séquencer par la méthode de Sanger des gènes suppresseurs de tumeurs et oncogènes candidats, susceptibles d'être impliqués dans les cancers de vessie. Cela m'a permis d'apprendre la rigueur dans l'organisation d'une banque d'échantillons humain. J'étais aussi responsable de la caractérisation de ces échantillons, en analysant les mutations les plus fréquentes du gène FGFR3 par la méthode de SNaPshot décrite par Johanna M.M. van Oers dans le journal Clin Cancer Res en 2005 (van Oers et al., 2005). En plus de FGFR3, je criblais d'autres gènes par séquençage direct avec la méthode de Sanger, tels que PI3KCA, KDM6A, Ras afin de pouvoir classifier les échantillons et faire des corrélations avec leurs données cliniques. Toute cette caractérisation a été la base de plusieurs études de recherche puisqu'elle permettait une classification et une sélection d'échantillons sur lesquels les scientifiques et bioinformaticiens basaient leurs études de recherche.

En plus des études mutationnelles, j'étudiais les délétions et insertions dans le génome des cancers de vessie, de manière globale en utilisant la méthode de CGH 500K (Comparative genomic hybridisation) ou de manière plus ciblée en utilisant la méthode MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification). J'ai utilisé la méthode MLPA dans le but d'étudier le rôle de P16 dans les cancers de vessie en ciblant le locus de P14, P15 et P16 (CDKN2A/CDKN2B) nous avons pu mettre en évidence la haute fréquence des délétions de ce même locus dans les cancers invasifs de la vessie. Ce travail a

été publié dans Journal of Pathology en 2012 dont je suis l'un des premiers auteurs (Rebouissou et al., 2012).

1.3. Compréhension des altérations épigénétiques dans le cancer de vessie

Ce début d'expérience n'a que confirmé ma passion pour la biologie, en particulier en Oncologie. Je voulais pouvoir évoluer professionnellement et gagner en indépendance dans les projets de recherche. J'ai donc décidé de continuer mes études dans le but de valider un diplôme de Master en faisant un diplôme EPHE (Ecole Pratique de Hautes Etudes). Le déroulement de ce diplôme consiste à travailler sur un projet de recherche tout en suivant des modules d'enseignements en relation avec le projet de recherche (au nombre de 6) avec un examen pour chacun d'entre eux afin de les valider en totalité. Pour valider ce diplôme, un mémoire doit être rédigé et défendu devant un jury.

En plus des altérations génétiques, de nombreuses altérations épigénétiques avaient été décrites, notamment dans le laboratoire, Nicolas Stransky et Céline Vallot, deux étudiant en thèse venaient de publier leurs travaux sur les cancers de vessie montrant des régions du génome arborant de la méthylation de l'ADN et des modifications des histones affectant la (Stransky et al., 2006). J'étais très intéressée d'approfondir mes connaissances dans ce domaine et j'ai eu la chance de travailler avec Céline Vallot. J'ai étudié les altérations épigénétiques des gènes CDH1 et TP53 et collaboré avec Céline sur son projet qui a été publié dans J Natl Cancer Inst en 2011 (Vallot et al., 2011). Décrire les techniques, les approches, ce que j'ai appris en termes de design, de connaissances scientifiques et de rigueur scientifique. Après trois ans j'ai finalement défendu mon projet et obtenu le diplôme EPHE en 2009.

Ce diplôme me donnait une équivalence de Master 1 et dans le but d'obtenir un diplôme de Master 2, je me suis donc inscrite en Master 2 en Cancérologie à l'Université Paris XI, aujourd'hui Paris Saclay. Tout en travaillant, j'ai donc suivi les modules d'enseignements et passé l'examen tout en travaillant et ai obtenu mon diplôme en 2010. Mon projet de recherche de Master consistait en étudiant les altérations épigénétiques dans les cancers de vessie et plus particulièrement, en comprendre les mécanismes. J'ai continué à travailler avec Céline Vallot et nos travaux nous ont permis de publier un papier en co-premier auteurs en 2015 dans le journal Oncogene (Vallot et al., 2015).

1.4. Les diplômes et présentations

A l'issue de mon deuxième stage de BTS, j'avais préparé une présentation et l'avais défendu devant un jury mais durant ces deux expériences scientifiques, j'ai régulièrement présenté en réunion de laboratoire et devant les départements. Ceci m'a permis d'acquérir une formation solide quant à la réflexion d'un projet de recherche, en sa construction et sa présentation. La lecture de publications scientifiques m'a permis de connaître et solidifier mes connaissances des différents domaines scientifiques dans lesquels je travaillais.

L'anglais a toujours été un vrai challenge pour moi et donc en plus de mon Master 2 en cancérologie, j'ai suivi des cours d'anglais afin de me perfectionner, de pouvoir interagir scientifiquement avec mes collègues étrangers. Je savais que si je décidais un jour d'être complètement indépendante sur un projet de recherche, présenter lors de conférences internationales et éventuellement de partir à l'étranger, il me fallait devenir bilingue en anglais. J'ai

aussi suivi un workshop d'une semaine en épigénétique à l'Institut Curie, les participants étaient pour la plupart des étudiants en thèse ou Post-Doc, cela m'a montré mes faiblesses et m'a poussé à aller par la suite plus loin dans la compréhension scientifique.

1.5. Encadrement d'étudiants et collaborations

J'ai obtenu une formation solide dans le séquençage direct de gènes par la méthode de Sanger dans le laboratoire du Docteur Jessica Zucman-Rossi. J'ai pu mettre en place des protocoles, encadrer et former techniquement des étudiants en stages et thèse.

Aussi, j'ai collaboré avec plusieurs laboratoires afin de connaître le statut mutationnel de leurs échantillons. J'ai notamment mis au point une méthode de détection des mutations les plus fréquentes de FGFR3 à l'hôpital Henri Mondor à Créteil, ce qui leur a permis d'intégrer cette méthode dans leurs méthodes de diagnostics. Aussi, j'ai collaboré avec le Docteur Bourdeaut, nous avons pu mettre en évidence des mutations mosaïques de K-Ras d'une petite fille atteinte de Rhabdomyosarcome et avons publié ces résultats en 2005 (Bourdeaut et al., 2005, J Med Genet).

Ces expériences m'ont permis :

- D'apprendre de nouvelles techniques telles que la culture cellulaire, les techniques associées à l'étude des altérations génétiques et épigénétiques
- De développer mes connaissances dans le domaine de l'oncologie et de pouvoir avoir une vision plus globale des altérations associées
- De commencer à comprendre comment construire un projet de recherche et choisir les meilleures approches pour pouvoir répondre à des questions scientifiques
- De continuer mes études et de pouvoir mettre à profit mes nouvelles compétences acquises au fil des années
- De présenter oralement en Français ou en anglais mes projets de recherche
- D'avoir un aperçu des challenges pour encadrer des étudiants

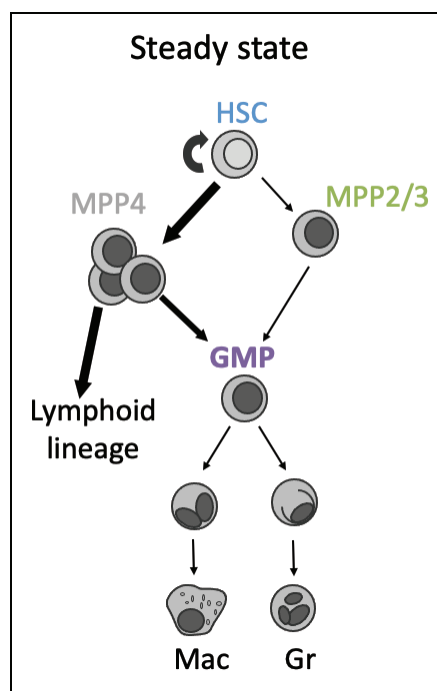
2. Etude de cellules progénitrices myéloïdes durant la régénération et la leucémie dans la moelle osseuse

Mon envie de partir à l'étranger et d'acquérir de l'expérience grandissait. J'avais déjà une expérience de 8 ans dans les cancers solides de foie et de vessie. Ce qu'il me manquait était des connaissances dans les cancers hématologiques. J'ai donc cherché un travail qui me permettrait d'acquérir cette expérience. J'ai obtenu un travail au sein du laboratoire du Docteur Emmanuelle Passegué à l'UCSF (University California San Francisco) à San Francisco. Ma position était à la fois d'être en charge d'un projet de recherche et à la fois d'être lab manager et donc de m'occuper de l'organisation du laboratoire. Emmanuelle Passegué est renommée dans le domaine des cellules souches hématopoïétiques. Lorsque j'ai commencé à travailler dans son laboratoire, j'ai dû tout apprendre de ce domaine ainsi que toutes les techniques associées au projet de recherche qui consistait en l'étude de cellules myéloïdes progénitrices durant la leucémie myélocytaire chronique, la régénération dans les modèles de souris.

2.1. Travaux de recherche

Les cellules souches hématopoïétiques (HSC) sont rares, capables d'auto-renouvellement, quiescentes, multipotentes et peuvent être activées selon les besoins. Elles sont à l'origine de la production de sang en donnant naissance à des progéniteurs multipotents (MPP) qui ont été identifiés en trois sous-ensembles distincts, les MPP2/3 à orientation myéloïde et les MPP4 à orientation lymphoïde (Pietras et al., 2015). La population de MPP donne ensuite naissance à des progéniteurs granulocyte-macrophage ou GMP qui donnent naissance à des cellules myéloïdes constituées de granulocytes (Gr) et de macrophages (Mac) (Figure 1). Lorsque j'ai rejoint le laboratoire du Dr Emmanuelle Passegué à l'UCSF, le laboratoire se concentrait sur l'étude de la branche à orientation myéloïde de l'hématopoïèse. Mon projet principal consistait en l'étude du comportement spatial *in situ* de la population de GMP que nous savions être très importante dans la stimulation de la myélopoïèse d'urgence lors de la régénération sanguine (Pietras et al., 2015) et dans des conditions leucémiques (Damien Reynaud et al., 2011). Lors de la régénération après transplantation des HSC, le compartiment des MPP2/3 est étendu, entraînant une augmentation des GMP et une explosion de granulocytes. Le même phénotype a été observé dans un modèle murin leucémique, le modèle de souris BCR-ABL, mais au lieu d'être transitoire comme lors de la régénération, il conduit à une production constante des populations MPP-GMP et granulocytes. Ce projet a eu pour but de mieux comprendre ces mécanismes et c'est ce que je développe par la suite.

Figure



1 : Lignée des macrophages et granulocytes lors de l'hématopoïèse

a- Altération de l'organisation spatiale des GMP lors de la leucémie et la régénération d'urgence myélocytaire

Mikail Binnewies un ancien lab manager du laboratoire avait mis au point une technique afin de visualiser les progéniteurs granuloid myélocyaires (GMP). Après section des os des pattes de souris

pour exposer la moelle osseuse, il a établi un protocole de marquage d'immunofluorescence (IF), basée sur les marqueurs de surface généralement utilisés pour les techniques de cytométrie de flux (lignée négative (CD3, CD4, CD5, CD8, B220, Ter119, Mac-1 and Gr-1), CD150 négatif Sca-1 négatif, ckit positif and FcγR positif). Il a tout d'abord observé que les GMP étaient distribués de manière aléatoire et parmi d'autres cellules dans la moelle osseuse.

Tout l'intérêt de ce projet a commencé lorsqu'il a regardé dans les souris transgéniques de leucémie chronique myélocytaire (CML), BCR/ABL et JunB -/-, il a observé que les GMP formaient de larges clusters persistant (cGMP) dans la moelle osseuse. Il n'a pu expliquer ces regroupements de cellules par un remaniement de la matrice extra-cellulaire. J'ai aussi plus tard validé que ces regroupements de GMP étaient aussi présents dans un modèle de souris de leucémie aiguë myélocytaire (MLL-AF9) et qu'ils se formaient de manière progressive en fonction de progression du cancer. Lorsqu'il a quitté le laboratoire et que Stephanie Leong a repris ce projet, elle a regardé si ces regroupements de GMP étaient aussi présents durant la régénération de la moelle osseuse. Pour cela, elle a traité des souris sauvages avec du 5-Fluorouracil (5-FU) qui tue les cellules prolifératives. Elle a observé que dans le sang en périphérie, les cellules myéloïdes diminuaient drastiquement et réapparaissaient après neuf jours, augmentaient continuellement jusqu'à vingt jours et se normalisaient après trente jours. En regardant par immunofluorescence, elle a pu observer que les regroupements de GMP, étaient aussi présents durant la régénération de la moelle osseuse, en apparaissant huit jours et demi après traitement au 5-FU, formaient des patches après dix jours, formaient des regroupements de cellules que l'on appelle des clusters après 10 à 12 jours et disparaissaient après 14 jours, montrant une surproduction de granulocytes. Par la suite, j'ai validé cette observation dans d'autres contexte de régénération après la déplétion de granulocytes dans les souris sauvages en utilisant un anticorps contre Ly6-G et après transplantation. Et finalement, lorsque j'ai induit la production de granulocytes en traitant des souris wild-type avec du G-CSF. Nous avons pu donc conclure que la formation des clusters de GMP était une caractéristique commune à la régénération de la moelle osseuse.

b- Les caractéristiques cellulaires des clusters de GMP (cGMP)

Ensuite, Stéphanie s'est attachée à comprendre les mécanismes de formation des cGMP en conduisant des analyses détaillées du cycle cellulaire en injectant du BrDU ou de l'EdU a des souris sauvages traitées au 5-FU. Elle a observé l'augmentation du nombre de cellules immatures (LSK, Lin/Sca-1/c-kit+) traduisant l'augmentation de la population de MPP2/3 issue de l'activation des HSC lors du traitement au 5-FU. Les GMP ont également augmentés lors de la formation de leurs patches et lors de la formation des granulocytes. Elle a aussi effectué des expériences de formation de colonies à partir de cellules de GMP isolées en utilisant de la méthylcellulose, provenant de souris sauvages traitées à différents temps avec du 5-FU. Au début de la régénération, elle a observé une augmentation des colonies de granulocytes et de macrophages immatures, diminuant lentement au fil du temps jusqu'à régénération complète. Tous ces résultats ont montré que les clusters de GMP étaient des foyers de différenciation myéloïdes et semblaient être conservés au cours de la myélopoïèse leucémique.

c- Signature moléculaire des clusters de GMP

Afin de comprendre les mécanismes moléculaires contrôlant la formation des cGMP, nous avons utilisé une matrice de PCR Fluidigm sur mesure sur des pools de cent GMP isolés à partir de souris sauvages traitées au 5-FU. Stéphanie avait préparé la plaque contenant les GMP et j'ai utilisé la technique de PCR Fluidigm afin de regarder l'expression des gènes sélectionnés. Stéphanie est ensuite partie du laboratoire et j'ai été en charge de la continuation de ce projet. Grâce à l'aide de nos collaborateurs du laboratoire du Dr Bernie Göttgens, Fernando Calero-Nieto a analysé les résultats d'expression en utilisant des analyses TSNE (T-Distributed Stochastic Neighbor Embedding) révélant deux groupes distincts. Les échantillons obtenus huit et dix jours après traitement (patch de GMP) étaient clairement séparés des jours zéro (état d'équilibre) et des jours 12 et 14 (différentiation des clusters de GMP) après traitement. L'examen de gènes individuels a mis en évidence une signature du cycle cellulaire activée dans les patches de GMP en prolifération (jours 8 et 10, groupe I), avec une expression élevée de *Ccnd1* (cyclin D1) et *Ccne1* (cyclin E1) ainsi qu'une faible expression de l'inhibiteur de kinase dépendant de la cycline *Cdkn1b* (p27). Aussi, nous avons identifié une signature du cycle cellulaire réprimée dans les clusters de GMP différencié (jours 12 et 14, groupe II), avec une diminution de l'expression de nombreuses cyclines et une restauration des niveaux de p27. De plus, nous avons pu observer des changements majeurs dans l'expression spécifique de gènes déterminants myéloïdes avec des niveaux de *Hoxa9* et *Irf8* massivement supprimés dans les patches de GMP (groupe I) par rapport aux GMP à l'état d'équilibre et différenciés (groupe II). Nous avons également trouvé des tendances similaires pour la plupart des récepteurs des cytokines myéloïdes ou pro-inflammatoires (CSFR) étudiés, en particulier *Csf1r* (M-CSFR), *Csf3r* (G-CSFR) et *Il6ra* (IL-6R), avec une expression réprimée lorsque les GMP forment des patches et sont en état de prolifération (groupe I) et une expression restaurée ou même augmentée dans les GMP en cours de différenciation (groupe II).

J'ai par la suite fait la même analyse dans nos modèles de souris de CML, JunB et BCR/ABL, qui a permis de montrer une signature similaire. Les analyses PCA (Principal Component Analysis) ont révélé une séparation claire entre les GMPs leucémiques et leurs témoins sains respectifs. En particulier, ils ont montré une expression accrue de *Ccne1* et une expression diminuée de *Irf8*, *Csf1r* et *Il6ra*, affichant ainsi une signature moléculaire similaire à celle des GMP formant des patches de jours 8-10 (groupe I).

Pris ensemble, ces analyses ont indiqué que les GMPs régénératrices subissent une reprogrammation moléculaire significative lors de la formation de clusters GMP. Nous avons identifié des états biphasiques transitoires avec une activation du cycle cellulaire et une suppression des voies de maturation, en particulier CSFR, lors de la formation des clusters, suivis d'un blocage du cycle cellulaire et d'une réactivation des voies de maturation lorsque les clusters GMP se différencient en cellules myéloïdes matures. Ils ont également démontré qu'au niveau moléculaire, les GMPs leucémiques sont maintenus dans un état permanent de formation de clusters de GMP.

Pour en savoir plus précisément sur le profil d'expression des GMP lorsqu'ils forment des patches ou des clusters par rapport aux GMP à l'état stationnaire, j'ai effectué une analyse de cellules uniques sur des GMP uniques après 8 jours de traitement au 5-FU et chez la souris transgénique BCR/ABL. Nous avons collaboré avec le laboratoire du Dr Bertie Göttgens qui a analysé les données en réalisant une PCA, résultant de l'observation de deux groupes distincts de cellules entre D0 et D8.

L'ensemble de ces résultats obtenus ont montré une hétérogénéité de la proportion de GMPs pendant la régénération et la leucémie. Les GMPs auto-renouvelantes ont été retrouvées en grande proportion après 8 jours de traitement au 5-FU et ont diminué progressivement pendant la régénération, tout comme elles sont enrichies durant la leucémie chronique myélocytaire.

d- Réseau d'auto-renouvellement des GMPs

Nous avons observé que *Irf8* était réexprimé à la fin de la régénération avant l'enrichissement des granulocytes. Pour approfondir la compréhension du réseau d'auto-renouvellement des GMPs, nous avons décidé d'étudier le rôle de *IRF8* et avons utilisé un modèle de souris délété de manière homozygote pour *Irf8* (*IRF8* $-/-$). Les souris *Irf8* $-/-$ sont immunodéprimées et développent un néoplasie myéloprolifératif (NMP) au fil du temps (Holtschke et al., 1996). De manière frappante, j'ai observé par IF que les clusters GMP étaient déjà formés à l'état stationnaire. De plus, lorsque j'ai traité les souris *IRF8* $-/-$ avec du 5-FU, j'ai observé une persistance des clusters de GMP. Cette observation a montré que l'absence d'*IRF8* pourrait conduire à la formation de clusters de GMP et son expression est nécessaire pour mettre fin au processus de régénération. De manière intéressante, *Irf8* et *Ctnnb1* (β -caténine) font partie d'un réseau régulateur antagoniste dans la leucémie myéloïde chronique (CML) (Holtschke et al., 1996) et la signalisation β -caténine activée confère des caractéristiques aberrantes d'auto-renouvellement aux GMPs leucémiques dans la CML et la leucémie aigüe myélocytaire (Jamieson et al., 2004; Wang et al., 2010). J'ai donc analysé l'expression de β -caténine dans les GMP après traitement au 5-FU et observé une augmentation de la β -caténine nucléaire dans les GMPs régénératrices huit jours après traitement, et dans les GMPs de BA et jB. Cependant, la régulation à la baisse de *Irf8* n'a pas directement stimulé l'expression de β -caténine car ni les GMPs *Irf8* $-/-$ ni les HSCs ou les MPPs n'ont montré une augmentation de l'expression de β -caténine nucléaire. En revanche, les GMPs des souris avec un gain de fonction (GOF) et perte de fonction (LOF) pour *Ctnnb1* avaient une expression de *Irf8* diminuée et augmentée, respectivement. Ceci a pour conséquence la présence de GMPs à l'état stationnaire chez les souris GOF pour *Ctnnb1*, et des niveaux d'état stationnaire inchangés néanmoins une formation significativement retardée de cluster de GMP lors du traitement au 5-FU chez les souris LOF pour *Ctnnb1*.

Collectivement, ces résultats placent *Irf8* et la β -caténine au centre d'un réseau de progéniteurs d'auto-renouvellement inductibles contrôlant la formation de cluster de GMP, la β -caténine supprimant directement l'expression de *Irf8* et *Irf8* renforçant finalement l'expression de la β -caténine dans les contextes de NMP. Cependant, pour obtenir la différenciation des clusters GMP *IRF8*, doit être ré-exprimé en conduisant au récepteur MCSF.

e- Niches de la moelle osseuse contrôlant la formation de clusters GMP

Nous savions que les HSC sont régulés dans leurs niches de la moelle osseuse, ce qui conduit à leur quiescence ou à leur activation/différenciation. Pour savoir quelles cytokines pourraient être responsables de la formation de clusters de GMP, nous avons effectué des analyses de cytokines par la méthode d'ELISA sur les fluides de la moelle osseuse des souris après le traitement au 5-FU. Grâce à cette approche, nous avons clairement identifié des cytokines produites au cours de la phase précoce, entre cinq et dix jours après traitement, SCF, IL1 et G-CSF. Ces cytokines ont été décrites précédemment comme étant produites par les cellules endothéliales endommagées et responsables de l'activation des HSC (Schepers et al., 2013). En effet, l'examen approfondi par IF a confirmé des

dommages vasculaires significatifs après le traitement au 5-FU, avec des lacunes majeures entre les ECs laminin+ dysmorphiques. Ces dommages entraînent une fuite vasculaire dans le stroma BM comme mesuré par SiYi Zhang, une technicienne du laboratoire, utilisant un test de diffusion avec des microsphères vertes fluorescentes, en particulier aux jours 8 à 10 lorsque les patches GMP étaient formés.

Pour comprendre le rôle de IL1 et G-CCSF dans la formation de clusters de GMP, j'ai injecté des souris WT avec l'un ou l'autre et ai observé des clusters de GMP. Nous avons ensuite montré que ces cytokines ont déclenché des MPP2/3 myéloïdes conduisant à la formation de clusters GMP. De manière intéressante, j'ai également identifié des cytokines produites dans la phase tardive de régénération de dix à douze jours après traitement au 5-FU telles que TGF β 1 et CXCL4, qui ont été décrites pour être produites par les mégacaryocytes et contrôler la quiescence des HSC (Zhao et al., 2014).

Pour mieux analyser le rôle des mégacaryocytes sécrétant ces cytokines terminales, j'ai utilisé le modèle de souris PF4-Cre⁺;idTR. Le traitement des souris avec la toxine diphtérique (DT) a conduit à la disparition des mégacaryocytes. J'ai ensuite traité ces souris avec 5-FU et suivi le processus régénératif par IF. Étonnamment, l'absence des mégacaryocytes a entraîné une formation persistante de cluster de GMP pendant la période de surproduction des granulocytes, une activation du réseau d'auto-renouvellement avec une réduction massive de la production de CXCL4 et de TGF- β 1, et une prévention du retour des HSC à la quiescence. Ces données ont montré que les mégacaryocytes sont nécessaires pour arrêter le processus régénératif et sont nécessaires pour la surproduction des granulocytes.

En conclusion, pendant la régénération de la moelle osseuse, nous avons observé une production précoce de SCF et d'IL-1, qui activent les HSC pour produire des MPP2/3 et initier une myélopoïèse d'urgence, la libération de G-CSF, qui dicte quand les GMP formant des patches sont formés probablement en déclenchant le réseau d'auto-renouvellement de progéniteurs Irf8/ β -caténine, et la production tardive de TGF- β 1 et de CXCL4 par les mégacaryocytes entourant les clusters de GMP, rétablissent la quiescence des HSC et limitent la durée de la réponse régénérative (Figure 2).

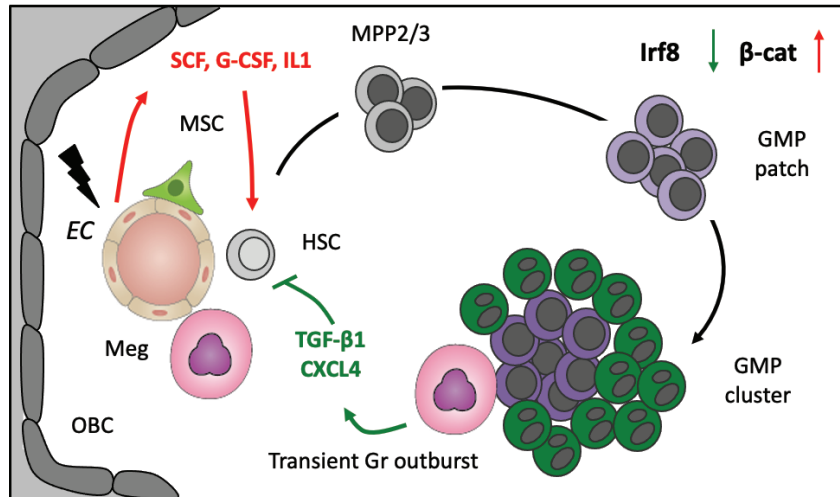


Figure 2: Régulation de la moelle osseuse pendant la régénération

Enfin, nous avons observé dans la leucémie, une activation d'un réseau d'auto-renouvellement continue avec une inflammation constante dans la niche de la moelle osseuse. Nous avons observé une perte de cytokines terminales expliquée par la perte de mégacaryocytes. Ceci a comme conséquence, une activation constante des HSC, à un manque de signaux terminaux et à une formation persistante de clusters de GMP avec une surproduction constante de cellules myéloïdes matures (Figure 3).

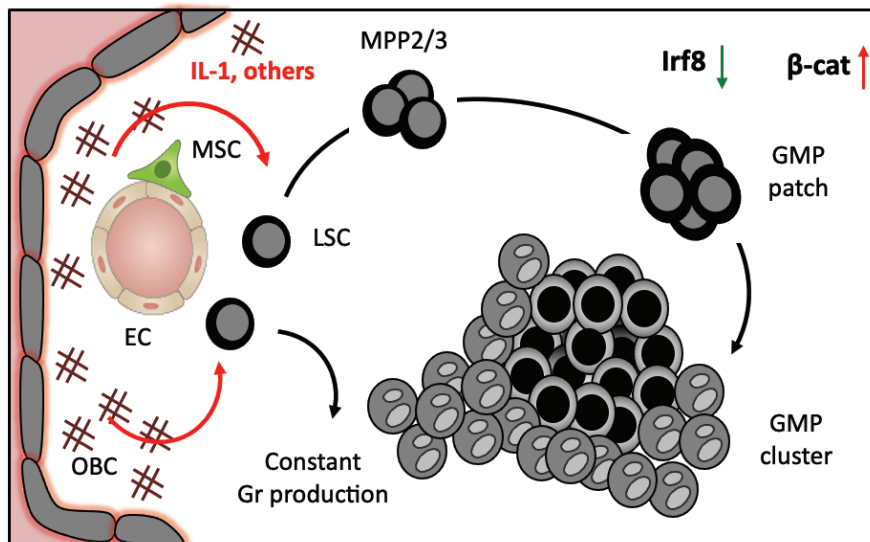


Figure 3: Régulation des GMP et des niches de la moelle osseuse dans la leucémie

2.2. Collaborations/publications

Ces travaux innovants ont été publiés dans le journal Nature en 2017 (Herault et al., 2017).

En parallèle, nous avions un projet commun au laboratoire en collaboration avec le laboratoire du Dr Saul Villeda qui avait une expertise dans l'établissement de modèles de souris en parabiosis. Ces expériences consistaient en la connexion d'une souris jeune avec une souris âgée afin d'analyser la potentielle réjuvenation des cellules souches de différents organes chez les souris âgées lorsque leur système sanguin est connecté au système sanguin de souris jeunes. Le laboratoire du Dr Villeda était en charge de la chirurgie des souris afin de les connecter et lorsque les souris étaient prêtes à être sacrifiées, nous récupérions les os des pattes et le sang dans le but d'analyser les cellules souches, myéloïdes progénitrices et mature hématopoïétiques. Lors de ces expériences, je participais à la dissection des souris, en l'extraction des fluides de la moelle osseuse et en l'analyse des cytokines par Elisa. Toutes ces analyses ont été publiées dans le journal of experimental medicine en 2021 dont je suis l'un des auteurs (Ho et al., 2021).

Enfin, Evgenia Verovskaya, une post doctorante dans le laboratoire étudiait le microenvironnement des cellules souches hématopoïétiques dans la moelle osseuse durant la vieillesse. Elle observait des différences dans les sous-types de cellules endothéliales donc nous avons décidé de regarder par IF la vasculature dans la moelle osseuse. Pour observer la vascularisation, j'ai injecté en retro-orbital des anticorps fluorescents marquant les cellules endothéliales (CD31 et VE-Cadherine) dans des souris sauvages jeunes et âgées. Puis, après avoir exposé la moelle osseuse tout le long du fémur, j'ai fait un marquage d'immunofluorescence avec la laminine marquant la matrice extra-cellulaire qui se dépose le long des vaisseaux sanguins. Ceci est une technique que j'ai apprise dans le laboratoire du Dr Paul Frenette au Albert Einstein College of medicine à New York qui consiste à faire les marquages et microscopie sur le tissu entier afin de donner un résultat en 3 dimensions. Nous avons observé que la vasculature était affectée dans les souris âgées et contribuait à la mal fonction des cellules souches hématopoïétiques. Cette analyse a été intégrée dans une publication publiée en 2023 (Mitchell et al., 2023).

2.3. Les présentations

Au sein de l'UCSF, j'ai eu la chance de présenter régulièrement les avancées de mon projet de recherche sur les clusters de GMP dans la moelle osseuse aux réunions de laboratoire mais aussi aux séminaires dédiés à l'étude des cellules souches au sein du département. Ceci m'a permis d'être formée à présenter de manière claire et concise. De pouvoir aussi être challengée par les scientifiques du domaine des cellules souches et des maladies hématopoïétiques. Un bon nombre de médecins faisant de la recherche translationnelle participaient à ces forums de présentations, ce qui amenait un autre point de vue concernant ce projet. J'ai pris confiance en moi au fil des présentations et tous ces challenges m'ont permis de mûrir et construire ce projet.

De plus, j'ai envoyé un résumé de mon projet à trois conférences internationales auxquelles je voulais assister, et j'ai pu présenter mes travaux sous forme de poster en 2015 Keystone Symposia Hematopoiesis, Keystone aux Etats-Unis et en 2016 à l'internal society for experimental hematology (ISEH) à San Diego aux Etats-Unis. Enfin, j'ai présenté mon projet en présentation orale à l'international society for stem cell research (ISSCR) à San Francisco aux Etats-Unis. Pour moi, cela a été le moment

où je me sentais entièrement en charge de mon projet aussi bien techniquement que scientifiquement. Cela m'a encore plus motivée pour continuer en ce sens et évoluer dans mon travail de scientifique.

2.4. Les encadrements

En plus de mon projet de recherche, j'étais lab manager. J'étais en charge de l'organisation du laboratoire et notamment des souris communément utilisées par le personnel du laboratoire. Il fallait les faire reproduire, les géotyper et les organiser afin de les distribuer aux personnes qui en avaient besoin pour leurs projets de recherche. Lorsque j'ai commencé dans le laboratoire nous partagions le lab management avec Stephanie Leong mais elle est partie trois mois plus tard, j'ai donc dû m'adapter m'occuper de toutes les tâches seule. Quelques mois plus tard, SiYi Zhang a joint notre laboratoire en tant que technicienne/lab manager pour m'aider dans les tâches de lab management. Je l'ai formé aux techniques communément utilisées dans le laboratoire, à la manipulation animale et à l'organisation du laboratoire. Elle m'a été d'un grand soutien et cela m'a aussi permis d'apprendre à encadrer une technicienne de laboratoire et de déléguer une partie de ce travail. Au bout de deux ans, SiYi est partie et nous avons recruté à cinquante pourcents une technicienne animalière qui n'avait pas besoin de formation pour la manipulation animale mais je l'ai encadré afin de lui donner des directions pour le maintien des colonies de souris et la distribution des souris au laboratoire. Ces expériences m'ont renforcé dans mon envie de former, interagir et pouvoir encadrer des étudiants ou techniciens plus tard dans leurs projets de recherche.

Cette expérience m'a permis :

- D'apprendre de nouvelles techniques telles que le FACS, l'imagerie utilisant la microscopie confocale et le travail *in vivo* utilisant la souris comme modèle
- De développer mes connaissances dans le domaine des cellules souches
- De développer mes connaissances dans le domaine des cancers hématopoïétiques
- De construire et de diriger un projet de recherche
- De présenter mon projet de recherche lors de conférences
- D'encadrer des techniciens

3. Etude de l'efficacité de l'activité de NKG2D dans le cancer du sein

Le laboratoire du Dr Emmanuelle Passegué allait déménager à l'université de Columbia à New York, j'ai donc commencé à chercher du travail. Être dans la baie de San Francisco, proche de la Silicone Vallée m'a ouvert les yeux sur les possibilités de pouvoir faire de la recherche appliquée en travaillant dans des start-up ou dans des laboratoires pharmaceutiques. De nouvelles découvertes dans le domaine de l'immunologie du cancer m'ont vraiment envie de découvrir ce domaine. Je venais de me spécialiser dans la lignée des cellules myéloïdes, même si c'était restreint à la moelle osseuse, et je voyais en ce domaine une opportunité pour moi d'apprendre sur la lignée lymphocytaire, dans les différents organes affectés par le cancer. J'ai donc décidé de postuler à un travail dans ce domaine à Genentech, un laboratoire pharmaceutique renommé qui allie à la fois la recherche fondamentale et la recherche appliquée. Je voyais en plus en ce poste une opportunité d'acquérir une expérience dans la conceptualisation de projets pour le ciblage thérapeutique tout en restant dans la compréhension

de la biologie que j'affectionne. J'avais en tête que si je voulais revenir à la recherche académique, je pourrais par la suite puisque je ne me déconnecterais pas complètement à ce domaine. J'ai eu la chance d'obtenir ce travail et j'ai effectivement réussi à allier la recherche avec l'écriture et la soumission d'un papier scientifique et l'application de cette recherche dans un projet de cible thérapeutique que j'ai pu suivre du début jusqu'à la fin. Je développerai le projet de recherche ainsi que les collaborations et autres expériences acquises lors de cette expérience.

3.1. Travaux de recherche

Malgré le développement d'anticorps ciblant HER2 utilisant des anticorps (trastuzumab, Pertuzumab et Margetuximab) qui ont radicalement amélioré le pronostic du cancer du sein, un grand nombre de patients font toujours des rechutes et progressent. Par conséquent, il existe encore un besoin thérapeutique pour cette indication (Li et al., 2016; Martinez-Saez & Prat, 2021; Witzel et al., 2014). De plus, au cours de la dernière décennie, l'immunothérapie est devenue une stratégie réussie pour traiter diverses indications tumorales. L'une des approches consiste à utiliser des immunothérapies contre le cancer universel, y compris des anticorps bispecifiques qui activent artificiellement une cellule immunitaire via un antigène de cellule tumorale, déclenchant ainsi des réponses anti-tumorales. Cependant, de nombreux défis subsistent dans le contexte des tumeurs solides, y compris un manque d'infiltration tumorale des cellules T, l'hostilité de l'environnement tumoral qui atténue la fonction cytotoxique des cellules T et une expression tumorale faible/hétérogène de l'antigène (Middelburg et al., 2021). Par conséquent, identifier des stratégies pour augmenter l'activité cytotoxique et la fonction des cellules immunitaires est une nécessité pour ces thérapies.

Pour stimuler l'activité des cellules immunitaires, nous avons développé des récepteurs co-stimulateurs bispecifiques (CRB) humains et murins de substitution de NKG2D (KLRK1) qui se lient à NKG2D sur les cellules immunitaires et HER2 sur les cellules cancéreuses du sein. Nous avons testé la compétence en signalisation de ces molécules, leur capacité à activer les cellules NK et CD8+ T et leur activité antitumorale en combinaison *in vitro* et *in vivo*. En utilisant un modèle de souris HER2+ du cancer du sein humain, nous avons caractérisé les effets de NKG2D-CRB sur les phénotypes et la fonctionnalité des cellules NK et CD8+ T en combinaison avec HER2-TDB (T-Cell dependent Bispecific).

a- NKG2D est un facteur pronostique dans le cancer du sein triple négatif (TNBC) et son expression est restreinte aux cellules CD8+ T

Pour identifier un récepteur de costimulation pour améliorer l'activité et la fonction cytotoxique des cellules NK et T dans le cancer du sein, nous avons analysé la signification pronostique de TNFRSF9, TNFRSF18, ICOS, TNFRSF4 et KLRK1 chez les patients atteints de TNBC traités avec atezolizumab (anti-PDL1) et chimiothérapie.

Les patients ont été séparés en fonction d'une expression élevée et faible sur des données non normalisées ou normalisées aux signatures de cellules T pan-T, NK ou CD8+. Bien que l'expression élevée de TNFRSF9, TNFRSF18, ICOS et TNFRSF4 soit de valeur pronostique positive pour les données non normalisées, lorsqu'elle est normalisée à une signature de cellules T pan-T, car ces récepteurs sont exprimés sur des cellules CD4+ et CD8+ T, il n'y avait pas de différences significatives ou de pronostic plus mauvais.

En revanche, les patients stratifiés par une expression élevée de KLRK1 ont présenté une amélioration significative du résultat pour les données non normalisées et normalisées aux signatures de cellules NK et CD8+ T. Il est important de noter que l'expression de NKG2D n'était pas pronostique dans la population de patients traités uniquement par chimiothérapie lorsqu'elle était normalisée à la signature de cellules CD8+ T, démontrant une association entre l'expression de NKG2D et le traitement par atezolizumab.

J'ai ensuite analysé l'expression de surface de NKG2D par cytométrie de flux sur des cellules tumorales dissociées du cancer du sein humain (DTC). J'ai pu donc confirmer qu'une plus grande proportion de cellules CD8+ T exprimait NKG2D par rapport à 4-1BB, GITR, ICOS ou OX40. De manière intéressante, NKG2D était principalement exprimé sur les cellules CD8+ T avec peu ou pas d'expression sur les sous-populations de cellules CD4+ T alors que les autres récepteurs de costimulation présentaient une expression sur les cellules CD4+ FoxP3- et/ou FoxP3+. Compte tenu du fait que le TNBC manque d'antigènes tumoraux définis pour le ciblage et que les lymphocytes infiltrants tumoraux (TIL) partagent des similitudes entre le TNBC et le cancer du sein HER2+ (Pal et al., 2021), j'ai confirmé que NKG2D était exprimé sur les cellules CD8+ T dans les DTC de cancer du sein HER2+ et PBMC correspondants par cytométrie de flux. J'avais aussi essayé d'analyser l'expression de NKG2D sur les cellules NK, décrites comme exprimant fortement NKG2D, mais ces cellules n'étaient pas en nombre suffisant dans les DTC dû à leur difficulté de survie dans ces conditions.

Par conséquent, NKG2D pronostique le cancer du sein TNBC et est exprimé sur une grande proportion de TIL CD8+ mais ne l'est pas sur les TIL CD4. NKG2D constituait donc un parfait candidat pour le ciblage thérapeutique afin d'augmenter l'activité cytotoxique des cellules CD8.

b- Le récepteur co-stimulateur bispécifique NKG2D (CRB) active et engage les cellules NK

En collaboration avec le département d'ingénierie des anticorps, NKG2D-CRB ciblant HER2 (aHER2xaNKG2D) et des molécules de contrôle correspondantes ont été développés en utilisant la méthodologie de bouton-dans-le-trou (knob-into-hole). De plus, la liaison aux récepteurs Fc a été atténuée par l'introduction des mutations N297G. Nous avons montré que le NKG2D-CRB se liait à NKG2D humain et à NKG2D du macaque cynomolgus. Pour contrôler nos analyses, nous avons également développé un contrôle non ciblé, NIST-CRB (aNISTxaNKG2D; NIST, National Institute of Standards and Technology) et un contrôle non liant NKG2D 4D5-ctrl (aHER2-4D5xaNIST) (Figure 4 et 5).

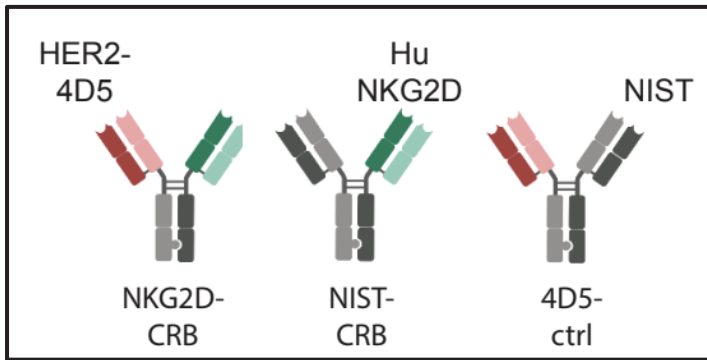


Figure 4: Bispecific antibodies

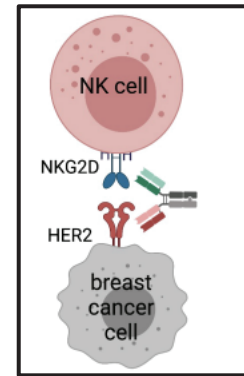


Figure 5: NKG2D-CRB binding

Pour cette étude, j'ai sélectionné des lignées cellulaires du cancer du sein qui expriment de manière élevée HER2 et faible de ligands NKG2D. J'ai également confirmé que le NKG2D-CRB se liait aux cellules Jurkat-NFAT luciférase exprimant NKG2D humain (Jurkat-HuNKG2D+ NFAT-Luc) et BT-474.

De manière intéressante, avec l'aide d'Evotec, nous avons observé que le NKG2D-CRB formait des conjugués entre BT-474 et les cellules NK qui étaient non stimulées, stimulées avec IL-15 ou amplifiées montrant la plus grande proportion de formation de conjugués cellules NK amplifiées. De plus, en utilisant la microscopie confocale, nous avons confirmé que le NKG2D-CRB améliorait significativement la formation de synapses immunologiques et l'activité des phospho-tyrosines par rapport au contrôle négatif NIST-CRB.

De plus, par Western Blot, j'ai observé que le NKG2D-CRB augmentait la phosphorylation de la protéine ERK à 5 et 15 minutes après stimulation par rapport au contrôle négatif. Par conséquent, le NKG2D-CRB relie les cellules tumorales aux cellules NK et est capable d'engendrer l'activation de la voie de signalisation.

Afin de valider l'activité fonctionnelle du NKG2D-CRB, nous avons d'abord utilisé des cellules NK-92.6DF5, une lignée cellulaire de NK qui exprime des niveaux élevés de NKG2D. Bien que les cellules NK-92.6DF5 présentassent une cytolyse spontanée élevée des cellules HCC-2218 par rapport aux cellules NK primaires, une augmentation plus importante de la cytolyse a été observée en présence de NKG2D-CRB. Pour étudier davantage l'activité du NKG2D-CRB dans un type de cellule plus pertinent, nous avons utilisé des cellules NK primaires pré-stimulées à l'IL-15. Cette cytokine induit des niveaux plus élevés d'expression de NKG2D et a été décrite pour améliorer le potentiel cytotoxique des cellules NK (Zhang et al., 2008). En utilisant une approche d'imagerie, nous avons énuméré les cellules cibles BT-474 surexprimant un fluorochrome nucléaire au fil du temps. De manière similaire aux cellules NK-92.6DF5, le NKG2D-CRB a amélioré l'activité cytolytique des cellules NK primaires.

J'ai aussi étudié certaines cytokines telles que l'interféron-gamma (IFN- γ), le facteur de nécrose tumorale-alpha (TNF- α) ainsi que les chimiokines CXCL10, MIP-1a et MIP-1b. J'ai pu observer que ces cytokines sécrétées par les cellules NK activées ont été augmentées avec le traitement par NKG2D-CRB par rapport aux témoins négatifs.

J'ai également observé une augmentation des fréquences de cellules NK CD69+ et Ki-67+ ainsi que de l'intensité de fluorescence moyenne (MFI) de ces marqueurs par cytométrie de flux.

Enfin, pour évaluer davantage comment les conditions pro-inflammatoires influencent l'activité du NKG2D-CRB, j'ai réalisé un essai de cytolyse de cellules NK primaires en utilisant un milieu conditionné de 24H à partir d'une co-culture de PBMC avec des cellules BT-474 en présence de HER2-4D5-TDB ou NIST-TDB. Les cellules NK ont été mises en culture avec des cellules BT-474 en présence de NKG2D-CRB, de NIST-CRB ou de 4D5-ctrl comme témoins négatifs ou de trastuzumab comme contrôle positif. Le milieu conditionné de la co-culture avec HER2-4D5-TDB a induit une plus grande activité cytotoxique des cellules NK avec NKG2D-CRB par rapport à NIST-CRB ou au milieu conditionné avec NIST-TDB.

Dans l'ensemble, ces données soutiennent que le NKG2D-CRB induit l'activation des cellules NK et la cytotoxicité.

c- Le NKG2D-CRB augmente l'activation et la cytotoxicité des cellules CD8+ T lorsqu'il est combiné avec HER2-4D5-TDB

Les deux anticorps thérapeutiques HER2, le pertuzumab (2C4) et le trastuzumab (4D5), ont été conçus en TDBs (Junttila et al., 2014). Nous avons donc utilisé les deux HER2-TDB en combinaison avec le NKG2D-CRB pour évaluer l'activité sur les cellules T (Figure 6). Nous avons établi puis utilisé des cellules Jurkat-HuNKG2D+ NFAT-Luc, mises en culture avec des cellules BT-474 en présence de concentrations optimales de HER2-2C4-TDB, HER-4D5 TDB ou NIST-TDB en combinaison avec NKG2D-CRB ou des molécules de contrôle. Nous avons observé que le NKG2D-CRB induisait une activité luciférase trois et sept fois plus élevée lorsqu'il était combiné avec HER2-2C4-TDB et HER2-4D5-TDB, respectivement, par rapport à NIST-CRB.

Afin d'utiliser un système plus physiologique, j'ai traité des co-cultures de cellules CD8+ T et BT-474 avec HER2-4D5-TDB, ce qui a permis une fenêtre de concentration étroite pour l'activité de cytolyse. Cependant, HER2-2C4-TDB a fourni une titration de dose discernable et une concentration de 10ng/mL de HER2-2C4-TDB a été sélectionnée pour une analyse plus approfondie. De manière intéressante, j'ai observé que le NKG2D-CRB améliorait la cytolyse des cellules CD8+ T médiée par HER2-2C4-TDB de manière dose-dépendante. Parallèlement à l'amélioration de la cytotoxicité, j'ai confirmé que le NKG2D-CRB entraînait une augmentation de la sécrétion de médiateurs pro-inflammatoires : IFN- γ , IL-2, TNF- α , MIP-1 α et MIP-1 β . Les témoins négatifs, NIST-CRB et 4D5-ctrl, n'ont pas modifié les niveaux de cytokines par rapport à HER2-2C4-TDB seul.

Pour mieux comprendre comment la signalisation de NKG2D influence le transcriptome des cellules CD8+ T, nous avons effectué une analyse de l'ARN globale 24H après la co-culture de HER2-2C4-TDB et NKG2D-CRB par rapport à HER2-2C4-TDB en combinaison avec NIST-CRB. HER2-2C4-TDB en soi a provoqué des changements transcriptomiques robustes et un enrichissement des ensembles de gènes (GSEA) qui sont cohérents avec l'engagement du TCR des cellules T. De plus, l'ajout de NKG2D-CRB a amélioré les transcriptions associées à l'activation des cellules T confirmant l'augmentation de l'activation des cellules T. Fait surprenant, l'étude de GSEA a démontré que le NKG2D-CRB améliore plusieurs processus biologiques, y compris la phosphorylation oxydative, la signalisation des voies

cytokiniques, la traduction, la transcription et la prolifération, mettant en évidence les fonctionnalités biologiques multifacettes de la signalisation de NKG2D dans les cellules CD8+ T humaines.

Enfin, pour évaluer l'activité *in vivo*, les souris NSG inoculées avec une lignée cellulaire résistante au trastuzumab et au pertuzumab, JimT-1 (Tanner et al., 2004), en présence ou en l'absence de PBMC (Peripheral Blood Mononuclear Cells) humaines adoptivement transférées, ont été traitées avec NKG2D-CRB et/ou HER2-4D5-TDB. Nous avons confirmé que la combinaison de NKG2D-CRB avec HER2-4D5-TDB réduisait significativement la croissance tumorale par rapport à HER2-4D5-TDB seul. De plus, les conditions de contrôle n'utilisant que le véhicule, NKG2D-CRB seul ou des conditions sans PBMC n'ont eu aucun effet sur la croissance tumorale et ont montré des résultats équivalents.

Dans l'ensemble, ces données ont montré que le NKG2D-CRB peut agoniser NKG2D sur les cellules CD8+ T, améliorant ainsi la fonctionnalité des cellules CD8+ T médiées par TDB, ce qui améliore finalement l'efficacité *in vivo*.

d- Le NKG2D-CRB induit une activité anti-tumorale et augmente la fonction effectrice des cellules NK et CD8+ T

Pour étudier le NKG2D-CRB dans un système immunocompétent, nous avons développé un NKG2D-CRB spécifique de souris (mNKG2D-CRB). Tout d'abord, nous avons confirmé que le mNKG2D-CRB se liait au mNKG2D à la surface des cellules Jurkat NFAT-Luciférase surexprimant mNKG2D (mouse NKG2D). De plus, nous avons observé que le mNKG2D-CRB, en combinaison avec un mHER2-4D5-TDB murin (4D5x2C11, mHER2-4D5-TDB), augmentait l'activité luciférase dans la lignée cellulaire susmentionnée par rapport à mHER2-4D5-TDB seul. Pour évaluer l'activité du mNKG2D-CRB sur les cellules CD8+ T murines *in vitro*, nous avons établi un essai avec des cellules MC-38 surexprimant hHER2 et confirmé que cette lignée cellulaire était sensible à mHER2-4D5-TDB et avons sélectionné une dose sous-optimale de 72ng/ml. En utilisant cet essai, j'ai confirmé que le mNKG2D-CRB améliorait la cytotoxicité des cellules CD8+ T murines.

De plus, pour évaluer les conséquences biologiques du mNKG2D-CRB dans un modèle *in vivo* immunocompétent, j'ai utilisé le modèle de tumeur MMTV-Her2-transgénique Fondateur #5 (Fo5) qui a été développé à partir de souris transgéniques MMTV-HER2 connues pour leur résistance inhérente au trastuzumab (Lewis Phillips et al., 2008). Nous avons vérifié que l'expression de NKG2D était présente sur les cellules CD8+ T après le traitement par HER2-TDB dans le modèle Fo5. Ensuite, les souris ont été traitées avec du véhicule ou mHER2-4D5-TDB, mNKG2D-CRB ou les deux molécules combinées. De manière frappante, le traitement combiné a diminué significativement le volume tumoral par rapport au traitement par mHER2-4D5-TDB seul, bien qu'aucune altération significative du nombre de lymphocytes n'ait été notée.

De plus, des augmentations significatives des fréquences de CD8+ T et/ou NK Ki-67+, Granzyme B+, CD107a/b+, IFN-g+ et TNF-a+ ont été détectées dans le traitement combiné par rapport au traitement par mHER2-4D5-TDB seul, mettant en évidence une activité fonctionnelle améliorée. Malgré une augmentation des fréquences de cellules CD8+ T exprimant des marqueurs de dysfonction dans les tumeurs traitées par mHER2-4D5-TDB, ces marqueurs n'étaient pas significativement élevés dans la cohorte combinée par rapport à mHER2-4D5-TDB. Étant donné que le syndrome de libération

de cytokines est un effet secondaire indésirable des immunothérapies, nous avons mesuré les niveaux de cytokines dans le sérum des souris. Aucune différence significative n'a été observée entre les groupes traités et le véhicule pour les cytokines IL-6, IFN-g, IL-2, IL-5, IL-10, TNF-a et IL-12p70, suggérant que le NKG2D-CRB n'est pas associé à un syndrome de libération de cytokines. De plus, aucun impact n'a été observé sur la fonction rénale ou hépatique après le traitement par mHER2-4D5-TDB, mNKG2D-CRB ou une combinaison des deux.

Dans l'ensemble, ces données démontrent que le NKG2D-CRB augmente la fonction effectrice des cellules NK et CD8+ T, ce qui conduit à une activité anti-tumorale accrue, et ce, sans augmentation significative des effets secondaires indésirables. Cette étude fournit une preuve de concept solide pour le développement du NKG2D-CRB en tant que thérapie anticancéreuse combinée dans le cancer du sein HER2+ (Figure 7).

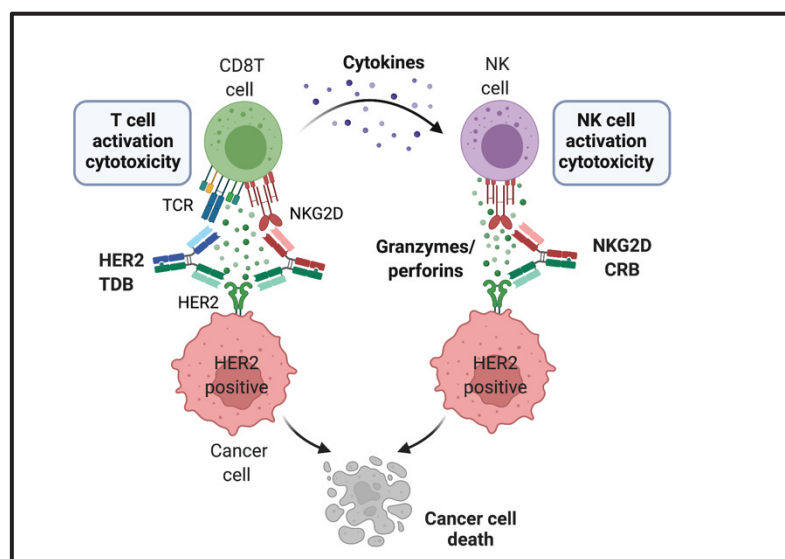


Figure 7 : Double effet cytotoxique du NKG2D-CRB sur les cellules CD8 T et les cellules NK

3.2. Les publications/les collaborations

Aussi, lorsque j'ai joint l'équipe du Dr Walsh, ils venaient de soumettre une publication dans le journal de Cancer immunology Research montrant que le traitement anti-angiogénique utilisant un anti-VEGF entraînait l'activité anti-tumorale des cellules T CD8 lorsqu'elles étaient dans des conditions d'hypoxie. J'ai participé à la révision de ce papier en contribuant aux études in vivo qui m'ont permis d'être l'un des auteurs de ce papier (de Almeida et al., 2020).

Enfin, nous faisons des études utilisant HER2-TDB dans le modèle de tumeur MMTV-Her2-transgénique Fondateur #5 et avons observé que lorsque les souris étaient traitées avec ce TDB, il y avait recrutement de cellules immunitaires, en particulier des cellules T. J'ai fait l'analyse des cytokines dans les tumeurs et dans le sérum de ces souris et j'ai observé une augmentation des chimiokines dépendantes de l'IFN γ médiées via CXCR3. Un autre groupe de notre département dirigé par Dr Juntilla, a fait ces mêmes observations dans leur modèle tumoral MMTV2-HER2 de souris. Nous avons

donc collaboré afin d'en comprendre les mécanismes. Nous avons pu mettre en évidence que les lymphocytes T étaient activement recrutés après le traitement par TDB par des chimiokines dépendantes de l'IFN γ médiées via CXCR3. Ce recrutement actif de lymphocytes T par la signalisation des chimiokines induites par le TDB était le mécanisme dominant et nécessaire pour l'activité thérapeutique du TDB anti-HER2/CD3. Ces résultats nous ont permis d'écrire un papier scientifique qui a été publié dans le journal Clinical Cancer Research (Li et al., 2018).

Grâce à mes recherches sur NKG2D j'ai pu à la fois obtenir une expérience dans le domaine du développement de molécules dans le but de les utiliser lors d'applications cliniques et faire de la recherche plus fondamentale pour en comprendre les mécanismes. Le développement de molécules visant à activer NKG2D à entraîner des collaborations interdisciplinaires entre différents départements et au sein de notre département. Je présentais régulièrement les résultats de mes expériences et les outils biologiques que je développais afin de pouvoir les utiliser pour le développement des molécules. Je faisais aussi partie des discussions et prises de décisions stratégiques afin de décider des étapes suivantes et de ce qu'il nous fallait développer afin de savoir si nos molécules avaient un potentiel pour aller plus loin dans les essais pré-cliniques. Cette expérience a été incroyablement enrichissante, j'ai pu faire partie du début jusqu'à la fin de ce projet. Grâce à ces recherches, j'ai aussi pu rédiger un papier que nous avons soumis dans le journal Cancer Immunology, Immunotherapy. Il est actuellement en révision, nous répondons aux questions posées par les reviewers afin de pouvoir le re-soumettre dès que possible.

3.3. Les présentations

En plus des présentations régulières de mon projet lors de nos réunions de laboratoire et au sein de réunions inter-laboratoires au sein du département, j'ai préparé et présenté un poster lors d'une conférence de recherche organisée par Genentech à Asilomar en Californie. Malheureusement, avec la pandémie je n'ai pu présenter à d'autres forums et je n'ai pas pu non plus avoir d'étudiant en stage.

Enfin, cette expérience m'a permis :

- De développer mes connaissances dans le domaine de l'immunologie du cancer
- De suivre et comprendre toutes les étapes nécessaires afin de produire une molécule
- De développer et d'appréhender tout ce qui est nécessaire pour valider de nouvelles molécules
- De découvrir le « vrai » travail en équipe avec des personnes spécialisées dans différents domaines

CONCLUSIONS

Toutes mes expériences mais en particulier ces deux expériences ont enrichi mes connaissances et m'ont permis d'explorer de nouveaux domaines, tels que l'immunologie du cancer, les cellules souches hématopoïétiques et la leucémie. J'ai pu apprendre et développer de nouvelles techniques mais aussi j'ai beaucoup évolué sur le plan scientifique. Durant ces expériences, j'ai pu présenter à plusieurs reprises mes travaux de recherche lors de réunions intra et inter-départementales mais aussi lors conférences internationales, sous forme de poster ou de présentations orales. J'ai développé une meilleure organisation de mes projets et de solides connaissances afin de pouvoir répondre aux attentes et questions d'autres scientifiques reconnus dans le monde. Aussi, j'ai eu de nombreuses collaborations me permettant d'enrichir mes projets, mes connaissances et m'ont permis de publier en tant que co-auteur dans de nombreuses revues scientifiques.

J'ai aussi eu l'opportunité d'encadrer des techniciens/lab managers, en particulier lorsque je travaillais à l'UCSF. Mon rôle était de les former et de les encadrer afin de gérer l'animalerie et le laboratoire pour pouvoir assurer une bonne organisation tout en me dégageant du temps pour pouvoir me focaliser sur mon projet de recherche. Cela m'a permis de prendre confiance en moi en tant que manager, c'est aussi pour cela que je souhaite valider une thèse, afin de pouvoir évoluer dans mon travail, pouvoir encadrer des techniciens et pouvoir avoir un poste de scientifique.

J'ai toujours eu une passion pour la biologie, en particulier dans le domaine du cancer. Toutes mes expériences m'ont aussi apporté des connaissances en recherche fondamentale mais aussi appliquée. Ma première motivation a toujours été de faire avancer la recherche afin de participer au développement de médicaments et de faire une différence. Avec toutes ces expériences, j'ai le sentiment aujourd'hui que j'ai acquis de la maturité et des connaissances solides qui me permettront de m'adapter facilement dans un nouveau travail. J'espère pouvoir apporter de nouvelles idées, transmettre mon enthousiasme, ma détermination et ma passion à mes collaborateurs afin de faire avancer au mieux des projets scientifiques.

Ce sont pour toutes ces raisons qu'avoir une thèse serait déterminant pour ma carrière. Je pourrais accéder à des postes avec plus de responsabilités, pouvoir m'épanouir et me projeter professionnellement sur le très long terme avec de nouvelles perspectives.

Cela fait maintenant plus d'un an que j'ai joint l'IHB (Institute of Human Biology) au sein de Roche à Bâle. Cet institut est spécialisé dans la recherche et le développement de modèles utilisant les organoïdes. Je travaille actuellement dans le laboratoire du Dr Lauriane Cabon qui a pour but d'être à l'interface entre les départements de recherche et développement de Roche à Bâle (pRed) et de Genentech à South San Francisco (gRed). Le but est de pouvoir avoir un vrai impact pour pRed et gRed, de pouvoir les aider à mieux comprendre les mécanismes biologiques en utilisant des organoïdes et à leur faciliter l'adoption de nouveaux modèles d'organoïdes afin d'être plus prédictif pour les essais cliniques. Pour moi, c'est la position idéale. J'ai déjà une expérience à Genentech donc je comprends

bien les limitations que l'on peut avoir dans l'industrie pharmaceutique et continuer à faire de la recherche avec un impact thérapeutique est ce que j'aime le plus. Depuis un an, j'ai entrepris une collaboration avec le département d'ophtalmologie de pRed qui avait développé un modèle d'organoïde de la barrière sanguine interne de la rétine sur une puce. Dans le cadre de ce projet, j'encadre un technicien et une stagiaire en thèse pour une période de trois mois. Notre but est de comprendre la variabilité des donneurs cellulaires dans l'établissement de ce modèle afin de le rendre plus robuste et prédictif. Notre but est d'avoir un impact pour le département mais aussi de pouvoir mieux comprendre les mécanismes associés à la maladie de rétinopathie diabétique et de publier un papier scientifique. De plus, j'ai collaboré avec d'autres laboratoires de gRed et pRed, cette fois-ci dans les domaines de l'oncologie et l'immunologie du cancer. Ces collaborations ont eu plusieurs buts tels que le soutien technique afin qu'ils puissent utiliser des modèles d'organoïdes nouvellement développés au sein de l'IHB ou de combler des limitations qu'ils rencontraient afin de compléter une publication scientifique. Enfin, depuis septembre 2024, j'encadre une stagiaire de deuxième année de master et une technicienne afin de développer des modèles d'organoïdes complexes pour le cancer du sein et du poumon.

Je suis actuellement principal research associate et l'obtention de la thèse me permettra de prétendre à une promotion pour devenir scientist. Ceci me permettra d'évoluer dans la catégorie de chercheur, de pouvoir continuer à faire de la recherche, participer à des conférences et encadrer des étudiants. Pour les cinq, dix prochaines années, j'aimerais constituer une petite équipe avec un technicien permanent et des étudiants en master et en thèse. Le projet dans les perspectives de ma thèse est tout à fait en accord avec ce que l'IHB a pour mission et peut positivement impacter les groupes de Roche en augmentant la compréhension de la biologie associés aux cancers mais aussi en développant des modèles plus prédictifs utilisables pour la découverte et la validation de nouvelles cibles thérapeutiques. Il est difficile pour moi de me projeter au-delà de dix ans, mais si je sens l'envie de continuer à explorer des domaines nouveaux, je penserai rejoindre un département plus en aval de la recherche pour mieux comprendre les essais cliniques et les analyses qui s'en suivent.

Pour conclure, le VAE a été un vrai challenge pour moi. J'ai décidé de la suivre avec la conscience de l'enjeu, de la nécessité de la faire afin de redonner un souffle à ma carrière et de pouvoir valider mon travail de ces vingt dernières années. Je l'ai commencé peu après avoir déménagé de San Francisco en France, lorsque j'ai commencé un nouveau travail avec de nouveaux challenges et tout en étant maman de deux jeunes enfants qui avaient beaucoup besoin de moi. Le temps dédié à la rédaction a été un vrai challenge et j'ai dû faire de nombreux sacrifices mais je l'ai fait avec détermination et motivation, sachant l'importance d'aller jusqu'au bout. Malgré ces difficultés, je dois dire que j'ai vraiment apprécié l'écriture de la thèse. Pouvoir faire une rétrospective sur ma carrière, m'a rendu fier, ça m'a donné plus de confiance et j'ai aimé prendre le temps de lire de la littérature scientifique sur laquelle j'étais passé brièvement ou sur laquelle j'avais fait l'impasse dans le passé. De plus, ça m'a permis de réfléchir plus en détail sur mes futurs projets au sein de l'IHB et de lire les papiers nécessaires pour entreprendre cette nouvelle expérience.

Bibliographie

- Boyault, S., Herault, A., Balabaud, C., & Zucman-Rossi, J. (2005). Absence of KLF6 gene mutation in 71 hepatocellular carcinomas. *Hepatology*, 41(3), 681-682; author reply 682-683. <https://doi.org/10.1002/hep.20588>
- Boyault, S., Rickman, D. S., de Reynies, A., Balabaud, C., Rebouissou, S., Jeannot, E., Herault, A., Saric, J., Belghiti, J., Franco, D., Bioulac-Sage, P., Laurent-Puig, P., & Zucman-Rossi, J. (2007). Transcriptome classification of HCC is related to gene alterations and to new therapeutic targets. *Hepatology*, 45(1), 42-52. <https://doi.org/10.1002/hep.21467>
- de Almeida, P. E., Mak, J., Hernandez, G., Jesudason, R., Herault, A., Javinal, V., Borneo, J., Kim, J. M., & Walsh, K. B. (2020). Anti-VEGF Treatment Enhances CD8(+) T-cell Antitumor Activity by Amplifying Hypoxia. *Cancer Immunol Res*, 8(6), 806-818. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-19-0360>
- Herault, A., Binnewies, M., Leong, S., Calero-Nieto, F. J., Zhang, S. Y., Kang, Y. A., Wang, X., Pietras, E. M., Chu, S. H., Barry-Holson, K., Armstrong, S., Gottgens, B., & Passegue, E. (2017). Myeloid progenitor cluster formation drives emergency and leukaemic myelopoiesis. *Nature*, 544(7648), 53-58. <https://doi.org/10.1038/nature21693>
- Ho, T. T., Dellorusso, P. V., Verovskaya, E. V., Bakker, S. T., Flach, J., Smith, L. K., Ventura, P. B., Lansinger, O. M., Herault, A., Zhang, S. Y., Kang, Y. A., Mitchell, C. A., Villeda, S. A., & Passegue, E. (2021). Aged hematopoietic stem cells are refractory to bloodborne systemic rejuvenation interventions. *J Exp Med*, 218(7). <https://doi.org/10.1084/jem.20210223>
- Holtschke, T., Lohler, J., Kanno, Y., Fehr, T., Giese, N., Rosenbauer, F., Lou, J., Knobloch, K. P., Gabriele, L., Waring, J. F., Bachmann, M. F., Zinkernagel, R. M., Morse, H. C., 3rd, Ozato, K., & Horak, I. (1996). Immunodeficiency and chronic myelogenous leukemia-like syndrome in mice with a targeted mutation of the ICSBP gene. *Cell*, 87(2), 307-317. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81348-3](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81348-3)
- Jamieson, C. H., Ailles, L. E., Dylla, S. J., Muijtjens, M., Jones, C., Zehnder, J. L., Gotlib, J., Li, K., Manz, M. G., Keating, A., Sawyers, C. L., & Weissman, I. L. (2004). Granulocyte-macrophage progenitors as candidate leukemic stem cells in blast-crisis CML. *N Engl J Med*, 351(7), 657-667. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa040258>
- Junttila, T. T., Li, J., Johnston, J., Hristopoulos, M., Clark, R., Ellerman, D., Wang, B. E., Li, Y., Mathieu, M., Li, G., Young, J., Luis, E., Lewis Phillips, G., Stefanich, E., Spiess, C., Polson, A., Irving, B., Scheer, J. M., Junttila, M. R., . . . Ebens, A. (2014). Antitumor efficacy of a bispecific antibody that targets HER2 and activates T cells. *Cancer Res*, 74(19), 5561-5571. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-13-3622-T>
- Lewis Phillips, G. D., Li, G., Dugger, D. L., Crocker, L. M., Parsons, K. L., Mai, E., Blattler, W. A., Lambert, J. M., Chari, R. V., Lutz, R. J., Wong, W. L., Jacobson, F. S., Koeppen, H., Schwall, R. H., Kenkare-Mitra, S. R., Spencer, S. D., & Sliwkowski, M. X. (2008). Targeting HER2-positive breast cancer with trastuzumab-DM1, an antibody-cytotoxic drug conjugate. *Cancer Res*, 68(22), 9280-9290. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-1776>
- Li, H., Shao, B., Yan, Y., Song, G., Liu, X., Wang, J., & Liang, X. (2016). Efficacy and safety of trastuzumab combined with chemotherapy for first-line treatment and beyond progression of HER2-overexpressing advanced breast cancer. *Chin J Cancer Res*, 28(3), 330-338. <https://doi.org/10.21147/j.issn.1000-9604.2016.03.07>
- Li, J., Ybarra, R., Mak, J., Herault, A., De Almeida, P., Arrazate, A., Ziai, J., Totpal, K., Junttila, M. R., Walsh, K. B., & Junttila, T. T. (2018). IFNgamma-induced Chemokines Are Required for CXCR3-mediated T-Cell Recruitment and Antitumor Efficacy of Anti-HER2/CD3 Bispecific Antibody. *Clin Cancer Res*, 24(24), 6447-6458. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-18-1139>

- Martinez-Saez, O., & Prat, A. (2021). Current and Future Management of HER2-Positive Metastatic Breast Cancer. *JCO Oncol Pract*, 17(10), 594-604. <https://doi.org/10.1200/OP.21.00172>
- Middelburg, J., Kemper, K., Engelberts, P., Labrijn, A. F., Schuurman, J., & van Hall, T. (2021). Overcoming Challenges for CD3-Bispecific Antibody Therapy in Solid Tumors. *Cancers (Basel)*, 13(2). <https://doi.org/10.3390/cancers13020287>
- Mitchell, C. A., Verovskaya, E. V., Calero-Nieto, F. J., Olson, O. C., Swann, J. W., Wang, X., Herauld, A., Dellorusso, P. V., Zhang, S. Y., Svendsen, A. F., Pietras, E. M., Bakker, S. T., Ho, T. T., Gottgens, B., & Passegue, E. (2023). Stromal niche inflammation mediated by IL-1 signalling is a targetable driver of haematopoietic ageing. *Nat Cell Biol*, 25(1), 30-41. <https://doi.org/10.1038/s41556-022-01053-0>
- Pal, B., Chen, Y., Vaillant, F., Capaldo, B. D., Joyce, R., Song, X., Bryant, V. L., Penington, J. S., Di Stefano, L., Tubau Ribera, N., Wilcox, S., Mann, G. B., kConFab, Papenfuss, A. T., Lindeman, G. J., Smyth, G. K., & Visvader, J. E. (2021). A single-cell RNA expression atlas of normal, preneoplastic and tumorigenic states in the human breast. *EMBO J*, 40(11), e107333. <https://doi.org/10.15252/embj.2020107333>
- Pietras, E. M., Reynaud, D., Kang, Y. A., Carlin, D., Calero-Nieto, F. J., Leavitt, A. D., Stuart, J. M., Gottgens, B., & Passegue, E. (2015). Functionally Distinct Subsets of Lineage-Biased Multipotent Progenitors Control Blood Production in Normal and Regenerative Conditions. *Cell Stem Cell*, 17(1), 35-46. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2015.05.003>
- Rebouissou, S., Herauld, A., Letouze, E., Neuzillet, Y., Laplanche, A., Ofualuka, K., Maille, P., Leroy, K., Riou, A., Lepage, M. L., Vordos, D., de la Taille, A., Denoux, Y., Sibony, M., Guyon, F., Lebre, T., Benhamou, S., Allory, Y., & Radvanyi, F. (2012). CDKN2A homozygous deletion is associated with muscle invasion in FGFR3-mutated urothelial bladder carcinoma. *J Pathol*, 227(3), 315-324. <https://doi.org/10.1002/path.4017>
- Schepers, K., Pietras, E. M., Reynaud, D., Flach, J., Binnewies, M., Garg, T., Wagers, A. J., Hsiao, E. C., & Passegue, E. (2013). Myeloproliferative neoplasia remodels the endosteal bone marrow niche into a self-reinforcing leukemic niche. *Cell Stem Cell*, 13(3), 285-299. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2013.06.009>
- Stransky, N., Vallot, C., Rey, F., Bernard-Pierrot, I., de Medina, S. G., Segraves, R., de Rycke, Y., Elvin, P., Cassidy, A., Spraggon, C., Graham, A., Southgate, J., Asselain, B., Allory, Y., Abbou, C. C., Albertson, D. G., Thiery, J. P., Chopin, D. K., Pinkel, D., & Radvanyi, F. (2006). Regional copy number-independent deregulation of transcription in cancer. *Nat Genet*, 38(12), 1386-1396. <https://doi.org/10.1038/ng1923>
- Tanner, M., Kapanen, A. I., Junttila, T., Raheem, O., Grenman, S., Elo, J., Elenius, K., & Isola, J. (2004). Characterization of a novel cell line established from a patient with Herceptin-resistant breast cancer. *Mol Cancer Ther*, 3(12), 1585-1592. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15634652>
- Vallot, C., Herauld, A., Boyle, S., Bickmore, W. A., & Radvanyi, F. (2015). PRC2-independent chromatin compaction and transcriptional repression in cancer. *Oncogene*, 34(6), 741-751. <https://doi.org/10.1038/onc.2013.604>
- Vallot, C., Stransky, N., Bernard-Pierrot, I., Herauld, A., Zucman-Rossi, J., Chapeaublanc, E., Vordos, D., Laplanche, A., Benhamou, S., Lebre, T., Southgate, J., Allory, Y., & Radvanyi, F. (2011). A novel epigenetic phenotype associated with the most aggressive pathway of bladder tumor progression. *J Natl Cancer Inst*, 103(1), 47-60. <https://doi.org/10.1093/jnci/djq470>
- van Oers, J. M., Lurkin, I., van Exsel, A. J., Nijssen, Y., van Rhijn, B. W., van der Aa, M. N., & Zwarthoff, E. C. (2005). A simple and fast method for the simultaneous detection of nine fibroblast growth factor receptor 3 mutations in bladder cancer and voided urine. *Clin Cancer Res*, 11(21), 7743-7748. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-05-1045>
- Wang, Y., Krivtsov, A. V., Sinha, A. U., North, T. E., Goessling, W., Feng, Z., Zon, L. I., & Armstrong, S. A. (2010). The Wnt/beta-catenin pathway is required for the development

- of leukemia stem cells in AML. *Science*, 327(5973), 1650-1653.
<https://doi.org/10.1126/science.1186624>
- Witzel, I., Muller, V., Abenhardt, W., Kaufmann, M., Schoenegg, W., Schneeweis, A., & Janicke, F. (2014). Long-term tumor remission under trastuzumab treatment for HER2 positive metastatic breast cancer - results from the HER-OS patient registry. *BMC Cancer*, 14, 806. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-14-806>
- Zhang, C., Zhang, J., Niu, J., Zhang, J., & Tian, Z. (2008). Interleukin-15 improves cytotoxicity of natural killer cells via up-regulating NKG2D and cytotoxic effector molecule expression as well as STAT1 and ERK1/2 phosphorylation. *Cytokine*, 42(1), 128-136. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2008.01.003>
- Zhao, M., Perry, J. M., Marshall, H., Venkatraman, A., Qian, P., He, X. C., Ahamed, J., & Li, L. (2014). Megakaryocytes maintain homeostatic quiescence and promote post-injury regeneration of hematopoietic stem cells. *Nat Med*, 20(11), 1321-1326. <https://doi.org/10.1038/nm.3706>

Régulation ciblée des cellules myéloïdes dans la moelle osseuse et activation accrue des lymphocytes T dans les tumeurs mammaires pour une amélioration des traitements anticancéreux

TABLE OF CONTENTS

INTRODUCTION	42
1.1. Breast cancer	43
1.1.1. Mammary gland structure and development	43
1.1.2. Breast cancer incidence and epidemiology	44
1.1.3. Breast cancer diagnosis/classification	45
1.2. Breast cancer treatments	47
1.2.1. Prognosis markers	47
1.2.2. Surgery	48
1.2.3. Chemotherapy	48
1.2.4. Radiotherapy	49
1.2.5. Hormonal therapy	50
1.2.6. HER2 targeting	51
1.2.7. Breast cancer models	56
1.2.7.1. Breast cancer cell lines	57
1.2.7.2. Mouse models	57
1.2.7.3. Organoids	59
1.3. Immunology	64
1.3.2. T cell production and maturation	67
1.3.3. T cell classification	69
1.3.4. T cell activation and memory formation in cancer	70
1.3.5. NK cell production and maturation	73
1.3.6. NK cell activation	75
1.3.7. NKG2D	76
1.4. Cancer Immunology	80
1.4.1. Immunosuppressive microenvironment	81
1.4.2. CAR T cells	83
1.4.3. Immune cell engagers	85
RESULTATS	90
1. Etude de l'efficacité de l'activité de NKG2D dans le cancer du sein	91

1.1.	NKG2D est un facteur pronostique dans le cancer du sein triple négatif et son expression est restreinte aux cellules CD8+ T	92
1.2.	HER2-CRB induit la formation de la synapse immunitaire entre les cellules NK et les cellules tumorales et active une voie de signalisation.	97
1.3.	HER2-CRB entraîne l'activation des cellules NK	102
1.4.	HER2-CRB augmente l'activation des cellules T CD8+ médiée par HER2-TDB.	106
1.5.	HER2-CRB améliore l'activité <i>in vivo</i> de HER2-TDB	112
1.6.	NKG2D-CRB renforce la fonction effectrice des cellules NK et CD8+ en combinaison avec HER2-TDB	116
1.1.	Identification des clusters de GMP <i>in situ</i> par microscopie	126
1.2.	Observation de GMP formant des clusters durant la leucémie	128
1.3.	Les cGMPs sont une caractéristique de l'expansion myélocytaire	132
1.4.	cGMPs sont des foyers de différenciation myélocytaire	134
1.5.	Re-programmation moléculaire des cGMPs	136
1.6.	Réseau d'auto-renouvellement des GMPs	140
1.7.	Les signaux de la niche de la MO contrôlent la formation des cGMPs.	144
1.8.	Formation anormale de cGMP dans la leucémie	147
CONCLUSIONS ET DISCUSSION		150
MATERIALS AND METHODS		156
REFERENCES		159
ANNEXES		

LIST OF FIGURES

Figure 1 : Mammary gland

Figure 2 : Mammary development from embryonic development to adulthood

Figure 3 : Histological subtypes of breast cancers

Figure 4 : Breast cancer classification

Figure 5 : Signal transduction by the HER family

Figure 6 : HER2 discovery and targeting therapy timelines targeting HER2

Figure 7 : Trastuzumab mechanisms of action

Figure 8 : Mechanism of action of agents targeting HER2

Figure 9 : Comparison of the described preclinical cancer models

Figure 10 : Organoid engineering components

Figure 11 : Significant mammary organoid studies with associated protocol details

Figure 12 : Emerging organoid models

Figure 13 : 3D hydrogel-containing microdevice developed for the mini-gut culture

Figure 14 : Hematopoiesis

Figure 15 : The innate and adaptive immune system

Figure 16 : T cell production

Figure 17 : T cell differentiation

Figure 18 : CD8 and CD4 T cell activation

Figure 19 : T cell co-stimulatory receptors

Figure 20 : NK cell differentiation

Figure 21 : NK cells activation and inhibitory receptors

Figure 22 : NKG2D mode of action on NK and T cells

Figure 23 : NKG2D ligands

Figure 24 : Structure of the NKG2D adaptor complex and downstream signaling pathways

Figure 25 : Solid tumors classification

Figure 26 : T cell checkpoint inhibitors

Figure 27 : Immunotherapeutic approaches for HER2-positive breast cancer

Figure 28 : CAR T cells development

Figure 29 : Bispecific antibody mode of action

Figure 30 : Summary of the clinical trials using HER2 bispecific antibodies

Figure 31 : The targeting strategy using HER2 CRB

Figure 32 : Summary of the scientific publications targeting NKG2D or its ligands

Figure 33: Expression de récepteurs de costimulation à la surface des cellules T CD8 dans des tissus dissociés de cancer du sein

Figure 34: Expression de récepteurs de costimulation des cellules T CD4 FOXP3 positive et négative dans des tissus dissociés de cancer du sein

Figure 35: Comparaison de survie des patients atteints de TNBC traités en fonction de l'expression de KLRK1, sans normalisation

Figure 36: Comparaison de survie des patients atteints de TNBC traités en fonction de l'expression de KLRK1, avec normalisation des cellules NK

Figure 37: Comparaison de survie des patients atteints de TNBC traités en fonction de l'expression de KLRK1, avec normalisation des cellules T CD8

Figure 38: Comparaison de l'expression de surface de NKG2D des cellules T dans les PBMC et dans les DTC de cancer du sein

Figure 39: Description des anticorps bispécifiques

Figure 40: Expression de surface de HER2 sur les cellules BT474

Figure 41: Expression de surface de HER2 sur les cellules Jurkat-NKG2D+ NFAT-Luc

Figure 42: Comparaison de l'expression de surface de NKG2D de cellules NK activées ou non

Figure 43: Imagerie et quantification de la formation de la synapse immunologique en présence de HER2-CRB

Figure 44: Activation de la voie de signalisation en présence de HER2-CRB

Figure 45: Expression de NKG2D sur les cellules NK-92 (6D5)

Figure 46: Comparaison de l'activité cytotoxique de cellules NK en présence de HER2-CRB

Figure 47: Comparaison cinétique de l'activité cytotoxique des cellules NK en présence de HER2-CRB

Figure 48 : Analyse d'analytes sécrétées par les cellules NK en présence de HER2-CRB

Figure 49: Comparaison d'expression de marqueurs d'activation en présence de HER2-CRB

Figure 50: Comparaison cinétique de l'activité cytotoxique des cellules NK en présence de HER2-CRB et de milieux de différentes conditions expérimentales

Figure 51: Activité de la luciférase normalisée par rapport aux cellules Jurkat-NKG2D+ NFAT-Luc non traitées

Figure 52: Comparaison cinétique de l'activité cytotoxique des cellules T CD8 en présence de HER2-TDBs

Figure 53: Comparaison cinétique de l'activité cytotoxique des cellules T CD8 en présence de HER2-2C4 TDB and HER2-CRB

Figure 54: Quantification des cytokines dans la co-culture de cellules T CD8+ et de cellules BT474

Figure 55: Expression transcriptionnelle des cellules T CD8 après 24H de co-culture en présence de HER2.2C4-TDB

Figure 56: Comparaison de l'expression transcriptionnelle des cellules T CD8 après 24H de co-culture en présence de HER2.2C4-TDB avec et sans HER2-CRB

Figure 57: Etude de l'enrichissement génique

Figure 58: Comparaison des volumes tumoraux des souris xénogreffées traitées avec en combinaison ou non avec HER2-CRB

Figure 59: Expression de mNKG2D et binding de mHER2-CRB sur les cellules Jurkat-mNKG2D+ NFAT luciférase

Figure 60: Analyse de l'activité luciférase des cellules Jurkat-mNKG2D+ NFAT luciférase

Figure 61: Titration et analyse de l'activité cytotoxique de mHER-TDB en combinaison avec mHER2-CRB

Figure 62: Analyse de l'expression de NKG2D des cellules T CD8 murines

Figure 63: Changement des volumes tumoraux du modèle de tumeur Fo5

Figure 64: Stratégie d'analyse par cytométrie en flux

Figure 65: Analyse de marqueurs d'activation des cellules T CD8 et NK

Figure 66: Analyse de marqueurs négatifs de régulation des cellules T CD8

Figure 67: Analyse d'analytes dans le sérum de souris

Figure 68: Comparaison de l'expression transcriptionnelle des cellules T CD8 chez la souris fo5 traitées ou non avec mHER2-CRB

Figure 69: Etude de l'enrichissement génique

Figure 70: Hiérarchie de l'hématopoïèse

Figure 71: Dérégulation de l'hématopoïèse pendant la régénération et la leucémie

Figure 72: Maintenance des cellules souches hématopoïétiques dans la moelle osseuse

Figure 73: Stratégie de sélection par FACS pour identifier les GMPs

Figure 74: Identification de GMP par immunofluorescence dans la moelle osseuse

Figure 75: Modèles génétiques de néoplasmes myéloprolifératifs

Figure 76: Images d'immunofluorescence représentatives de GMPs

Figure 77: Définition des pGMP et des cGMP

Figure 78: Description du modèle de souris MF9

Figure 79: Organisation des progéniteurs myéloïdes en fonction du stroma

Figure 80: Comparaison des progéniteurs myéloïdes et lymphoïdes dans la moelle osseuse

Figure 81: Suivi des populations hématopoïétiques dans le sang périphérique (SP) et la moelle osseuse durant la régénération

Figure 82: GMP dans la moelle osseuse après traitement au 5-FU

Figure 83: Schéma expérimental, stratégie de sélection des GMP par FACS et immunofluorescence des GMP

Figure 84: Cinétique de prolifération des GMP et LSK après traitement au 5-FU

Figure 85: Analyses monocellulaires clonogéniques des GMPs isolés de souris sauvages traitées au 5-FU

Figure 86: Analyses tSNE des données d'expression génique de Fluidigm

Figure 87: Sélection de gènes à partir des analyses Fluidigm

Figure 88: Résultats d'analyses d'expression de M-CSFR

Figure 89: Analyses tSNE et de gènes sélectionnés à partir des données d'expression génique

Figure 90: Analyses des composantes principales (PC) des données de séquençage ARN à cellule unique

Figure 91: Analyse des GMP dans les souris transgéniques *Irf8*^{-/-} après traitement au 5-FU

Figure 92: Expression nucléaire de la β -caténine par immunofluorescence

Figure 93: Fréquence de l'expression nucléaire de β -caténine par immunofluorescence

Figure 94: Expression d'*Irf8* par qPCR dans les GMP provenant de souris GOF et LOF de *Ctnnb1*

Figure 95: GMP dans les souris transgéniques LOF pour *Ctnnb1* après traitement au 5-FU

Figure 96: Modèle du réseau moléculaire contrôlant l'auto-renouvellement (SR) des pGMPs et la différenciation des cGMPs

Figure 97: Mesure des cytokines par ELISA dans le liquide interstitiel de moelle osseuse

Figure 98: Etude des GMP et mégacaryocytes dans la moelle osseuse dans les souris *Cxcl4-cre::iDtr* traitées au 5-FU

Figure 99: Etude des cytokines et du cycle cellulaire dans les souris *Cxcl4-cre::iDtr* traitées au 5-FU

Figure 100: Mesures de cytokines par ELISA dans les fluides de la MO dans les souris transgéniques leucémiques BCR/ABL et JunB

Figure 101: Visualisation des mégacaryocytes dans les souris transgéniques BCR/ABL et JunB

ABBREVIATIONS

A

ADC - Antibody drug conjugated

ADCC - Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity

AKT - Protein kinase B

AML - Acute myeloid leukemia

APC - Antigen presenting cells

B

BA - Scl-tTA::TRE-BCR/ABL

B-cell - Cellules B

BCP - Biochemical, Cellular and Pharmacology

BiTE - Bispecific T cell Engager

bsAb - Bispecific antibody

C

CAF - Fibroblastes associés au cancer

CAR - Chimeric Antigen Receptor

CCR7 - Chemokine receptor type 7

CHO - Chinese Hamster Ovary cells

CIS - Lobular carcinoma in situ

CLS - Syndrome de libération de cytokines

Combo - Combinaison

CLP - Common lymphoid progenitors

CMTMR - Tétraméthylrhodamine 5-(et-6)-(((4-chlorométhyl)benzoyl)amino)

CRB - Co-stimulatory Receptor Bispecific

Ctrl - Control

CTV - Cell Trace Violet

CXCL10 - Ligand 10 du motif chimiokine CXC

D

DAP10 - DNAX-activating protein 10

DCIS - Ductal carcinoma in situ

DFS - Disease-free survival

DN - Double-negative

DM1 - Myatansinoid

DNAM1 - DNAX accessory molecule 1

DP - Double positive

DT - Diphtheria toxin

DTC - Dissociated tumor cells

DxdDer - Duxtecan

E

E - Globule rouge

ECM - Extracellular matrix

EHS - Engelbreth-Holm-Swarm

ER - Estrogen receptor

F

FACS - Fluorescence-activated cell sorting

FDA - Food and Drug Administration

Fo5 - Modèle de tumeur Founder #5

5-FU - 5-fluorouracil

G

G-CSF - Granulocyte colony stimulating factor

GM - Granulocytes/macrophages

GMP - Progéniteurs granulocyte/macrophage

GOF - Gain of function

GPI - glycosylphosphatidylinositol

Gr - Granulocyte

GSEA - Gene set enrichment analysis

H

H60 - Histocompatibility H60

HER2 - Human epidermal growth factor receptor 2

hNKG2D - NKG2D humain

HSC - Hematopoietic stem cells

I

ICOS - Inducible T-cell CO-Stimulator

iDtr - Cxcl4-cre:iDtr

IFN- γ - Interferon gamma

IHb - Institute of human biology

ILC - Innate lymphoid cells

ITAM - Immunoreceptor tyrosine-based activating motifs

ITIM - Inhibitory motifs

J

jB - junBflox/flox::MORE-cre

K

KIR - Immunoglobulin-like receptor

L

LC - Lobular carcinoma

LOF - Loss of function

LSK - Lin⁻c-Kit⁺Sca-1⁺

M

M - Macrophages

mAb - Monoclonal antibody

Mac - Macrophage

MAPK - Mitogen-activated protein kinase

MaSC - Multipotent mammary stem cells

MDSC - Myeloid-derived suppressor cells

MEP - Megacaryocyte, Erythrocyte Progenitor

MF9 - MLL-AF9

MFI - Mean intensity of fluorescence

MHC - Histocompatibility complex

MICA - MHC class I chain-related polypeptides A

MIP-1 α - Macrophages-1 α

MIP-1 β - Macrophages-1 β

MO - Moelle osseuse

MMTV - Mouse Mammary Tumor Virus

MPN - Myeloproliferative neoplasm

MPP - Multipotent myeloid progenitor

MULT1 - Murine UL16-binding protein-like transcript 1

N

Nab - Nanoparticules

NIST - National institute of standards and technology

NK - Natural Killer

NKP - NK cell precursors

NOD - Non-obese diabetic

NST - Ductal carcinoma no special type

O

OS - Overall survival

P

PC - Principal component

PDO - Patient derived organoids

PDTX - Patient derived tumor xenografts

PI3K - Phosphoinositide 3-kinase

Plt - Plaquette

PR - Progesterone receptor

qRT-PCR - Real-Time Quantitative Reverse Transcription PCR

R

RAET1 - Retinoic acid early transcript 1

S

SCF - Stem cell factor

SERMS - Selective estrogen receptor modulators

SP - Sang périphérique

SP - Single-positive

S1P - Sphingosine-1-phosphate

SR - Auto-renouvelants

SS - Etat stable

T

TAM - Tumor-associated macrophages

TCB - T cell bispecific antibodies

T- Cell - Cellules T

TCR - T cell receptor

TDB - T cell Dependant Bispecific

T-DM1 - Ado-trastuzumab emtansine

TIL - Tumor-infiltrating lymphocytes

TKI - Tyrosine kinase inhibitor

TME - Tumor microenvironment

TNBC - Triple-negative breast cancer

TNF - Tumor necrosis factor

TR1 - Type 1 regulatory T

Treg - Regulatory T cells

tSNE - t-distributed Stochastic Neighbor Embedding

U

ULBP1-6 - UL16-binding proteins

V

VEGF - Vascular endothelial growth factor

W

WT - Wild-type

ACKNOWLEDGEMENT

First and foremost, I want to acknowledge my husband, Daniel. He has been my steadfast supporter for the past 15 years, always believing in me through both good and difficult times. This challenging year, in particular, has once again proven that he is my rock. I would be unbalanced without him, and I love him deeply.

I also want to thank my children, Eléni and Raphaël. They have been very patient this year. They well understood that I needed time to complete this thesis despite their young age. I hope that one day they will see that sometimes sacrifices are necessary to pursue what you believe is best for yourself and that this journey will inspire them.

My family has also played a central role, especially my mom and dad. Their unconditionally belief in me has always pushed me to keep going and reach further.

A special thank you goes to Emmanuelle Passegué, who brought about a significant shift in my professional life. Her trust and constant challenges helped me grow continuously. It hasn't been easy, but she has been an exceptional mentor. I still apply the lessons she taught me, and her passion and rigor for science have deeply inspired me.

I also want to extend my deepest thanks to Kevin Walsh, who supported me as soon as I mentioned my plans to apply for PhD validation. He is not only an amazing scientist but also a wonderful person.

I owe sincere gratitude to everyone who contributed, whether closely or from afar, to the papers that enabled me to write this thesis. I would like to particularly thank Stephanie Leong, Mikhail Binnewies, and Judy Mak.

This is not my first time balancing work with my studies, and I'm grateful to Jessica Zucman-Rossi and François Radvanyi for allowing me the opportunity and supporting me through the process. They helped shape me into a rigorous and diligent scientist. I also want to express my appreciation to Céline Vallot, who taught me everything about epigenetic modifications. She has been not only an incredible lab buddy but also a mentor and source of inspiration.

The last few years have presented their share of challenges, particularly as I ventured into new fields while starting at the IHB. However, joining the AOT team has been one of my greatest blessings. Working with Lauriane Cabon is real pleasure and has built my confidence. I'm excited about what we will achieve together. The AOT team's unique support, joy, and enthusiasm make our work environment truly exceptional. Relationships like these are rare and invaluable.

Lastly, I want to thank Philippe Georgel, who has been the sole reader of this thesis. His guidance, feedback, and timely responses have kept me motivated and on track.

I'm sure I've forgotten to mention many others, but that only reflects how full and enriching these last 20 years have been for me.

INTRODUCTION

To me, this PhD validation is the result of twenty years of hard work. I have always been driven by this passion that I have for biology. I knew early on what I wanted to do, contributing to the understanding of biology and finding ways to cure people. My experience with Dr Zucman Rossi and Dr François Radvanyi gave me a lot of expertise in genetic and epigenetic alterations in solid tumors but it also taught me how to approach, design and present a research project. I also continued my studies and obtained a Master degree in Oncology in 2011. These contributed to building very strong foundations that I could use for my future professional development.

I consider that my evolution toward being a scientist was when I joined Dr Emmanuelle Passegué at UCSF in San Francisco where I was leading a research project on the role of myeloid progenitors in the bone marrow during regeneration and leukemia. This experience was a real challenge, it was my first time in the United States, first time handling mice with no knowledge of the hematopoietic field and even less in stem cell biology. I literally started from zero. I grew enormously scientifically by working on this project. This is why I really want to highlight this work in the results part of the thesis.

In 2017, the lab moved to New York so I started to look for a job. I already learnt a lot about myeloid cell biology and I actually was eager to learn about T cell biology in the context of cancer immunology. Being in the Bay area opened my eyes to opportunities so I decided to try working in a pharmaceutical company. I was very lucky to join Genentech in Dr Kevin Walsh's lab. There, I studied the efficacy of NKG2D in breast cancer as part of a pipeline project and a research project. It led to a manuscript that is currently in revision that I will also present in the results section of the thesis.

Last year, I finally decided to move back to Europe and joined Dr Lauriane Cabon's lab at the Institute of Biology (IHB) at Roche in Basel (Switzerland). The IHB is solely focusing on using organoids as more predictive models for drug development and understanding biology in a more physiological context. In the lab, we are actually at the interface between applicable and fundamental research which is the "in between" situation that I had for the last 10 years. Our goal is to transfer and facilitate the adoption of models that are developed at the IHB to our colleagues on the drug development at Roche and Genentech. I actually see it as a very good opportunity to collaborate with my previous lab to follow-up on my project but using organoids. For me, it is a continuity that is why I decided to write the introduction about my last paper in this thesis. I will be able to use this knowledge in my current job and it will be also very helpful to think and design a new project that I can propose for a future collaboration between our lab and Genentech.

In this introduction, I will be giving an overview of breast cancer disease, treatments and models that are currently used in research. I will also introduce HER2, the tumor target of our interest in the context of cancer immunotherapy and why we used co-stimulation to increase the efficacy of the HER2 molecule. I hope it will help you to understand the context and the rationale of the project that I have been working on for the past 6 years.

1.1. Breast cancer

1.1.1. Mammary gland structure and development

The mammary gland is made of a branched ductal tree embedded in variable quantities of fat. The glandular tissue consists in multiple lobes, each of them subdivided in lobules that produce milk. Small tubes called ducts are able to carry the milk produced by the lobules towards the nipple. Luminal epithelial cells form the inner layer of the hollow lumen and are surrounded by basal myoepithelial cells (Figure 1).

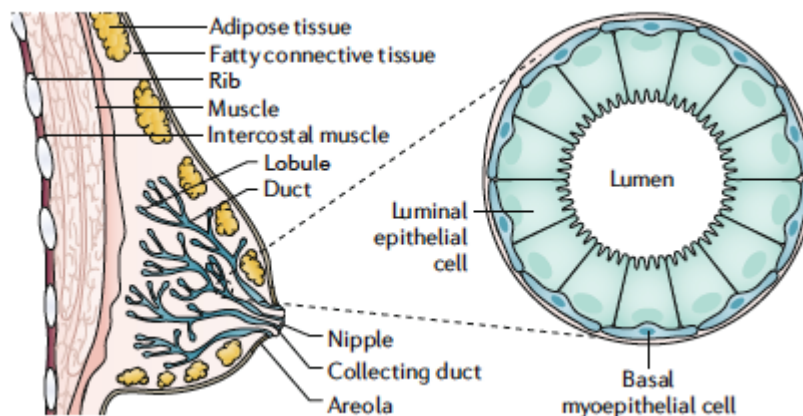


Figure 1 : **Mammary gland** (Harbeck et al., 2019)

Two main phases define the mammary gland development and formation. The first phase is hormone independent and starts with embryonic development where cells derived from the ectoderm give rise to the mammary stem cells. These cells give rise to basal and luminal progenitors to form the mammary epithelium. On the other hand, mesenchymal stem cells derived from the mesoderm, give rise to progenitors which will form the environment supporting the mammary epithelium by producing the extracellular matrix. This first phase is terminated by an inactive phase, until major changes start during the second phase. Indeed, the following phase is hormone dependent and starts with puberty where the progenitors

undergo a major cell specification leading to ductal elongation and branching. During pregnancy the alveolar differentiation and tertiary branching are completed allowing the mature milk-producing gland formation for a functional lactation after birth. After lactation, milk-producing epithelial cells are removed, this last step is called, involution. The presence of multipotent mammary stem cells (MaSC) which are self-renewing and asymmetrically divide provide unipotent stem cells with the extensive renewing capacity to luminal and myoepithelial lineages. This mechanism allows multiple cycles of proliferation, differentiation and involution until a full regression of the mammary epithelium during menopause (Figure 2).

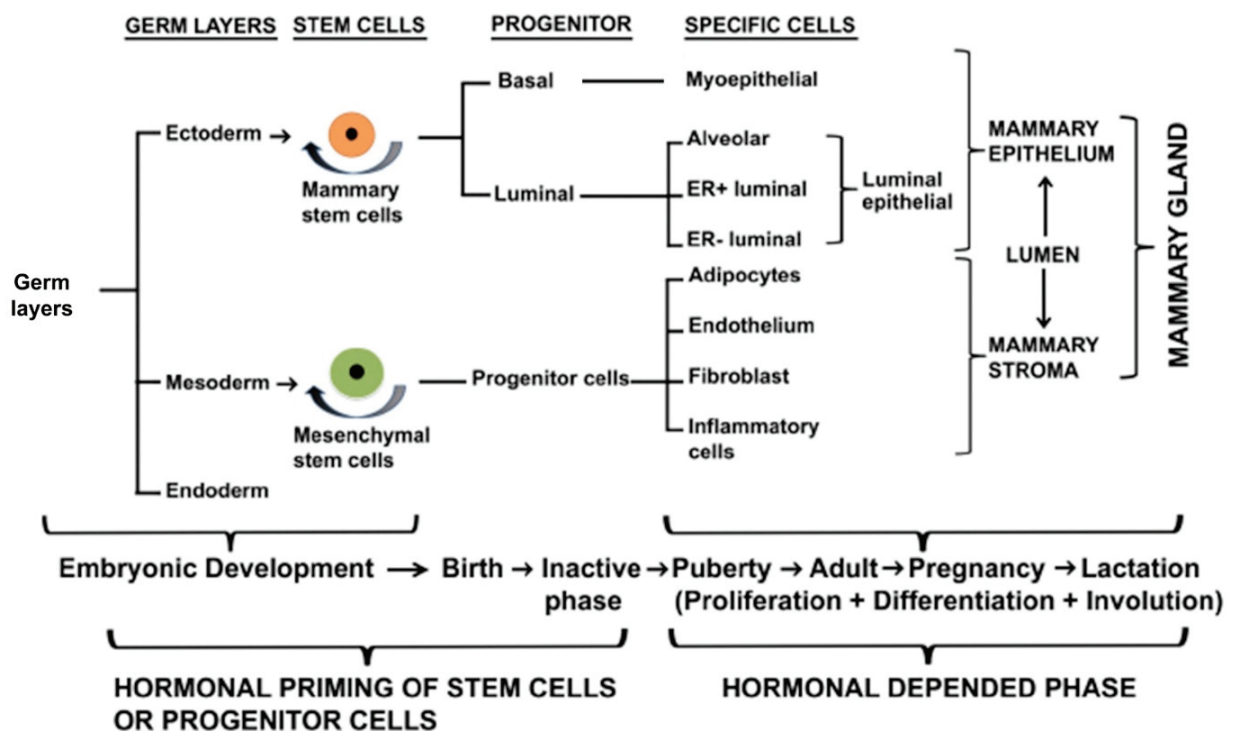


Figure 2 : Mammary development from embryonic development to adulthood (Biswas et al., 2022)

1.1.2. Breast cancer incidence and epidemiology

The global incidence of breast cancer has been rising with annual increases of 3.1%, beginning with 641,000 cases in 1980 and increasing to >1.6 million in 2010 (Bray et al., 2015). This trend is likely to continue regardless of the increase of disparities, population growth and ageing population. More than 2 million women worldwide in 2020 were diagnosed with breast cancer according to the Global Cancer Statistics 2020 (Harbeck et al., 2019; Sung et al., 2021).

Risk factors are multiple, with approximately 10% of breast cancers that are due to genetic predispositions (Shiovitz & Korde, 2015). The most known genes responsible for this cancer are BRCA1 (17q21) and BRCA2 (13q13). They are tumor suppressor genes implicated in DNA repair through homologous repair and are commonly mutated (Huen et al., 2010). Their mutations are autosomal dominant and lead to a loss of function. BRCA1 and BRCA2 mutations are associated with an average cumulative risk of developing breast cancer by the age of 80 years of 72% and 69%, respectively (Kuchenbaecker et al., 2017).

Other genes predisposing for breast cancers have also been described including ATM, CHEK2, PALB2, PTEN, STK11 and TP53 (Taylor et al., 2018).

Other risk factors have been described to be implicated in ~20% of breast cancers worldwide. These modifiable risk factors include obesity, physical inactivity and alcohol use, offering the potential for reduction in the disease burden by promoting a healthy lifestyle (Danaei et al., 2005).

1.1.3. Breast cancer diagnosis/classification

Breast cancer is the most frequent malignancy in women worldwide and is curable in ~70–80% of patients with early-stage, non-metastatic disease. On the opposite side, advanced breast cancer with distant organ metastases is considered incurable with currently available therapies.

Molecular alterations that drive breast carcinogenesis are complex, but it is essential to understand their impact in order to adapt the right treatment regimen. Several classifications using histological characteristics and molecular alterations have been developed to group tumors accordingly.

One of this classification has been developed based on histological subtypes (Figure 3), describing the most frequent subtypes of breast cancers. It classifies them in two sections. The least invasive are the preinvasive lesions including the ductal carcinoma in situ (DCIS) and the lobular carcinoma in situ (CIS) and the most invasive lesions include the ductal carcinoma no special type (NST) and the lobular carcinoma (ILC).

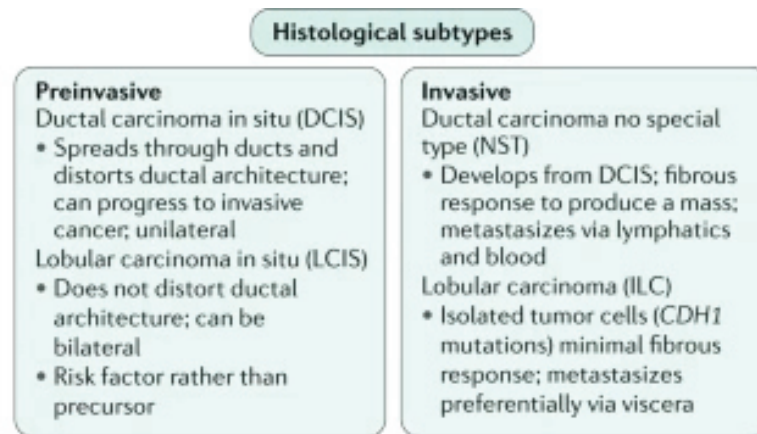


Figure 3: **Histological subtypes of breast cancers** (Harbeck et al., 2019)

Another classification, the intrinsic classification has been established using clinical data, transcriptomic analysis and molecular alterations (Cheang et al., 2015; Perou et al., 2000; Sorlie et al., 2001). Based on this last classification a surrogate intrinsic subtype classification has been developed and is used clinically. It is based on histology and immunohistochemistry expression of key proteins: estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PR), human epidermal growth factor receptor 2 (HER2, encoded by ERBB2) and the proliferation marker Ki67. Breast tumors which do not express ER, PR and HER2 are defined as triple negative tumors, while tumors which express ER and/or PR are hormone receptor-positive tumors. This classification helps to make decisions on treatments but also reflects the prognosis status of breast tumors (Figure 4).

Luminal A tumors tend to relapse late (after 5 years of first presentation) and have a tropism for bone and lymph nodes (as do luminal B, HER2-negative tumors). TNBCs are prone to early recurrences (within 2–3 years of first presentation) and tend to form visceral (lung) and brain metastases. Since the era of anti-HER2 targeted therapy, HER2-positive breast cancers show better prognosis, but they escape therapy by inducing brain metastasis.

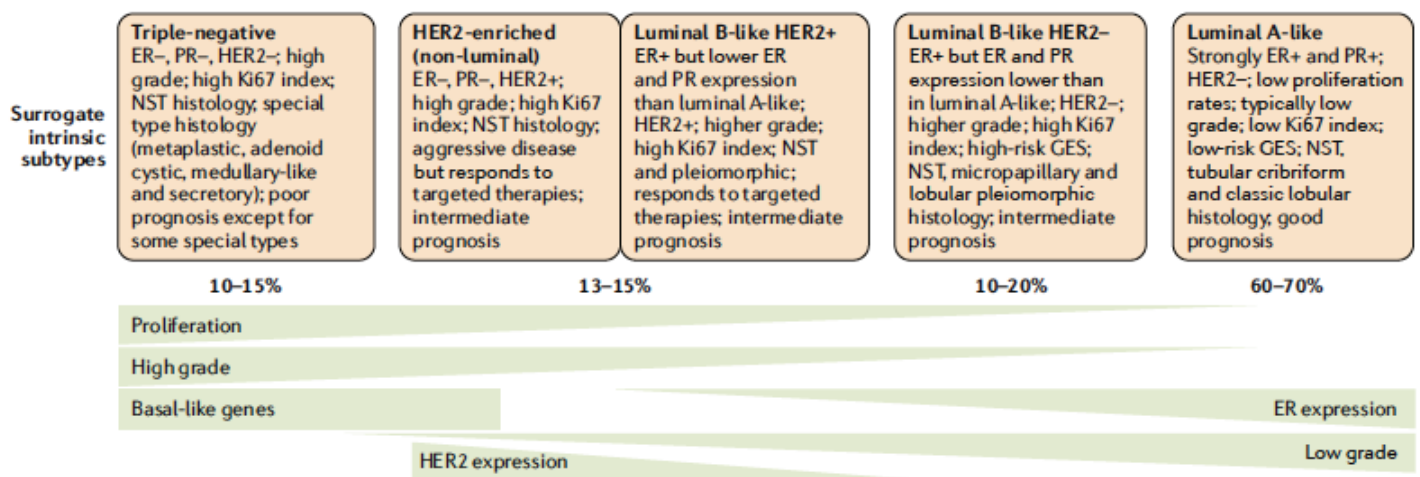


Figure 4 : **Breast cancer classification** (Harbeck et al., 2019)

1.2. Breast cancer treatments

The beginnings of breast cancer treatment date back to Antiquity, where the first descriptions of the disease and its treatments were recorded. However, significant advances in the understanding and treatment of breast cancer have emerged over the past few centuries. In the 19th century, surgeons like William Halsted introduced radical mastectomy, a radical surgical intervention aimed at removing the affected breast, lymph nodes under the arm, and pectoral muscles. This approach dominated treatment for decades, but over time, less invasive and more targeted methods were developed, such as breast-conserving surgery, radiotherapy, and chemotherapy. Since then, continued progress in the fields of molecular biology, immunology, and genomics has paved the way for more personalized and effective treatments, marking a new era in the fight against breast cancer.

1.2.1. Prognosis markers

As mentioned above, determination of histology and molecular expression ER, PR and HER2 status is essential to classify tumors and is mandatory for all patients with invasive breast cancer. Ki67 is also widely used to determine proliferation and predicts chemosensitivity for ER-positive and HER2-negative tumors.

Based on the molecular and histology characterization, breast tumors will be classified and depending if they are early breast cancer or late-stage breast cancer, the treatment regimen will change accordingly as described in Supplementary Figure 1 and 2.

1.2.2. Surgery

The most standard breast surgery approaches are either total removal of the breast (mastectomy), usually followed by breast reconstruction, or breast-conserving surgery (lumpectomy). Studies show that total mastectomy and lumpectomy plus irradiation are equivalent regarding relapse-free and overall survival (OS) for invasive tumors. Therefore, lumpectomy followed by breast irradiation is prioritized as long as the resected specimens have a normal tissue margin and provide an acceptable cosmetic result (Fisher et al., 2002).

The surgery to remove axillary lymph nodes is useful to determine cancerous cell spread and for therapeutic purposes. Clinical trials showed that axillary lymph node dissection and sentinel lymph node biopsy have the same effect regarding disease-free survival (DFS) and OS. Moreover, radiation and systemic treatment after sentinel lymph node biopsy showed an efficient elimination of residual tumor cells (Sener, 2020).

Treatments for all Breast Cancer Subtypes In addition to surgery, radiotherapy and chemotherapy are used routinely to treat all BC subtypes

1.2.3. Chemotherapy

Chemotherapy is used as a cytotoxic agent for cycling cells that can be administered as neoadjuvant or adjuvant for early breast cancer and for metastatic breast cancer treatment.

When chemotherapy is administered as a neoadjuvant, it can shrink the tumor to be removed with less extensive surgery. It is often used to treat cancers that are too big to be removed by surgery when first diagnosed, have many lymph nodes involved with cancer, or are inflammatory breast cancers.

Meanwhile, chemotherapy administered as an adjuvant after surgery can prevent residual tumor cells from growing and form new tumors and metastasis.

Based on their primary mode of action, chemotherapy agents have been classified. They include alkylating agents and platinum analogues, which induce inter- or intra- strand DNA crosslinks that destabilize DNA and cause DNA breakage. Antimetabolites inhibit the synthesis of DNA, RNA or their components, topoisomerase inhibitors block the DNA unwinding enzymes. Finally, microtubular poisons act on tubulin, impeding the mitotic spindle and stalling cell division (Tilsed et al., 2022).

The common chemotherapy drugs for breast early breast cancer include:

- Alkylating agent: Anthracyclines such as doxorubicin (Adriamycin) and epirubicin (Ellence)
- Antimicrotubule: Taxanes such as paclitaxel (Taxol) and docetaxel (Taxotere)

These drugs are often used with others agents :

- Antimetabolites : 5-fluorouracil (5-FU) or capecitabine (Xeloda)
- Alkylating agent: Cyclophosphamide (Cytoxan) or Carboplatin (Paraplatin)

For late stage and metastatic breast cancer:

- Antimicrotubule :
 - Taxanes such as paclitaxel (Taxol), docetaxel (Taxotere), and albumin-bound paclitaxel (Abraxane)
 - Vinca alkaloids such as Vinorelbine (Navelbine)
 - Ixabepilone (Ixempra)
 - Eribulin (Halaven)
- Topoisomerase inhibitors : Anthracyclines such as Doxorubicin (Adriamycin), liposomal doxorubicin (Doxil) and epirubicin (Ellence)
- Alkylating agent: such as platinum agents (Cisplatin, carboplatin)
- Antimetabolites : such as Gemcitabine (Gemzar) and Capecitabine (Xeloda)
- Antibody drug conjugates approved for advanced breast cancers:
 - Ado-trastuzumab emtansine (Kadcyla) : Myatansinoid (DM1) and target HER2
 - Fam-trastuzumab deruxtecan (Enhertu) : Deruxtecan (Dxd) and target HER2
 - Sacituzumab govitecan (Trodelvy) : Govitecan SN-38 and target is Trop-2

Chemotherapy is part of the standard of care for breast cancer and is combined with other therapies. For instance, the combination of chemotherapy with trastuzumab (described later in the introduction) significantly improved survival outcomes in patients with metastatic breast cancer overexpressing the HER2 protein (Slamon et al., 2001).

1.2.4. Radiotherapy

Cancer cells are highly proliferative and are more susceptible than normal cells to radiotherapy which uses high-energy X-rays, protons or other particles. Radiotherapy is

applied to the whole breast or a portion of the breast (after breast-conservative surgery), chest wall (after mastectomy), and regional lymph nodes (Boyages, 2017).

Radiation therapy may be used to treat breast cancer at almost every stage and is an effective way to reduce your risk of breast cancer recurring after surgery. In addition, it is commonly used to prevent metastasis spread.

Radiation can be delivered as external radiation or internal radiation (brachytherapy) in the tumor bed after tumor removal.

Radiation therapy is used to treat all BC subtypes, but its implication is more important for TNBC, as there is no personalized therapy for this subtype. It has been shown that radiotherapy benefits TNBC patients both after conserving surgery and mastectomy (He et al., 2018).

Radiotherapy can be administered concurrently with personalized therapy (anti-HER2 therapy or endocrine therapy). As one of the major side effects of radiotherapy is cardiotoxicity, it is critical to minimize exposure to the heart and lungs (Cheng et al., 2017).

1.2.5. Hormonal therapy

Estrogen and progesterone are both steroid hormones that are primarily produced in the ovaries in premenopausal women and by some other tissues, including fat and skin, in both premenopausal and postmenopausal women and in men. They are the primary regulators of breast tissue growth.

They bind respective nuclear receptors, the ERs and PRs which leads to the activation of transcriptional and membrane localized signaling activities. ER α and ER β are the 2 major ERs. The majority of breast cancers express ER α (70%), while ER β is less well characterized and constitute them as important drug targets.

All patients with ER- positive and/or PR- positive breast cancer, independent of HER2 status, should receive endocrine therapy to block the ER activity.

Blocking estrogen production:

One of the treatments aims at blocking ovarian function. Because the ovaries are the main source of estrogen in premenopausal women, estrogen levels in these women can be

reduced by eliminating or suppressing ovarian function. This was first noted by George T. Beatson when he performed an oophorectomy (ovary ablation) in rabbits resulted in a loss of lactation (Beatson, 1896). In 1895, he performed an oophorectomy on a premenopausal patient with unresectable breast cancer. She had complete remission and survived another 4 years. It created the foundations of hormonal therapy.

Beside surgery or radiotherapy, drugs such as goserelin (Zoladex) and leuprolide (Lupron) also act on ovaries to inhibit estrogen production.

In postmenopausal females, estrogen is no longer produced by ovarian tissue and is predominantly synthesized via the aromatase enzyme in subcutaneous fat, liver, and muscle. Aromatase inhibitors to block aromatase have been extensively explored as a treatment modality for breast cancer.

Examples of aromatase inhibitors approved by the FDA are anastrozole (Arimidex) and letrozole (Femara), both of which temporarily deactivate aromatase, and exemestane (Aromasin), which permanently inactivates aromatase.

Blocking estrogen's effects: Several types of drugs interfere with estrogen's ability to stimulate the growth of breast cancer cells.

Selective estrogen receptor modulators (SERMS) bind to estrogen receptors, preventing estrogen from binding. Tamoxifen (Nolvadex) has been for the first time approved by the US Food and Drug Administration (FDA) in the 1970s for the treatment of metastatic breast cancer in postmenopausal females (Robert, 1997). Another example of FDA approved SERM toremifene (Fareston).

Other anti-estrogen drugs, such as fulvestrant (Faslodex), work in a somewhat different way to block estrogen's effects.

1.2.6. HER2 targeting

HER2, coded by ERBB2, is a transmembrane glycoprotein. HER2 is, with epidermal growth factor receptors (HER1), HER3 and HER4, a member of the human epidermal growth factor family. These proteins comprise an extracellular ligand binding domain, a transmembrane domain and a tyrosine kinase intracellular catalytic domain. HER2 forms homo or heterodimers and activation occurs through dimerization after ligand binding, although no ligand specific for HER2 has been identified. In contrast with the others, HER2 has an extracellular domain that can adopt a fixed conformation resembling a ligand-activated state, permitting it to dimerize in the absence of a ligand (Cho et al., 2003). Once activated, the signal-transduction cascades of these receptors promote cellular proliferation and survival

(Yarden & Sliwkowski, 2001). HER2 overexpression or mutation can also induce dimerization (Brennan et al., 2000). In addition, cleavage by metalloproteases of the HER2 extracellular domain leaves a membrane-bound phosphorylated p95, which can activate signal-transduction pathways (Molina et al., 2001) (Figure 5).

HER2 signaling activates proliferation, cell survival, metastasis and adhesion through different pathways such as the RAS pathway and the phosphoinositide 3-kinase (PI3K), protein kinase B (AKT), or mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathways. HER2 is overexpressed in 20-30% of breast cancers and represents a crucial therapeutic target.

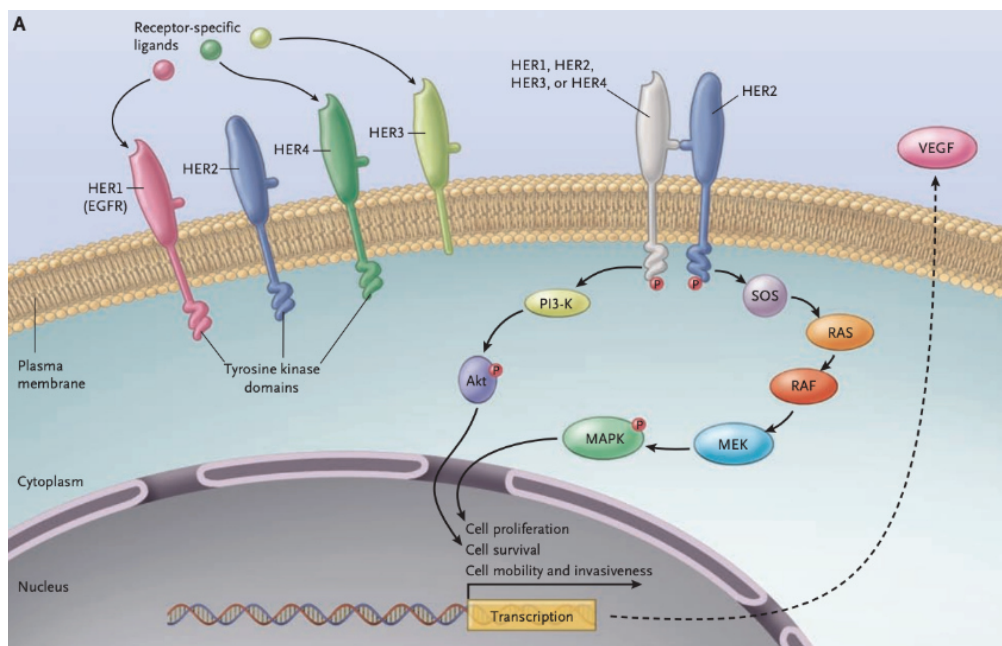


Figure 5 : Signal transduction by the HER family. There are receptor-specific ligands for HER1, HER3, and HER4. HER1, HER2, and HER4 each possess an intracellular tyrosine kinase domain. Phosphorylation of this domain, through homodimerization or heterodimerization, triggers cell proliferation and survival signaling. When HER2 is phosphorylated, it activates the lipid kinase phosphoinositide 3-kinase and the mitogen-activated protein kinase signaling pathways promoting cell survival and proliferation. Additionally, this pathway leads to the production of vascular endothelial growth factor (VEGF), which supports angiogenesis (Hudis, 2007)

Targeting HER2 is such a sensitive target, continued investigation to advance therapeutic benefit will undoubtedly lead to improvements in survival. Flavors of HER2-targeted therapeutic have been and are still under-development including monoclonal antibodies, tyrosine kinases inhibitors, ADCs, bispecific antibodies, immune system targeting agents, cellular therapy and targeted protein degraders. The goals of such approaches are to improve efficacy in a larger subset of patients, not only the ones that have high expression of HER2 (HER2+++) but also decrease toxicity.

The first FDA approved drug targeting HER2 twenty years ago was trastuzumab and radically improved the prognosis of this disease (Figure 6). It binds to the extracellular juxtamembrane domain of HER2 and inhibits the proliferation and survival of HER2-dependent tumors by physically inhibiting either homodimerization or heterodimerization. Moreover, Trastuzumab reduces shedding of the extracellular domain, thereby reducing p95 (Molina et al., 2001).

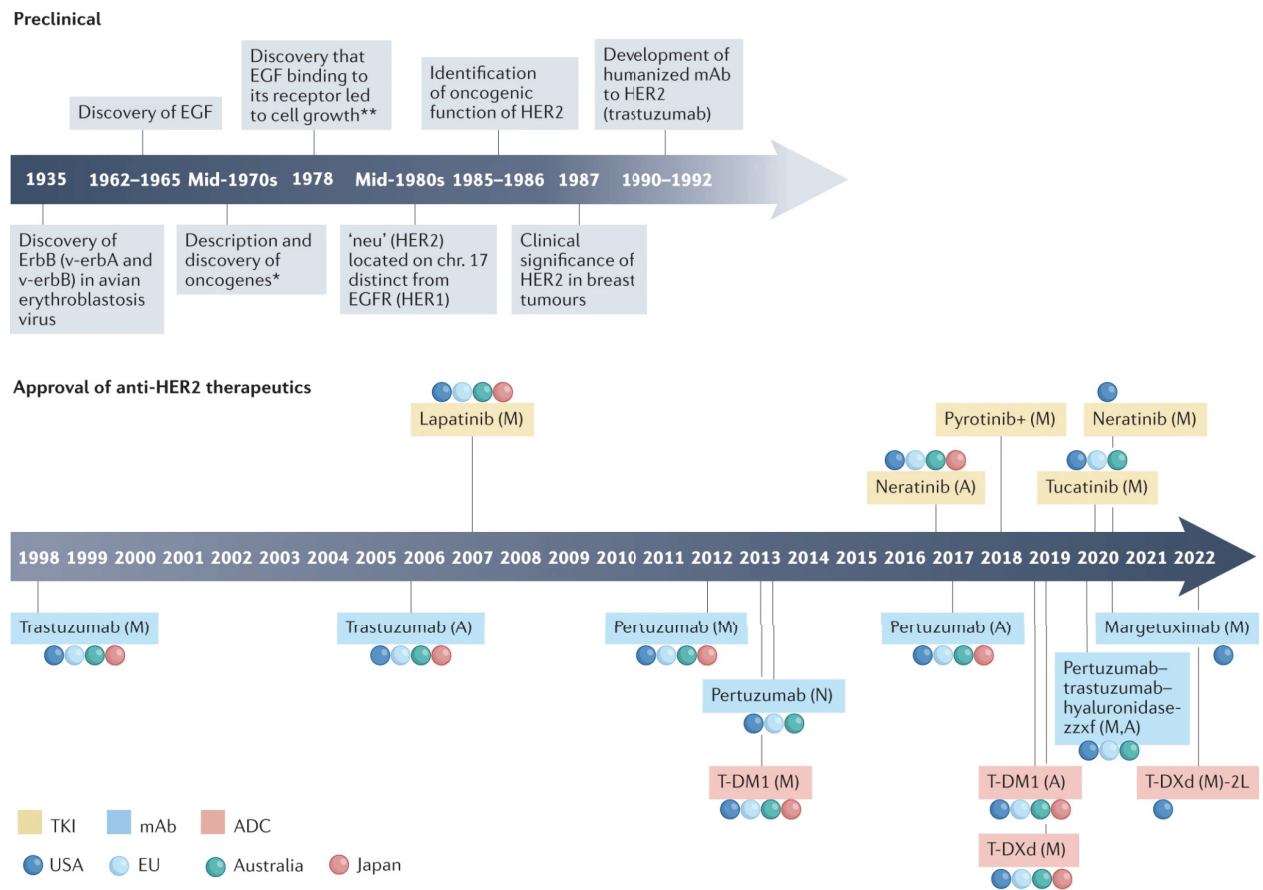


Figure 6 : **HER2 discovery and targeting therapy timelines targeting HER2** (Swain et al., 2023). HER2 discovery and targeting therapy timelines targeting HER2. The colored highlight of the molecule modality, whether it is a tyrosine kinase inhibitor (TKI), a monoclonal antibody (mAb) or an antibody drug conjugated (ADC). The colored dots reflect in which country the drug was approved

Finally, HER2 signaling Trastuzumab recruits Fc-competent immune effector cells and the other components of antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC), leading to

tumor-cell death. Additional mechanisms such as receptor down-regulation through endocytosis have been postulated (Figure 7).

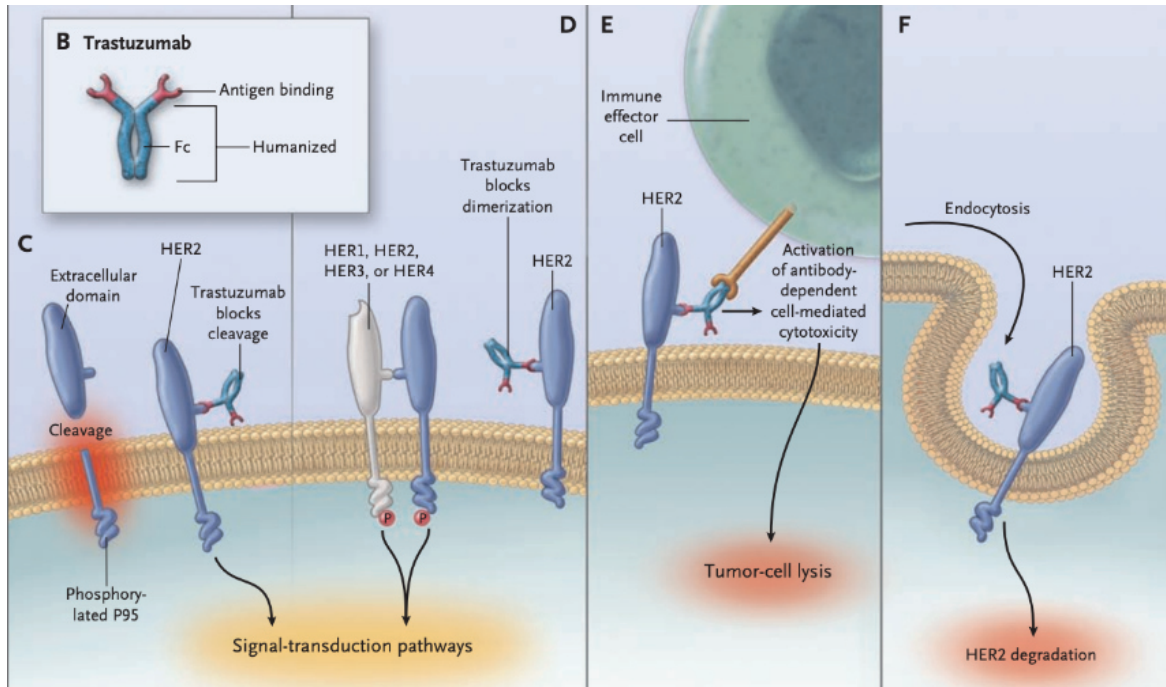


Figure 7 : **Trastuzumab mechanisms of action** (Hudis, 2007). Trastuzumab binding to a juxtamembrane domain of HER2 reduces the shedding of the extracellular domain when it is cleaved, thereby decreasing p95 levels (Panel C). Trastuzumab may also reduce HER2 signaling by physically inhibiting either homodimerization or heterodimerization (Panel D). Additionally, trastuzumab can recruit Fc-competent immune effector cells and other components of ADCC, leading to tumor cell death (Panel E). Other proposed mechanisms include receptor down-regulation through endocytosis (Panel F)

Other HER2-targeting monoclonal antibodies have been developed, such as pertuzumab which was approved as an adjuvant therapy in 2017 and prevents HER2 heterodimer formation with HER1, HER3 and HER4 (Eiger et al., 2019). It also has the capacity to induce ADCC activating the innate immune system to kill tumor cells (Scheuer et al., 2009). Next, margetuximab, an antibody targeting HER2 with an engineered Fc region, was designed to increase affinity for CD16A to elicit enhanced cytotoxicity by NK cells (O'Shaughnessy et al., 2023) (Figure 8).

TKIs are small molecules that target the intracellular catalytic kinase domain of HER2, competing with adenosine triphosphate, blocking phosphorylation and activating

downstream signaling cascades (Figure 8). Among these TKIs, lapatinib (Tykerb) is a reversible EGFR and HER2 inhibitor that can counteract some resistance with trastuzumab. Neratinib is an irreversible panHER TKI that targets EGFR, HER2 and HER4 (Collins et al., 2019). Animal models studies and clinical data revealed that six heavily pretreated patients with tumors bearing coincident HER2 amplification and mutation subsequently exhibited a statistically significant response to neratinib monotherapy while resistant to trastuzumab and lapatinib (Cocco et al., 2018). Tucatinib is a potent, oral, HER2-specific TKI with >1,000-fold greater potency for HER2 than EGFR. Tucatinib demonstrated CNS penetration in intracranial xenograft models and was superior to lapatinib in preclinical studies. Tucatinib was FDA approved in April 2020 for the treatment of HER2+ MBC, including patients with CNS metastases.

ADCs are a type of targeted therapy designed to deliver chemotherapy directly to cancer cells while minimizing damage to healthy cells. After binding to the target, the ADC is internalized into the cancer cell, where the linker is cleaved, releasing the cytotoxic payload and induces cell death (Figure 8). Ado-trastuzumab emtansine (T-DM1) (Kadcyla®) was the first anti-HER2 ADC approved, it comprises trastuzumab with the anti-microtubule agent DM1 (Lewis Phillips et al., 2008). T-DM1 prolonged progression free and overall survival in patients with HER2+ metastatic breast cancer compared with current standard of care in large, randomized trials, validating HER2 overexpression as a target in trastuzumab resistant breast cancer and showcasing the efficacy of ADCs in this setting.

T-DXd is a HER2 ADC comprising trastuzumab conjugated to DXd. The linker of DXd is selectively cleaved by cathepsins, which are upregulated in tumors, releasing the payload preferentially inside cancer cells. T-DXd showed remarkable antitumor efficacy in refractory HER2-positive metastatic breast cancer and in a direct comparison with T-DM1 as second-line treatment for HER2-positive metastatic breast cancer and was FDA approved for these patient populations (Cortes et al., 2022).

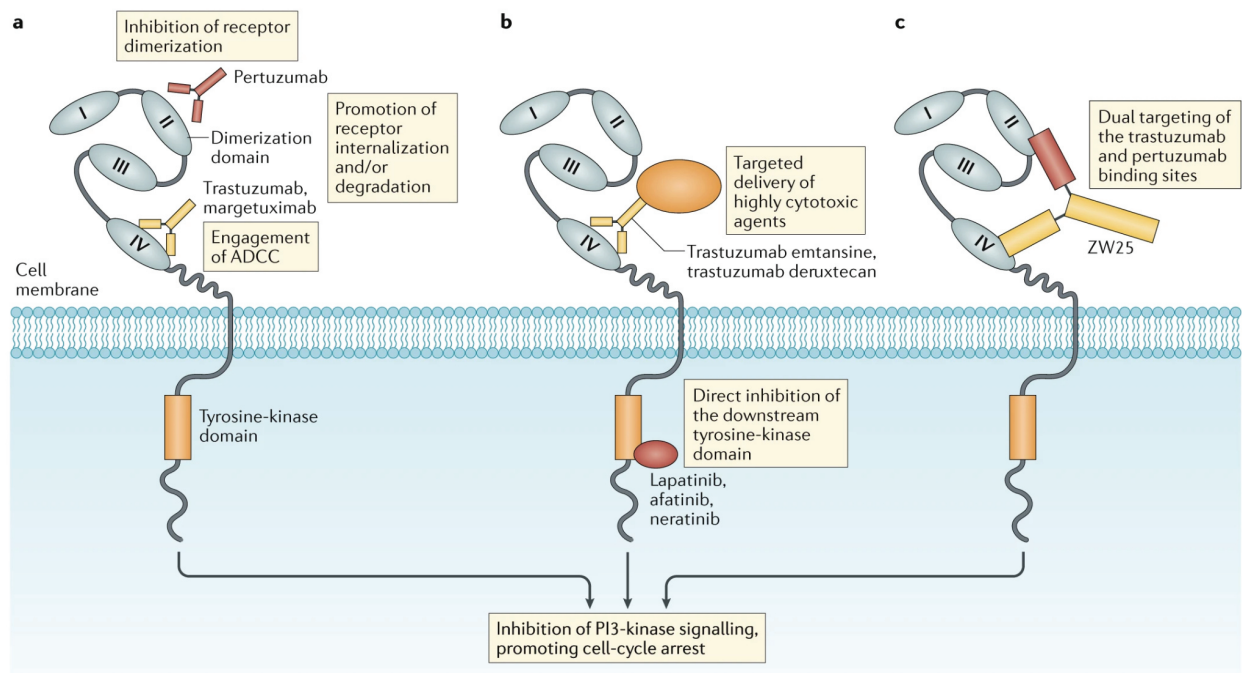


Figure 8 : **Mechanism of action of agents targeting HER2** (Oh & Bang, 2020). Although impressive improvements have been made in OS in the adjuvant setting with trastuzumab/pertuzumab/chemotherapy and T-DM1, metastatic HER2 positive tumors develop resistance, leading to disease progression and remain incurable. The treatment of such cancer is palliative rather than curative. Hence, improvement in survival is an important treatment goal (Ribas & Wolchok, 2018; Sasse et al., 2022; Sharma et al., 2021).

Cancer immunology has become groundbreaking with the development and approval of immunotherapies that have significantly improved outcomes for cancer patients for the past decades. The creation of rituximab in 1997 was a notable milestone in cancer immunotherapy, closely followed by the discovery of immune checkpoint proteins, such as CTLA-4 and PD-1/PD-L1, and the subsequent development of corresponding checkpoint inhibitors, ipilimumab (anti-CTLA-4) and nivolumab (anti-PD1), respectively, in the early 2000s. These breakthroughs, combined with advances in adoptive T cell therapy and other immunomodulatory agents, have reshaped the treatment paradigm for diverse cancers, delivering remarkable outcomes in patients. This is the case for breast cancer and HER2 targeted therapy that I will develop later in the introduction.

1.2.7. Breast cancer models

Breast cancer models are essential tools for investigating the underlying biology of breast cancer, understanding its progression, and evaluating potential therapies. These models can be broadly categorized into *in vitro* and *in vivo* models. They have their advantages and disadvantages that I will also mention throughout the paragraph.

1.2.7.1. *Breast cancer cell lines*

Cell lines derived from human breast tissue that has been adapted to grow indefinitely in laboratory conditions. They have the advantage of being easy to handle and grow easily. They can be categorized based on their molecular subtype, which relates to the presence or absence of receptors that are used to classify breast cancers and are often targeted in breast cancer treatment. Here are the molecular subtypes defined based on the expression of these receptors with some examples of cell lines associated.

- **ER-positive** breast cancer cell lines which express the estrogen receptor and often respond to hormone therapy such as MCF-7, T47D, and ZR-75-1.
- **PR-positive** breast cancer cell lines which express the progesterone receptor and may also respond to hormone therapy such as MCF-7 and T47D.
- **HER2-positive** breast cancer cell lines which overexpress the HER2 receptor and may respond to HER2-targeted therapies such as SK-BR-3 and BT-474. I actually used BT-474 cells in the study that I will develop later in the manuscript.
- **Triple-negative breast cancer (TNBC)** cell lines which do not express ER, PR, or HER2 receptors and often require different treatment approaches. Examples include MDA-MB-231 and MDA-MB-468.

It's important to note that these categories are not mutually exclusive, as some cell lines may express multiple receptors or exhibit heterogeneity within the same subtype. This is why choosing and characterizing the cell lines for studies is key to being able to answer the right questions.

Cell lines have limitations since they lack the complexity of tumors. They are in 2D and lack immune cells in the system but they are easy to handle and modify so they stay the best of choice for applications that involve screening and high throughput applications.

1.2.7.2. *Mouse models*

Nonetheless, more complex models have been used for a long time, such as mouse models. They have the advantage of mimicking human tumors, allowing a better understanding of the biology and a better evaluation of drug efficacy. While mouse models cannot fully replicate the complexity of human cancer, they can provide valuable insights into potential therapeutic approaches and help prioritize which treatments should be tested in clinical trials. Following below, it is an overview of mouse models used in research for breast cancer but with a focus on relevant examples for my project.

Transgenic Mouse Models are genetically engineered to carry mutations in specific genes associated with breast cancer. The most common mouse model is the MMTV (Mouse

Mammary Tumor Virus) Transgenic Mice. MMTV is an oncoRNAvirus of the Retroviridae family, which causes breast tumors once activated. MMTV long terminal repeat (LTR)-driven transgenic mice are excellent models for breast cancer as they allow for the targeted expression of various oncogenes and growth factors in neoplastic transformation of mammary glands (Taneja et al., 2009).

The MMTV.huHER2 model has been widely used to study the biology of HER2-positive breast cancer, including the molecular mechanisms underlying tumor initiation, progression, and metastasis, as well as the development and testing of new therapeutic approaches. These mice are genetically engineered to express a constitutively active form of HER2 under the MMTV promoter. The overexpression of HER2/neu results in the spontaneous development of mammary tumors. These tumors closely resemble human breast cancer in terms of histopathology, molecular characteristics, and response to therapy (Finkle et al., 2004; Guy et al., 1992).

One mouse model that is derived from the MMTV.huHER2 is the MMTV-Her2-transgenic Founder #5 tumor models (Lewis Phillips et al., 2008). It consists of the tumor passage from mouse to mouse. Basically, tumors were removed and cut into tumor fragments that were surgically implanted into the mammary fat pad of tumor naive female FVB WT mice at 6-8 weeks of age. It is one of the mouse models that we have used in our studies.

Patient derived tumor xenografts (PDX) are established by the direct transfer of human tumors into highly immunodeficient mice since the mouse immune system could kill transplanted cancer cells and prohibit tumor engraftment.

Non-obese diabetic (NOD)-scid, NOD.Cg-PrkdcscidIl2rgtm1Wjl/SzJl (NSG), or NOD.Cg-PrkdcscidIl2rgtm1Sug/ShiJic (NOG) mice, which are characterized by a relatively severe immunodeficiency due to a decrease or complete lack of natural killer (NK) cell functions, are the major tools for PDX establishment. Tumor samples are obtained from patients by surgical resection or biopsy and are oftenly implanted orthotopically into mammary fat pads for breast cancer. Human immune cells that can be inoculated usually do not survive for a long time. The advantage though is that they can resemble the original tumors in patients, both histologically, genetically and could show comparable treatment responses (Zhang et al., 2013).

Cell line xenograft models are used to recapitulate the interaction between cancer cells and the tumor microenvironment. Cancer cell lines are transplanted into immunodeficient mice but tend to lose the heterogeneous characteristics of original tumors by the selective pressure on cell culture in vitro.

Murine models cannot completely predict drug efficacy because of the considerable differences between the immune system of mice and humans and because they do not recapitulate the tumor microenvironment of origin. That is why researchers put emphasis on the necessity for the development of organoids.

1.2.7.3. Organoids

Patient derived organoids (PDOs) are multicellular, three-dimensional (3D) structures derived from freshly resected primary tissue samples. These models have enabled researchers to investigate the molecular mechanisms underlying tumor initiation, progression, and metastasis, as well as the identification of biomarkers associated with disease subtype and prognosis. They also help to understand drug therapy efficacy and are instrumental for back translation studies (Ganesh et al., 2019; Yao et al., 2020) (Figure 9). Organoid models can be derived from stem cells from adult tissues or can be iPSC derived and be more or less complex to recapitulate the architecture and heterogeneity of tumors *in vitro* (Figure 10). They offer several advantages over traditional cell culture and animal models (Clevers, 2016; Schutgens & Clevers, 2020). The mammary gland is structured as an elaborate network of ducts and alveolar structures. Its composition is made of a bilayer of Luminal epithelial cells and basal cells separated by a laminin-rich basement membrane. Despite a lot of efforts, there is still a lot to improve to reproduce physiological conditions similar to those seen in patients.

Table 1 | **Comparison of the described preclinical cancer models**

Feature	Cancer cell lines	Conditional reprogramming	Adult stem cell-derived organoids	PDX
Success rate of initiation	±	+++	+++	++
Ease of maintenance	+++	++	++	±
Resource consumption	Low	Low	Medium	High
Expansion	+++	+++	++	+
3D growth	±	±	++	+++
Retention of phenotypic features in vitro	–	–	++	+++
Retention of genetic features in vitro	±	++	++	++
Representation of cancer spectrum	+	+ ^a	++	++
Amenable to genetic modification	+++	NA	+++	–
Matched normal controls	–	++	+++	–
Tumour–stroma interactions	–	–	–	++
Incorporation of an immune system	–	–	± ^b	–
Genetic cancer modelling (initiation and progression)	–	NA	+++	–
Low-throughput drug screens	+++	+++	+++	+
High-throughput drug screens	+++	+++	++	–
Biobanking	–	++	+++	–

Respective features were judged as best (+++), suitable (++), possible (+), not very suitable (±) or unsuitable (–). NA, not available; PDX, patient-derived tumour xenograft. ^aOnly in epithelial tumours. ^bThe immune system could be implemented by co-culturing organoids with haematopoietic cells^{66,68}. Table adapted and updated with permission from REF.¹¹⁶, Elsevier.

Figure 9 : **Comparison of the described preclinical cancer models** (Drost & Clevers, 2018)

Key advances occurred when researchers realized the vital role of the extracellular matrix in receiving and integrating structural and functional signals that can direct specific gene expression in differentiated tissues. The first and most widely adopted material for this purpose is extracellular matrix (ECM) isolated from Engelbreth-Holm-Swarm (EHS) mouse sarcoma cells, a substance that has since been commercially adopted as Matrigel®. In 1987, breast epithelial cells grown on this material were seen to self-organize into 3D ducts with lumen before beginning to synthesize and secrete milk protein (Li et al., 1987). For each tissue and disease conditions, it is essential that researchers fine tune the ideal matrix and culture conditions to create models as close as possible to physiological conditions. These models can be described according to their complexity (Figure 10).

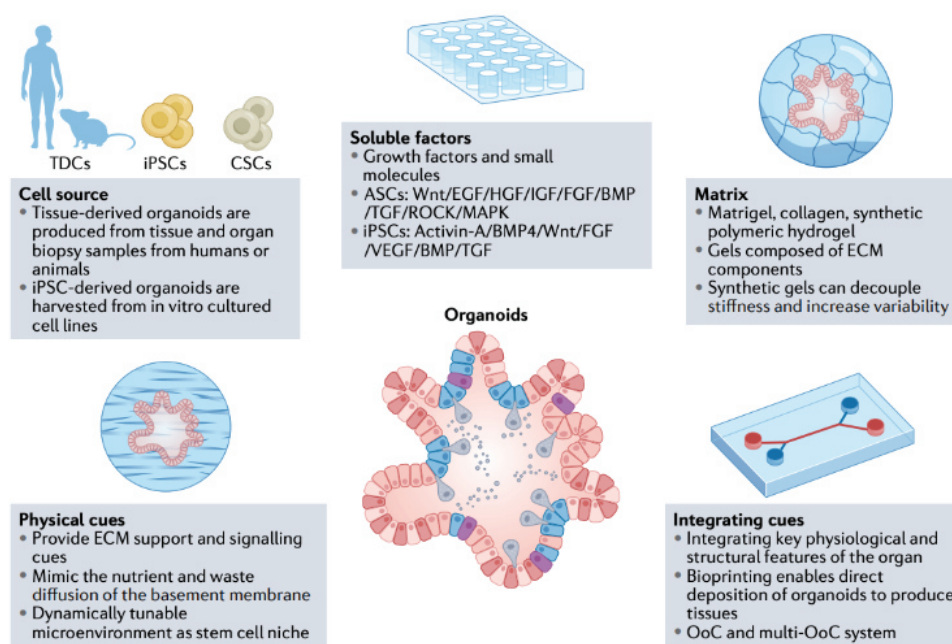


Figure 10 : **Organoid engineering components** (Zhao et al., 2022)

Even by simply culturing breast cell lines in 3D instead of 2D and comparing drug efficacy, Jean Zheng Boyer et al., showed that cells in 3D respond less to T-DM1 than cells in 2D. They observed that cells cultured in 3D formed spheroids and contained heterogeneous cell populations that 2D don't have and could explain the resistance and the difference of mechanism of action of T-DM1 making this model more predictive for drug efficacy (Boyer et al., 2021). Another study reported similar outcome with chemotherapy treatments (Imamura et al., 2015).

Nevertheless, this type of model is very simple, it lacks the tissue organization and microenvironment. Although a more complex organization of breast organoids have been reported by Linneman et al., in 2015, they didn't succeed in maintaining cell identity and structure for a long time and through passages (Linnemann et al., 2015). Other groups on the other hand, achieved maintaining mouse mammary gland organoids in culture for a longer period of time and through multiple passages by optimizing culture media and identifying a more defined stem cell population (Jamieson et al., 2017; Jarde et al., 2016; Zhang et al., 2017). Finally protocols to establish human breast organoids emerged leading to fully characterized biobanks creation to accelerate the understanding of physiology, disease context and drug development (Aggarwal et al., 2023; Sachs et al., 2018) (Figure 11).

TABLE 1 | Significant mammary organoid studies with associated protocol details.

Study (Year)	Source of organoid	Type of matrix	Technique	Significance of study
Simian et al. (2001)	Normal mouse mammary glands and mammary epithelial cell lines	Type I Collagen	Organoids embedded in collagen gels	Provided evidence for role of matrix metalloproteinases in mammary epithelial branching
Lee et al. (2007)	Human breast cell lines, either normal or malignant	Engelbreth-Holm-Swarm extracellular matrix extract, Matrigel	Embedded assay with layering method, 3D on-top assay	Describes different techniques for 3D culture assays
Ewald et al. (2008)	Transgenic mouse mammary glands	Matrigel	Suspension of organoids in Matrigel	Demonstrated common branching mechanisms of branching morphogenesis in mammary epithelial cells
Nguyen-Ngoc et al. (2015)	Normal mouse mammary glands	Both Matrigel and Collagen I	Several protocols for different ECMs	Provides examples of outcomes of various types of assays with different ECMs
Sachs et al. (2018)	Human breast cancer tissue	Basement Membrane Extract	Cells suspended in basement membrane extract drops	Established a biobank of breast cancer organoids
Djomehri et al. (2019)	Malignant mouse mammary tissue, immortalized cell lines	Matrigel	Hanging drop array	Demonstrated scaffold-free technique
Mazzucchelli et al. (2019)	Human breast cancer tissue	Matrigel	Seeding of organoids in Matrigel droplets	Described novel technique for isolating patient-derived organoids from surgical and biopsy specimens
Chen et al. (2019)	Normal human breast tissue	Matrigel	Growth of organoids from mammospheres in low-attachment plates	Described isolation of progenitor cell-generated organoids
Mollica et al. (2019)	Normal human and rat mammary tissue	Decellularized rat or human breast tissue utilized to form hydrogels	Bioprinting technique	Developed 3D bioprinted organoids with significant reproducibility
Dekkers et al. (2021)	Human normal and breast cancer tissue	Basement Membrane Extract	Tissue suspended in basement membrane extract and plated in drops	Demonstrated long-term culture of normal and breast cancer organoids
Pan et al. (2021)	Human malignant pleural effusion	Basement Membrane Extract	Pleural effusion specimen centrifuged, suspended in basement membrane extract, and placed suspension plate	Successfully expanded pleural effusion-derived triple negative BC organoids

Figure 11 : Significant mammary organoid studies with associated protocol details (Mohan et al., 2021)

Not much progress has been made yet using breast organoids in more complex models but many laboratories are working to really tackle the limitations that we have using *in vitro* 2D and *in vivo* models. One example is the IHB which I joined in May 2023. It has the mission of developing human *in vitro* systems using organoids, developing disease modeling and improving treatment predictability. Being part of the pharmaceutical company Roche has the advantage of developing efficient interactions to develop relevant models and research projects that can impact clinical research and directly benefit patients.

More and more complex models are under development for multiple indications (Magre et al., 2023) in immuno-oncology to study tumor-specific immune interactions and treatment efficacy. Using such models allows us to do reverse translational studies to better understand the lack of efficacy or toxicity observed in clinical trials. A recent paper has shown that using a co-culture of PBMC with healthy intestinal organoids could have predicted toxicity that was observed during clinical trials with bispecific antibodies in colorectal cancer (Harter et al., 2024).

By modeling cell stem cell behavior *in vitro*, researchers have gained insights into the molecular pathways regulating CSC self-renewal, differentiation, and tumorigenic potential. This knowledge has led to the development of targeted therapies aimed at eradicating CSCs

and improving patient outcomes. To recreate the heterogeneity and the complexity of tumor microenvironment researchers have been thinking and developing more complex culture formats (Figure 12). Recently researchers have started using commercialized chips (e.g. AIM Biotech or Mimetas) and performing bioengineering to recreate “mini organs” which make these models more physiologically relevant (Nikolaev et al., 2020) (Figure 13). These models are enabling researchers to investigate the molecular mechanisms underlying tumor initiation, progression, and metastasis, as well as the identification of biomarkers associated with disease subtype and prognosis (Shamir & Ewald, 2014). As the field continues to evolve, ongoing research efforts will further refine organoid models, expand their applications, and ultimately improve outcomes for breast cancer patients. This is what I would like to contribute in the field of breast cancer biology at the IHB and what will become a prominent part of my future project, as developed in the discussion part of my thesis.

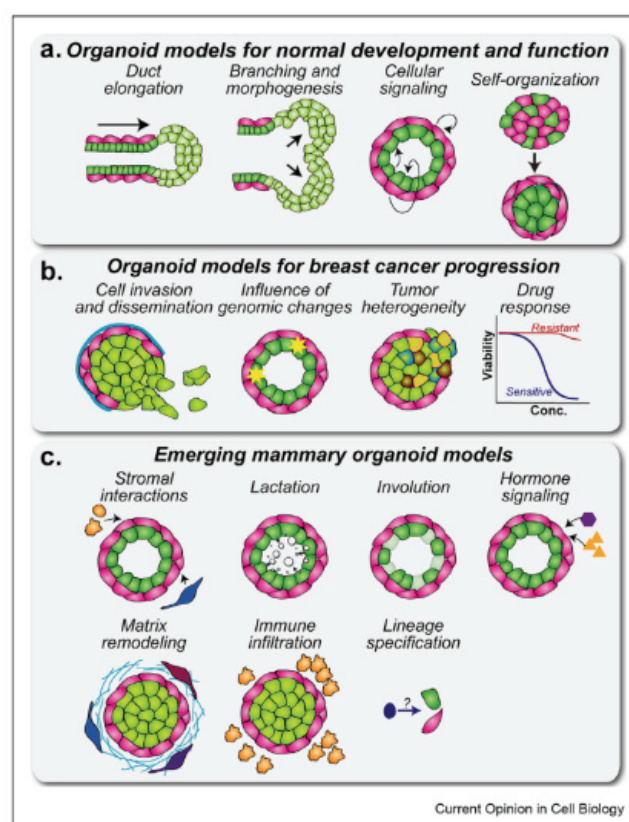


Figure 12: **Emerging organoid models** (Srivastava et al., 2020)

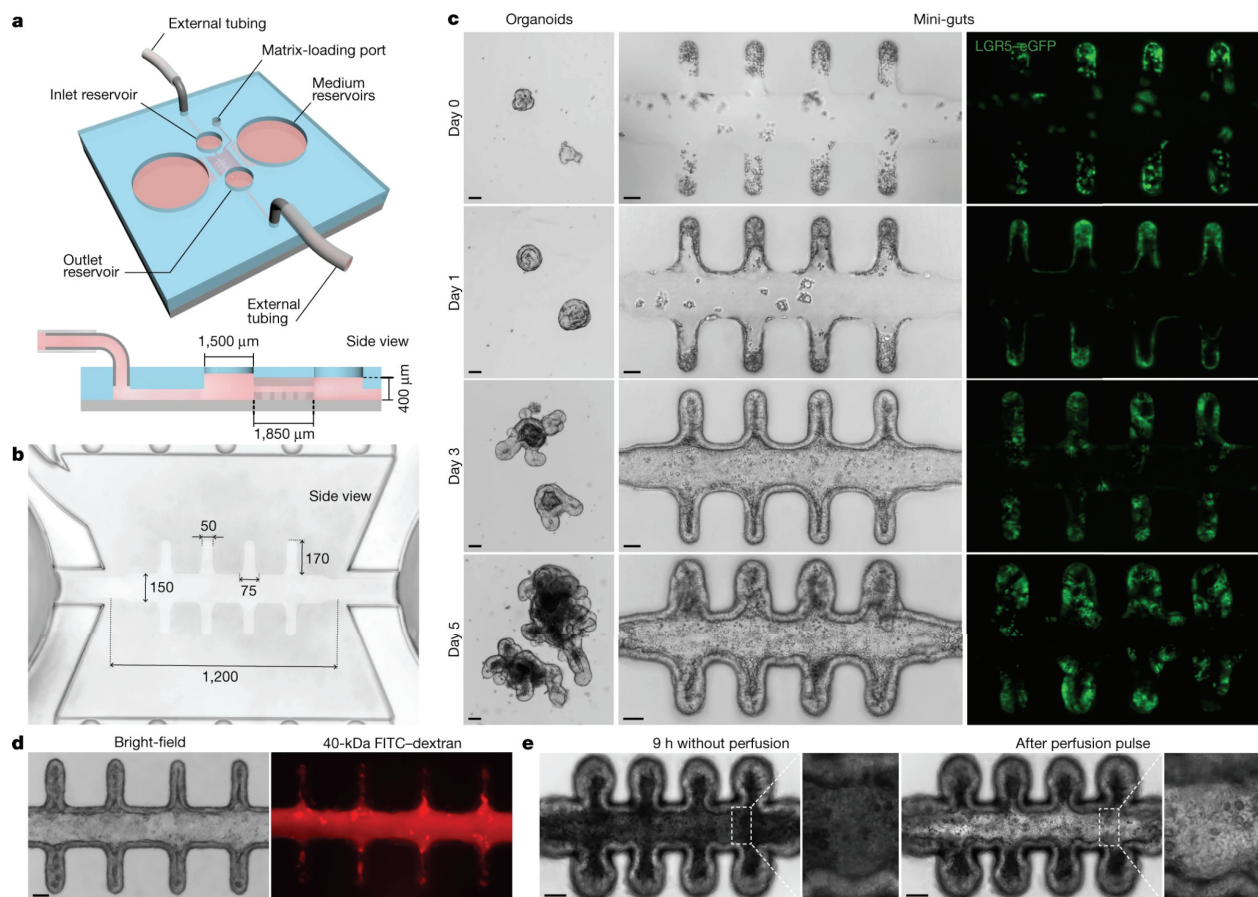


Figure 13 : **3D hydrogel-containing microdevice developed for the mini-gut culture** (Nikolaev et al., 2020)

1.3. Immunology

1.3.1. Basics and principles of Immunology

The history of immunology is a rich narrative that spans centuries, marked by key discoveries and groundbreaking research that have shaped our understanding of the immune system. During the Plague of Athens in 400 BC, it was observed that individuals who survived the disease were resistant to reinfection. Also, during the 10th century in China, smallpox inoculation (variola) was practiced by exposing individuals to material from smallpox lesions. Finally, the birth of modern immunology started with Edward Jenner when he developed the first successful vaccine by using cowpox to confer immunity to smallpox in 1796. This groundbreaking work laid the foundation for vaccinology. In 1880, Louis Pasteur's experiments with cholera and anthrax in chickens and sheep demonstrated the principles of vaccination and attenuation of pathogens.

Hematopoiesis is the process by which all blood cells are formed, originating from a common progenitor, the hematopoietic stem cell (HSC). HSCs reside primarily in the bone marrow and possess the unique abilities of self-renewal and differentiation into various specialized cell types. The differentiation pathway begins with the HSC giving rise to multipotent progenitor cells, which further bifurcate into two main lineages: the myeloid and lymphoid lineages. The myeloid lineage includes the formation of red blood cells (erythrocytes), platelets, and several types of white blood cells such as granulocytes (neutrophils, eosinophils, and basophils), monocytes, and macrophages. On the other hand, the lymphoid lineage leads to the production of lymphocytes, including B cells, T cells, and natural killer (NK) cells, which are crucial for the adaptive immune response. This intricate process is tightly regulated by a network of cytokines, growth factors, and transcription factors to ensure a balanced production of all blood cell types, maintaining both immune function and oxygen transport (Figure 14).

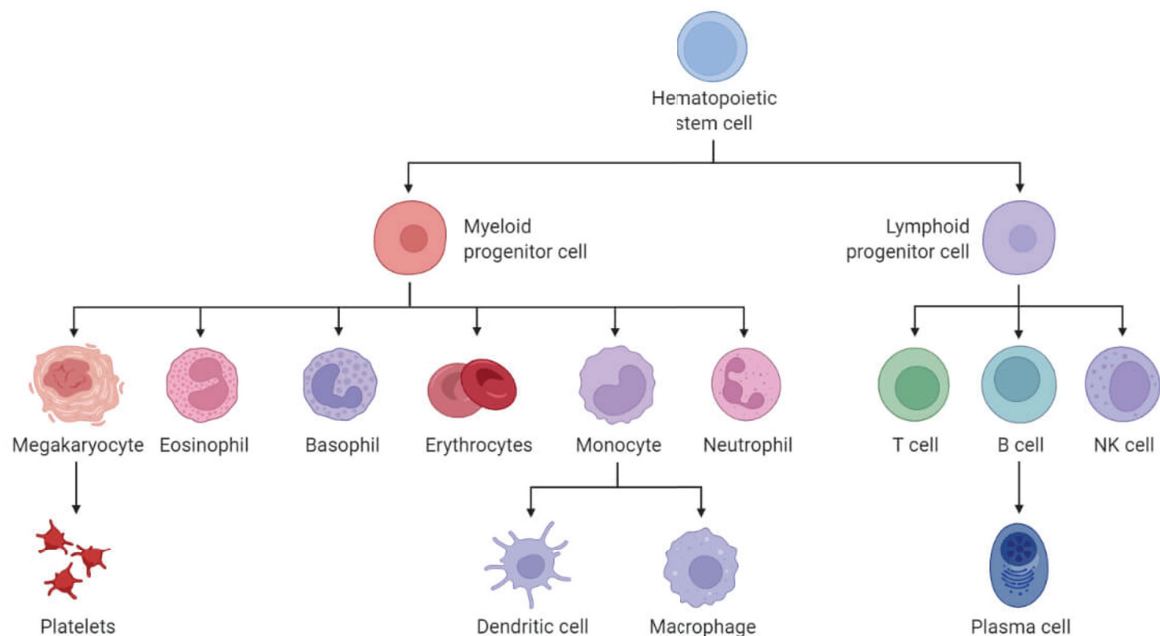


Figure 14 : **Hematopoiesis.** Hematopoiesis is the process by which all blood cells are formed from hematopoietic stem cells (HSCs) in the bone marrow, capable of self-renewal and differentiation. HSCs differentiate into myeloid and lymphoid lineages, producing red blood cells, platelets, various white blood cells, and lymphocytes, with this process tightly regulated to maintain immune function and oxygen

Immunology is the branch of science focused on understanding the immune system, its components, and how it functions to defend the body against pathogens, such as bacteria, viruses, and parasites. This field explores the complex interactions between various immune cells and molecules to maintain health and prevent disease. The immune system is broadly divided into two types: innate immunity and adaptive immunity (Figure 15).

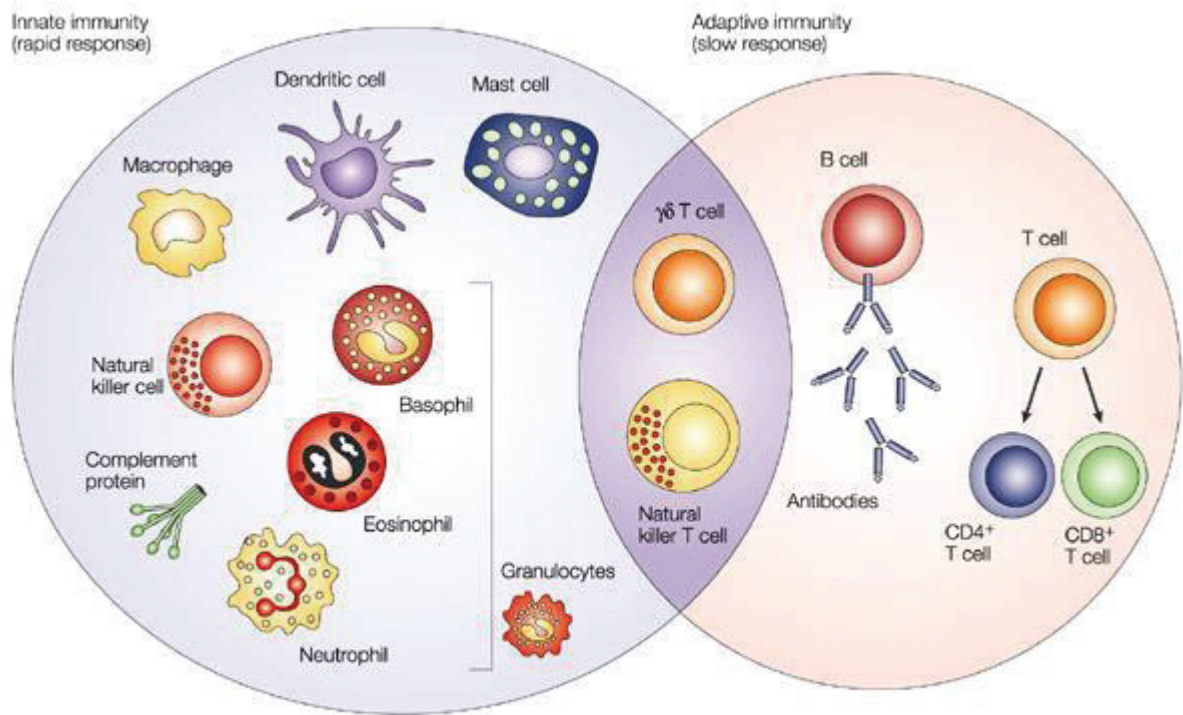


Figure 15: **The innate and adaptive immune system.** The innate immune response serves as the initial line of defense against infection. It comprises soluble factors, such as complement proteins, and a variety of cellular components including granulocytes (basophils, eosinophils, and neutrophils), mast cells, macrophages, dendritic cells, and natural killer cells. In contrast, the adaptive immune response takes longer to develop but offers increased antigen specificity and memory. This response involves antibodies, B cells, and CD4+ and CD8+ T lymphocytes. Additionally, natural killer T cells and $\gamma\delta$ T cells are cytotoxic lymphocytes that operate at the boundary between innate and adaptive immunity (Dranoff, 2004)

Innate immunity is the body's first line of defense and has an important role in controlling infection during the first 7 days after infection. It includes physical barriers like the skin, as well as immune cells such as dendritic cells, macrophages, mast cells, neutrophils, basophils and eosinophils which recognize and attack common pathogens in a non-specific manner. They also produce cytokines or interact with other cells directly in order to activate

the adaptive immune system. Other cell types, such as gamma-delta T cells and Natural Killer (NK) cells that are lymphocytes without antigen specificity, therefore are considered to be innate cells with some similarities to effector lymphocytes.

In contrast, adaptive immunity is slower to respond but provides a highly specific and long-lasting defense. It involves lymphocytes, including T cells and B cells, which recognize specific antigens through unique receptors and create immunological memory. This allows the adaptive immune system to respond more efficiently upon subsequent exposures to the same pathogen. While innate immunity acts as a rapid and broad-spectrum defense, adaptive immunity offers targeted and enduring protection, highlighting the dynamic and multifaceted nature of the immune response.

In the next section, I will focus on T and NK biology since they are the two main cell types that I have been studying during my project in cancer immunology.

1.3.2. T cell production and maturation

T cells, a type of white blood cell, play a central role in orchestrating immune responses against pathogens, cancer cells, and other harmful agents. T cell development begins in the bone marrow, where hematopoietic stem cells differentiate into immature T cells, known as thymocytes. These thymocytes migrate to the thymus, where they undergo a series of maturation stages under the influence of various cytokines and signaling molecules. Through positive and negative selection processes, immature T cells are educated to recognize and respond to foreign antigens while tolerating self-antigens. Early committed T cells, lacking expression of the T-cell receptor (TCR), CD4, and CD8, are termed double-negative (DN) thymocytes. DN thymocytes can be subdivided into four differentiation stages: DN1 (CD44+CD25-), DN2 (CD44+CD25+), DN3 (CD44-CD25+), and DN4 (CD44-CD25-). As cells progress from the DN2 to DN4 stages, they express the pre-TCR, composed of the non-rearranging pre-T α chain and a rearranged TCR β -chain. Successful pre-TCR expression leads to significant cell proliferation during the transition from DN4 to double positive (DP) thymocytes, replacing the pre-TCR α -chain with a newly rearranged TCR α -chain, resulting in a complete $\alpha\beta$ TCR. The $\alpha\beta$ -TCR+CD4+CD8+ (DP) thymocytes then interact with cortical epithelial cells expressing high densities of MHC class I and class II molecules associated with self-peptides. The fate of DP thymocytes depends on TCR-mediated signaling interactions with these self-peptide-MHC ligands. Insufficient signaling results in delayed apoptosis (death by neglect), while excessive signaling can lead to acute apoptosis (negative selection), commonly occurring in the medulla upon encountering strongly activating self-ligands on hematopoietic cells, particularly dendritic cells. An appropriate, intermediate level of TCR signaling initiates effective maturation (positive selection). Thymocytes expressing TCRs that bind self-peptide-MHC class I complexes become CD8+ T cells, while those binding self-peptide-MHC class II ligands become CD4+ T cells, preparing them for export from the medulla to peripheral

lymphoid sites. Thymocytes that successfully pass positive selection downregulate either CD4 or CD8 to become single-positive (SP) CD4⁺ or CD8⁺ T cells, respectively. Ultimately, mature T cells exit the thymus and circulate as naive T cells throughout the body, patrolling tissues and organs to mount immune responses when needed, thereby safeguarding the body against infections and diseases (Germain, 2002) (Figure 16).

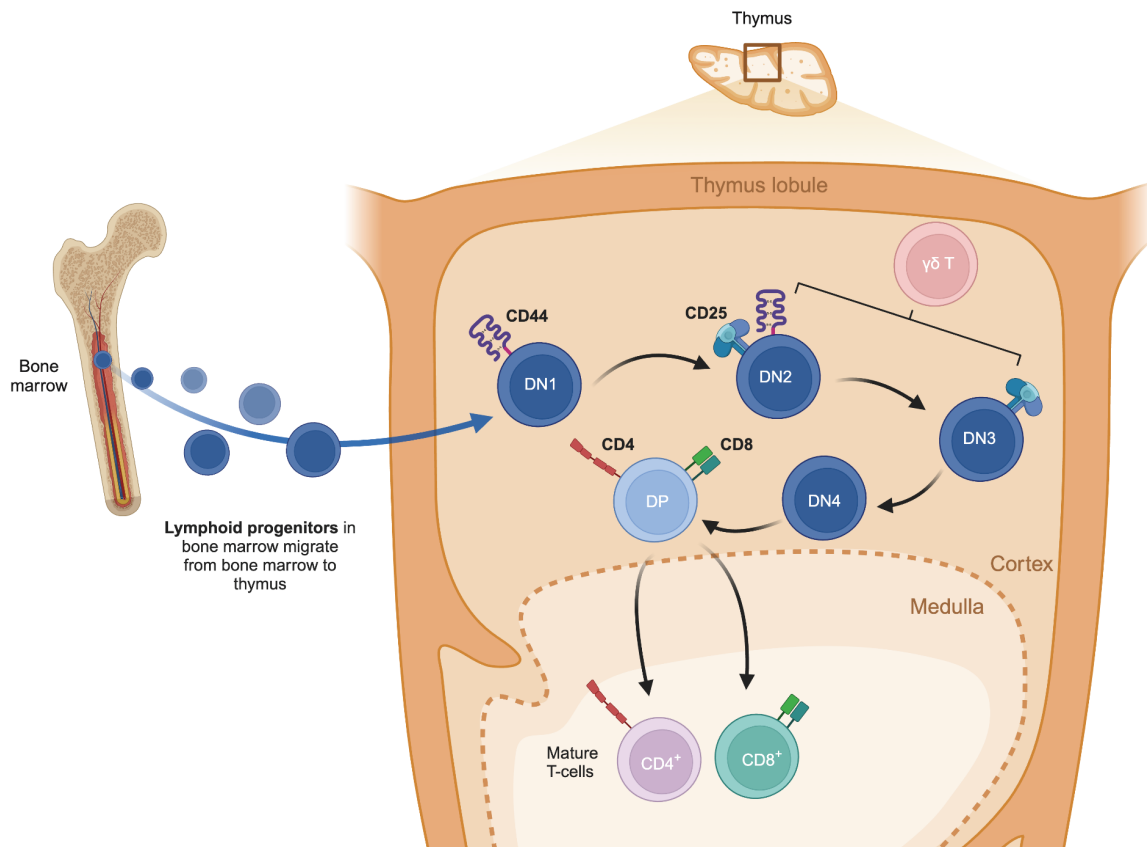


Figure 16: **T cell production.** Committed lymphoid progenitors originate in the bone marrow and migrate to the thymus, where they develop into early committed T cells known as DN thymocytes, which lack T-cell receptor (TCR), CD4, and CD8 expression. DN thymocytes progress through four stages: DN1 (CD44⁺CD25⁻), DN2 (CD44⁺CD25⁺), DN3 (CD44⁻CD25⁺), and DN4 (CD44⁻CD25⁻). During the transition from DN2 to DN4, they express the pre-TCR, composed of the pre-T α chain and a rearranged TCR β -chain. Successful pre-TCR expression leads to cell proliferation and transition to DP thymocytes, which express a complete $\alpha\beta$ TCR. After positive and negative selections, thymocytes that successfully pass positive selection reduce the expression of either CD4 or CD8 to become CD4⁺ or CD8⁺ T cells, respectively

1.3.3. T cell classification

T cells can be classified based on the presence of specific cell surface proteins and their functions within the immune system. The two main types of T cells are helper T cells (CD4+) and cytotoxic T cells (CD8+), distinguished by the presence of CD4 or CD8 proteins on their surfaces, respectively. Helper T cells are CD4 T cells, they play a crucial role in coordinating immune responses by secreting cytokines and activating other immune cells, such as B cells and macrophages, to eliminate pathogens. They are further subdivided into Th1, Th2, Th17, and regulatory T cells (Tregs), each with distinct functions in immunity regulation and response to different types of pathogens.

On the other hand, CD8 T cells cytotoxic T cells are responsible for directly killing infected or abnormal cells, such as virus-infected cells or cancer cells, through the release of cytotoxic molecules like perforin and granzyme. Additionally, memory T cells retain information about previously encountered pathogens, enabling a faster and more effective immune response upon re-exposure. Through their diverse functions, T cells play a pivotal role in adaptive immunity, orchestrating responses tailored to specific threats encountered by the body (Figure 17).

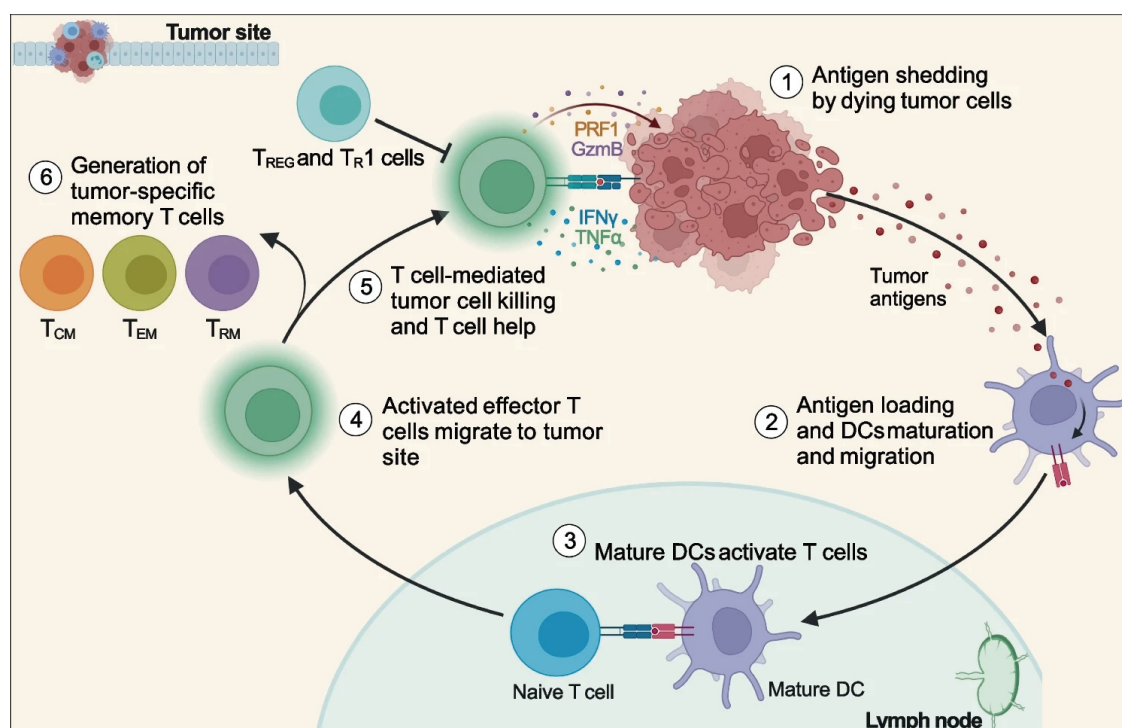


Figure 17 : **T cell differentiation.** The generation of tumor-specific effector and memory T cells begins when tumor antigens released by cancer cells are captured by antigen

presenting cells (APC) such as dendritic cells and presented to naive T cells in lymph nodes. Differentiated tumor-specific effector T cells then migrate to the tumor site to perform their effector functions. Effector CD8⁺ and CD4⁺ T cells exert anti-tumor activity by directly killing tumor cells and aiding other immune cells, while regulatory T (Treg) and type 1 regulatory T (TR1) cells suppress the immune response. Immune-mediated cancer cell death can lead to the release of additional tumor antigens, thereby sustaining anti-tumor immunity (Notarbartolo & Abrignani, 2022).

1.3.4. T cell activation and memory formation in cancer

After their education in the thymus, newly formed naive T cells circulate in the peripheral blood and lymphatic systems, guided by the expression of chemokine receptor type 7 (CCR7) and the lymph node-produced chemokines CCL19 and CCL21, as well as the sphingosine-1-phosphate (S1P) system.

T cells are activated by antigens, which are small pieces of protein derived from cancer cells. These antigens are presented to T cells by specialized cells called APCs, such as dendritic cells, macrophages, and B cells. The antigens are displayed on the surface of the APCs in conjunction with major histocompatibility complex (MHC) molecules.

The T cell receptor (TCR) on the surface of T cells recognizes the antigen-MHC complex on the surface of the APC. The TCR is primarily composed of two different protein chains: the alpha (α) chain and the beta (β) chain. These chains are produced through a process of gene rearrangement, which generates a vast diversity of TCRs, allowing the immune system to recognize a wide array of antigens. Moreover, the TCR $\alpha\beta$ heterodimer associates with the CD3 complex, which consists of several subunits: CD3 γ , CD3 δ , CD3 ϵ , and CD3 ζ . This recognition process is highly specific, with each T cell having a unique TCR that can recognize a specific antigen-MHC complex.

CD8 T cells recognize antigens presented with MHC class I while CD4 T cells recognize antigens presented with MHC class II molecules. In addition to TCR binding, naive T cell activation requires co-stimulatory signals provided by molecules. Co-stimulation enhances T cell activation in the presence of an infection or other threat, preventing inappropriate activation. Upon recognition of the antigen-MHC complex and co-stimulatory signals, T cells undergo signal transduction, which involves a series of intracellular signaling events that ultimately lead to the activation of the T cell (Figure 18).

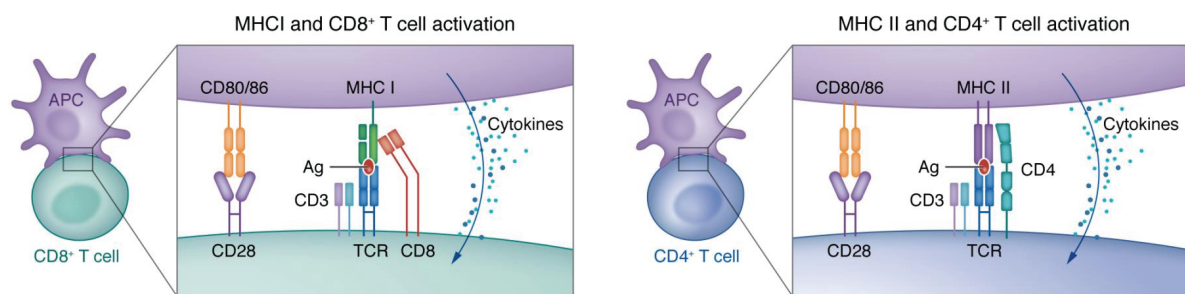


Figure 18 : **CD8 and CD4 T cell activation.** CD8+ (left) and CD4+ (right) T cell receptors are activated by antigens presented by MHC I and MHC II, respectively (first signal). Along with the co-stimulatory signal through CD28 engagement (second signal) and cytokines (third signal), this activation machinery enables different T cells to differentiate into various functional subsets (Lee-Chang & Lesniak, 2023)

T cell co-stimulatory receptors are critical components of the immune system that enhance the activation and function of T cells beyond the primary signal delivered by the TCR. These receptors provide essential secondary signals that ensure T cells respond appropriately to antigens. The most well-known co-stimulatory receptor is CD28, which binds to its ligands CD80 (B7-1) and CD86 (B7-2) on APCs, promoting T cell proliferation, survival, and cytokine production. Another important co-stimulatory receptor is ICOS (Inducible T-cell CO-Stimulator), which plays a key role in the development and function of follicular helper T cells and the production of antibodies. Additionally, NKG2D, 4-1BB (CD137) and OX40 (CD134) are co-stimulatory receptors that enhance T cell expansion, survival, and memory formation when engaged. These co-stimulatory pathways are crucial for a robust immune response, and their modulation is being explored in therapeutic strategies to enhance immunity against infections and cancer or to dampen it in autoimmune diseases (Chen & Flies, 2013) (Figure 19).

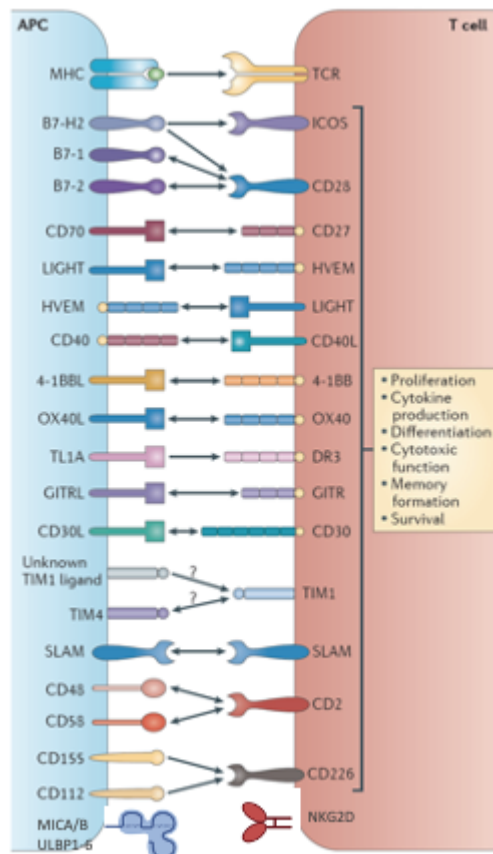


Figure 19 : **T cell co-stimulatory receptors.** Co-stimulatory molecules providing positive signals to T cells when they interact with ligands and counter-receptors on APCs (adapted from (Chen & Flies, 2013))

Upon activation by antigen presenting cells, T cells differentiate into effector cells and various types of memory cells. During this priming event, T cells lose CCR7 expression and gain other chemokine receptors, such as CXCR3, enabling them to follow chemokine gradients like CXCL9 and CXCL10 towards inflamed tissues. They enter these tissues via selectin/integrin-mediated intravasation. T cells are retained in tissues to clear pathogens and tumors through the expression of retention integrins like CD103. Central memory T cells regain CCR7 expression and recirculate in the blood and lymph nodes, whereas effector memory T cells and tissue-resident memory T cells can still enter and reside in tissues providing long-term immunity against the cancer, enabling a more rapid and effective response upon subsequent exposure to the same antigen.

Overall, activation of T cells during cancer involves a highly coordinated series of events that lead to the recognition and destruction of cancer cells. Understanding the molecular mechanisms underlying T cell activation is critical for developing effective cancer immunotherapies.

1.3.5. NK cell production and maturation

Experiments aimed at characterizing T cell-mediated cytotoxicity unexpectedly revealed the presence of a naturally occurring cytotoxic lymphocyte with inherent and innate anti-tumor properties. These initial discoveries were made in the 1960s, and within a decade, researchers began to investigate a previously uncharacterized population of innate lymphocytes, now known as NK cell. As their name implies, NK cells are "naturally" cytotoxic and, unlike cytotoxic T cells, do not require prior antigen exposure to exert their anti-tumor effects.

NK cell production is a complex process integral to the innate immune response, playing a crucial role in the body's defense against tumors and viral infections. NK cells originate from hematopoietic stem cells in the bone marrow, undergoing several differentiation stages. Initially, these stem cells differentiate into common lymphoid progenitors (CLPs). Their development is supported by the cytokine IL-15, which binds to the IL-15 receptor subunit alpha, CD122 (IL-2/IL-15 receptor subunit beta). Then they further differentiate into NK cell precursors (NKP). The maturation of NK cells involves a sequence of developmental stages characterized by distinct surface markers and functional capabilities. Immature NK cells express CD122 and natural cytotoxicity receptors (NCRs) such as NKp46, NKp30, and NKp44. Chemokine receptors like CXCR3, CX3CR1, and S1P5R play a role in the exit of NK cells. In humans, CD56bright NK cells are prevalent in secondary lymphoid tissues and mature into CD56dim NK cells in peripheral blood. Typically, CD56dim NK cells are more cytotoxic and express the CD16 (Fc gamma RIIIA) receptor, while CD56bright NK cells produce more cytokines and have lower levels of CD16 expression. CD56dim NK cells are generally considered a more mature form of NK cells. NK cells can be classified as group 1 innate lymphoid cells (ILCs) because they produce type 1 cytokines, such as interferon gamma (IFN- γ) and tumor necrosis factor (TNF). Long-lived NK cells are identified by their increased expression of CD57; moreover, tissue-resident NK cells express markers such as CD49a, CD103, CD69, and CD56 (Shin & Rothenberg, 2023) (Figure 20).

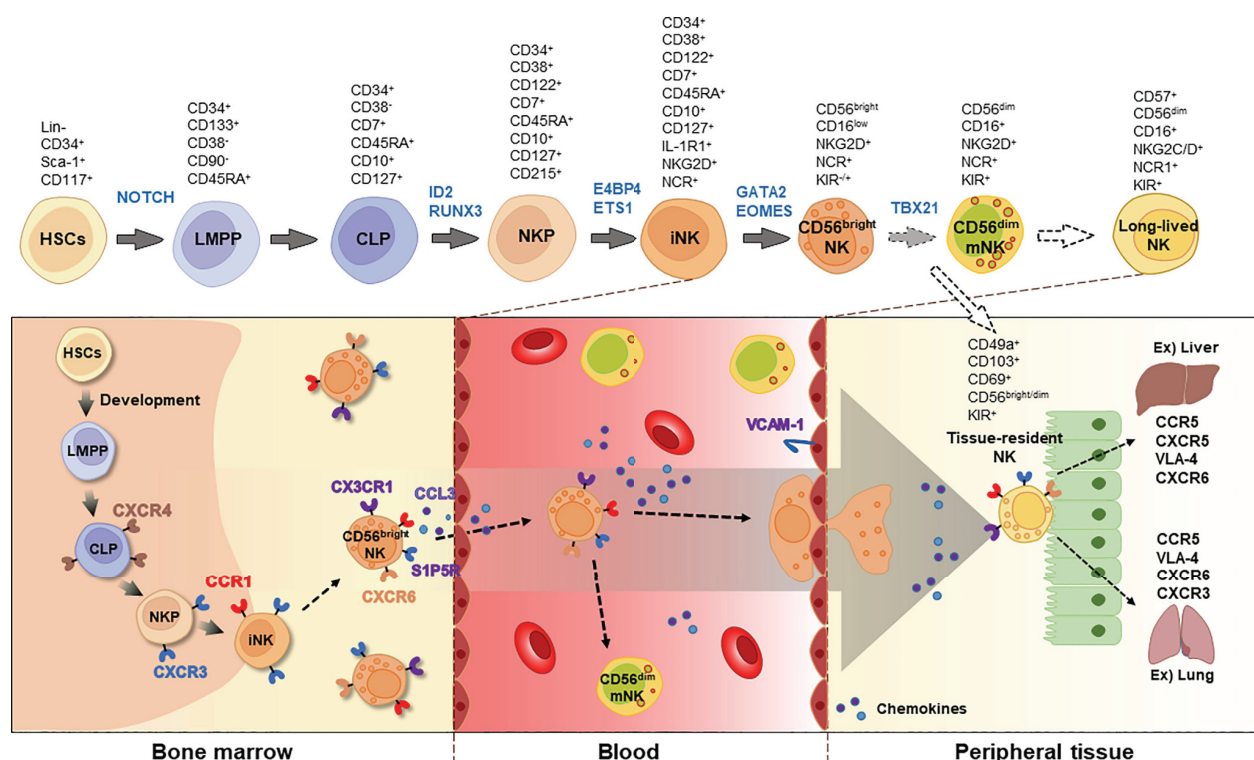


Figure 20: NK cell differentiation. Developmental process of NK cells. NK cells originate from HSCs and CLPs in the bone marrow. Immature NK cells express CD122 and natural cytotoxicity receptors like NKp46, NKp30, and NKp44. During maturation, NK cells acquire chemokine receptors such as CXCR3, CX3CR1, and S1P5R to enable their exit from the BM. In the blood, the main types of NK cells are CD56^{bright} and CD56^{dim} and long-lived NK cells show increased CD57 expression. Tissue-resident NK cells express CD49a, CD103, CD69, and CD56 in diverse tissues. The blocked arrows with dotted lines suggest that further research is required to fully understand these processes. HSC, hematopoietic stem cell; LMPP, lympho-myeloid primed progenitor; CLP, common lymphoid progenitor; NKP, NK progenitor; iNK, immature NK; mNK, mature NK; NCR, NK cell receptor; KIR, killer cell immunoglobulin-like receptor; VLA-4, very late antigen-4 (Shin & Rothenberg, 2023)

During this process of proliferation and differentiation, NK cells also undergo a fine-tuning phase where they develop their unique repertoire of activating and inhibitory receptors, allowing them to discern between healthy cells and abnormal cells effectively. The production and function of NK cells are tightly regulated by various transcription factors, including NK cell development is regulated by several transcription factors including E4BP4, TBX21, EOMES, GATA3, and ID2, which orchestrate the expression of genes necessary for NK cell maturation and effector functions. Moreover, the microenvironment within the bone

marrow and secondary lymphoid tissues provides crucial signals that influence NK cell development.

1.3.6. NK cell activation

The primary mechanism regulating NK cell contact-dependent functions, such as cytotoxicity and target recognition, is the balance between inhibitory and activating receptors binding to their specific ligands.

Under normal physiological conditions, NK cell activity is inhibited through the interaction of their inhibitory receptors with MHC class I.

However, NK cells become activated and display effector functions when cells lack self-markers or are under stress, such as those infected by viruses, cancerous cells, or cells undergoing senescence. In these cases, target cells often upregulate ligands for activating receptors, and MHC class I expression may be downregulated. NK cell activation happens through activation of receptors such as NKG2D and natural cytotoxic receptors (NCRs) NKp30, NKp44, and NKp46 when they bind to their ligands (Chan et al., 2014) (Figure 21). Activating receptors are able to provide NK cells with a strong stimulus in the absence of co-stimulation due to the presence of adaptor molecules such as DAP10, DAP12, FcγR, and CD3z that contain immunoreceptor tyrosine-based activating motifs (ITAMs) (Campbell et al., 2001; Gilfillan et al., 2002; Vivier et al., 2004).

However, inhibitory receptors on NK cells, such as the killer cell immunoglobulin-like receptor (KIR) family and the CD94/NKG2A heterodimer, recognize MHC class I molecules. Inhibitory receptors contain inhibitory motifs (ITIMs) within their cytoplasmic tails that can activate downstream targets such as SHP-1 and SHP-2 and directly antagonize those signaling pathways activated through ITAMs (Purdy & Campbell, 2009; Yusa et al., 2002).

NK cells also express co-receptors able to enhance NK cell activity such as DNAX accessory molecule 1 (DNAM1) and SLAM family receptors (2B4, SLAMF7, NKp80) enhance NK cell activity.

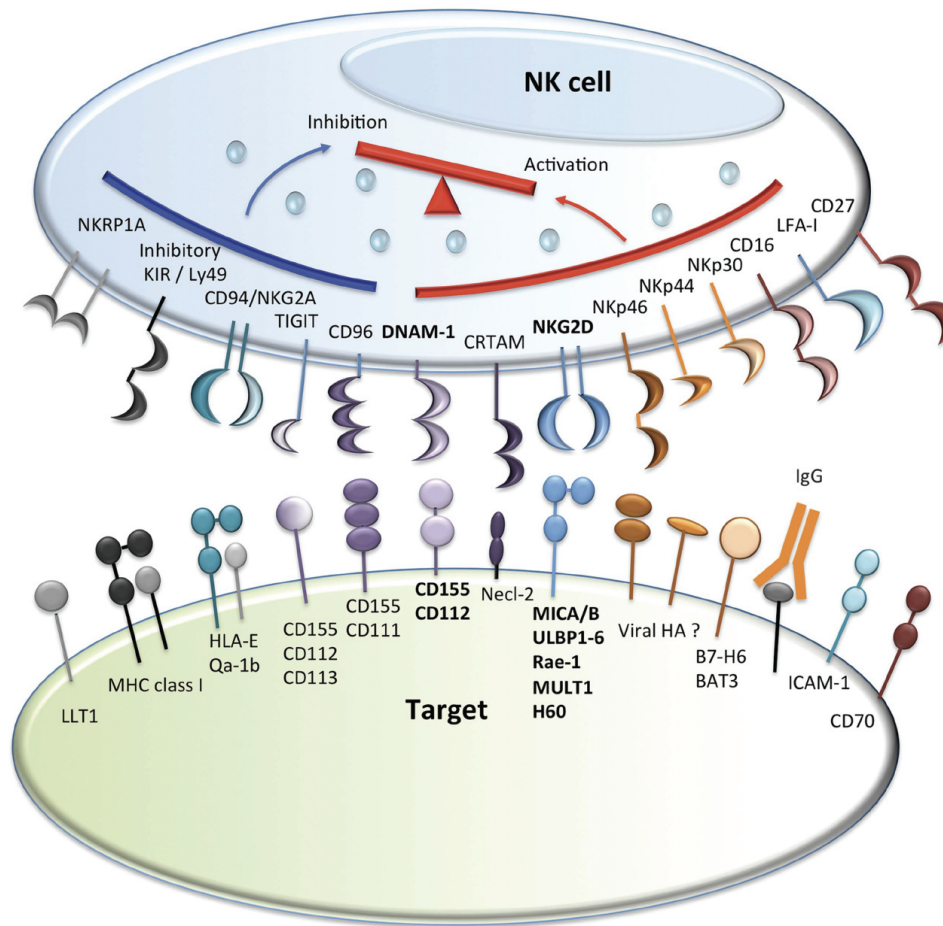


Figure 21: **NK cells activation and inhibitory receptors.** Major inhibitory and activating receptors on NK cells and their cognate ligands on target cells leading to the activation or inhibition of NK cell cytotoxicity

1.3.7. NKG2D

NKG2D is a lectin-like type 2 transmembrane receptor expressed as a homodimer in both mice and humans. As previously described above, It is implicated in both innate and adaptive immune responses. It is expressed on NK cells, invariant natural killer T cells, $\gamma\delta$ T cells and CD8+ T cells. It acts as an activation receptor on NK cells and a co-stimulatory receptor on CD8 T cell (Lanier, 2015). Its ligands are expressed when cells are under stress conditions during viral infection or transformation. Although NK cell activation is controlled by the relative balance of inhibitory and activating signals, ligation of the NKG2D receptor by any NKG2D ligand is sufficient to trigger lytic synapse formation and release cytolytic granules such as perforin and granzyme. Conversely, NKG2D alone cannot induce cytotoxic activity in

CD8 T cells; it can only enhance CD8 T cell activity upon T cell receptor stimulation on CD8 T when it binds to a tumor antigen presented via MHC-I (Figure 22).

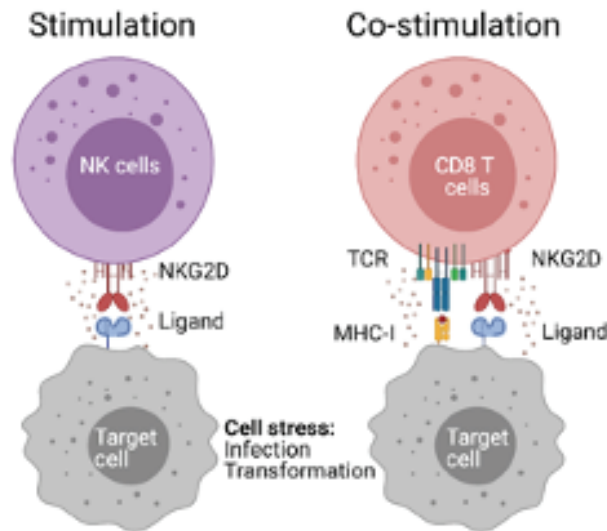


Figure 22 : **NKG2D mode of action on NK and T cells.** Cells under stress express NKG2D ligands, which bind to NKG2D, directly activating NK cells and prompting the release of cytotoxic granules that kill target cells. In contrast, in CD8 T cells, NKG2D functions as a co-stimulatory receptor only when the TCR is activated by binding to a tumor antigen presented by MHC-I.

NKG2D ligands include MHC class I chain-related polypeptides A (MICA) and B (MICB), a family of six UL16-binding proteins (ULBP1-6) in humans. The murine ligands are retinoic acid early transcript 1 (RAET1), histocompatibility H60 (H60), murine UL16-binding protein-like transcript 1 (MULT1), and pathogen-derived antigens (Tan et al., 2023) (Figure 23).

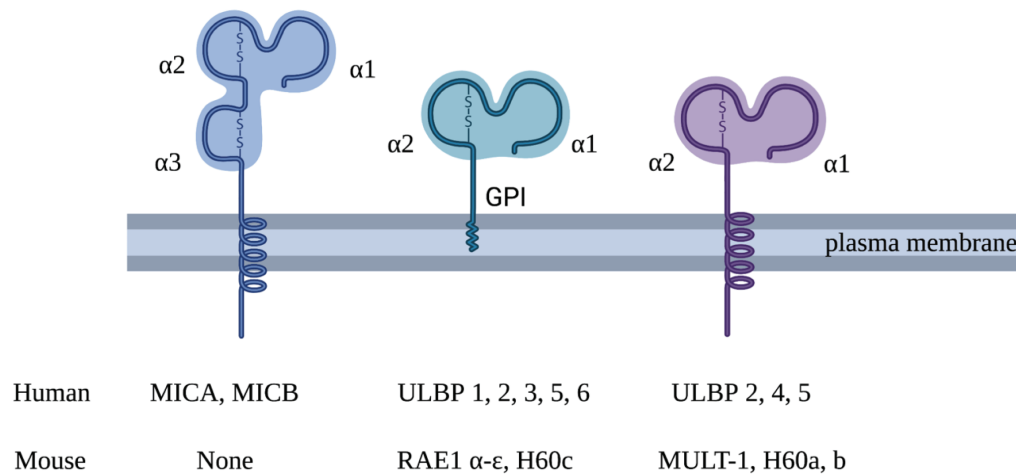


Figure 23 : **NKG2D ligands.** Human NKG2D ligands comprise MICA, MICB and ULBP1–6. MICA and MICB have three extracellular domains ($\alpha 1$, $\alpha 2$ and $\alpha 3$) and a transmembrane domain. Unlike the MIC family, ULBP family members lack an $\alpha 3$ domain. ULBP1, 2, 3 5 and 6 are anchored to the plasma membrane via a glycosylphosphatidylinositol (GPI) motif at the C-terminus. ULBP2, 4 and 5 possess a transmembrane. The equivalent ligands in mice are also represented (Tan et al., 2023)

NKG2D is expressed as a homodimer with short cytoplasmic domains that lack intrinsic signaling function. This dimer is incorporated into a hexameric transduction unit in combination with two signaling dimers of DNAX-activating protein (DAP) 10 stabilizing NKG2D at the cell surface. As a result, upon activation, ligation of NKG2D leads to the activation of phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K) and Grb2-Vav1 pathways downstream of DAP10 (Upshaw et al., 2006). In mice, but not in humans, the short isoform NKG2D splice variant can also pair with the DAP12 adaptor molecule, which contains an ITAM and thus can deliver an activating signal. The partnering of NKG2D with either DAP10 alone or both DAP10 and DAP12 is essential for cell surface expression and downstream signaling by the complex (Figure 24).

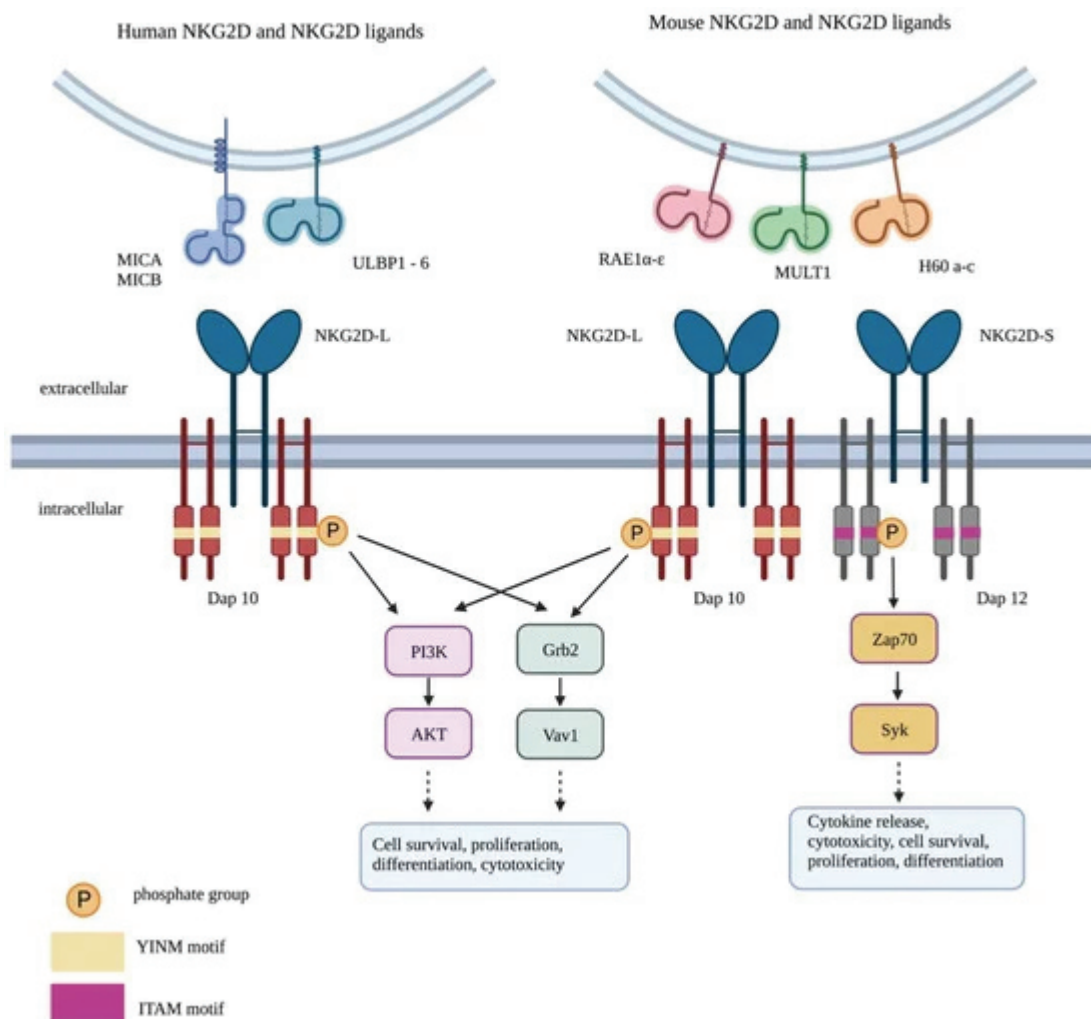


Figure 24 : **Structure of the NKG2D adaptor complex and downstream signaling pathways** (Tan et al., 2023)

NKG2D immunosurveillance escape in cancer involves various strategies employed by tumor cells to evade recognition and destruction by the immune system. One common mechanism is the downregulation or shedding of NKG2D ligands, such as MICA, MICB, and ULBPs, from the surface of cancer cells. This reduction in ligand expression prevents the effective activation of NK cells and CD8 T cells, diminishing their cytotoxic response. Tumor cells may also secrete soluble forms of these ligands, which bind to NKG2D receptors on immune cells, blocking their ability to recognize membrane-bound ligands on cancer cells.

NKG2D is an intriguing target in cancer treatment. By agonizing NKG2D we could boost the immune response by synergistically activating both the innate and adaptive immune systems while reducing resistance from NKG2DL shedding. Additionally, since it is not expressed on CD4 T cells, it could limit the immune suppressive effects associated with T Reg activation.

1.4. Cancer Immunology

Cancer immunology marks a revolutionary era in oncology, transforming our understanding and treatment of cancer. This field investigates the complex interactions between cancer cells and the immune system, uncovering how tumors evade immune detection and exploring ways to leverage the immune system to fight cancer. Immunotherapies, such as immune checkpoint inhibitors, adoptive T cell therapy, and cancer vaccines, have become pivotal in cancer treatment, providing durable responses and enhancing survival across various cancer types. Furthermore, the discovery of tumor-specific antigens and the advancement of personalized immunotherapies have bolstered hopes for precision medicine in cancer care. The promise of cancer immunology is immense, with ongoing research unveiling new immune-based therapies, combination strategies, and biomarkers for patient stratification, all set to redefine standard treatments and improve outcomes for cancer patients.

Solid tumors exhibit varying phenotypes of immune cell infiltration, which can influence the choice of immunotherapy. "Hot" tumors are highly inflamed, "excluded" tumors have immune cells at the periphery with minimal infiltration into the tumor, and "cold" tumors lack immune cell infiltration, making it challenging to use existing immune cells for treatment (Figure 25).

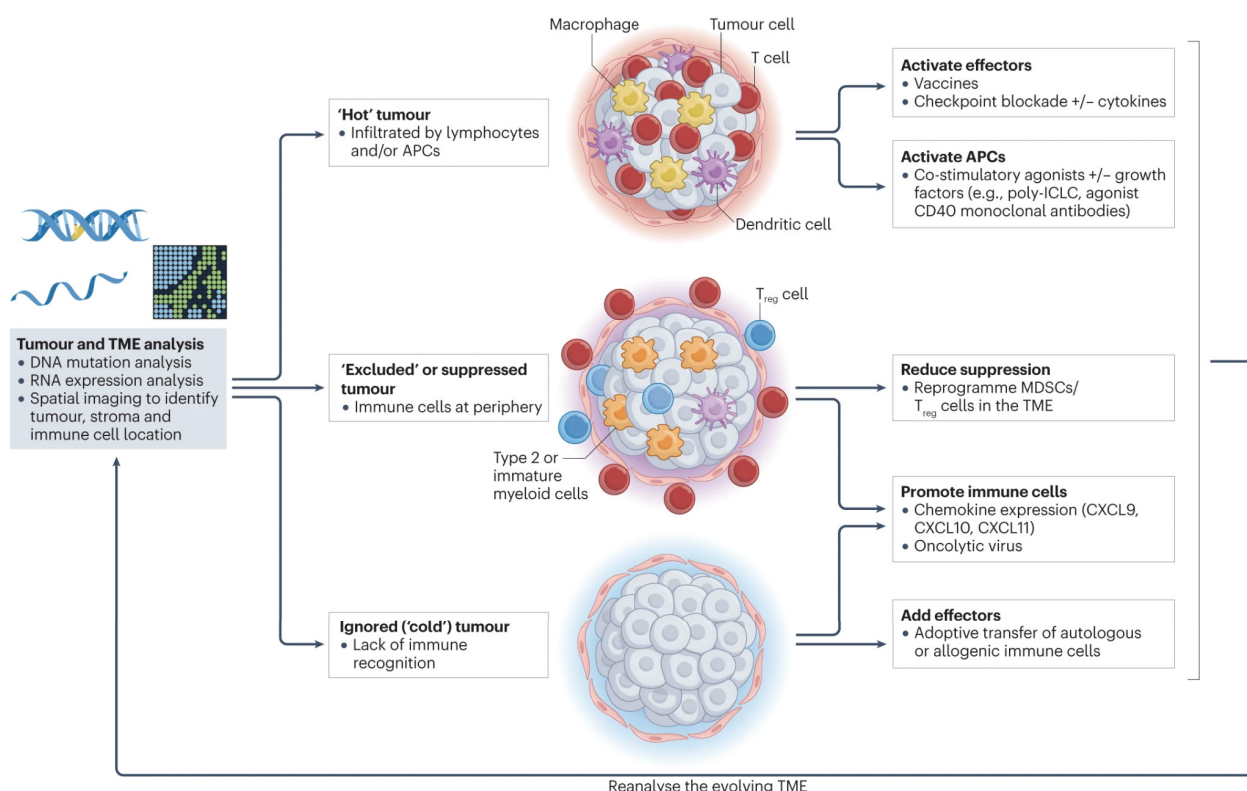


Figure 25 : **Solid tumors classification**. Solid tumors can be classified by their immune cell infiltration phenotypes: "hot" tumors exhibit immune cell infiltration, "excluded" tumors have immune cells only at the periphery, and "cold" tumors lack immune cells entirely. These phenotypes determine the most effective targeting approach for treatment (Butterfield & Najjar, 2024).

1.4.1. Immunosuppressive microenvironment

CD3+ T cell infiltration alone is a highly reliable marker for prognostic benefit in tumors. Follow-up studies have shown that high levels of CD3+ TILs are associated with improved overall survival in nearly all cancer types, including melanoma, breast, colorectal cancers (Fu et al., 2019; Mei et al., 2014; Rathore et al., 2013; Salgado et al., 2015).

However, the tumor microenvironment is composed of various cellular and molecular components that inhibit the immune system's ability to recognize and destroy cancer cells. Key elements include Tregs, which suppress immune responses by inhibiting effector T cells and producing immunosuppressive cytokines like IL-10 and TGF- β . Myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) inhibit T cell activation by secreting factors such as arginase, nitric oxide, and reactive oxygen species. Tumor-associated macrophages (TAMs), often in an M2 phenotype, promote tumor growth and suppress immune responses through the release of anti-inflammatory cytokines and growth factors, and by expressing immune checkpoint

molecules like PD-L1. Additionally, tumor cells and other cells in the microenvironment express high levels of immune checkpoint molecules such as PD-L1 and CTLA-4, which inhibit T cell activation and promote exhaustion. The environment is also rich in immunosuppressive cytokines and chemokines that attract regulatory cells and suppressive immune cells, hindering effective anti-tumor immune responses.

The first single-agent immunotherapies, using the CTLA4-targeting antibody ipilimumab and the PD1-targeting antibody nivolumab, were approved for the treatment of patients with metastatic melanoma in 2011 and 2014, respectively (Ribas & Wolchok, 2018). However, some patients do not respond to those treatments and other immune checkpoint inhibitors, such as CD161, TIM-3, and LAG-3, have been identified. Their ligands are expressed on tumor cells and often on tumor-associated macrophages (TAMs). When these inhibitors bind to their respective ligands, T cell activation and effector function are suppressed. Consequently, targeting these pathways for immune checkpoint inhibition has shown promising results in enhancing T cell functionality (Figure 26).

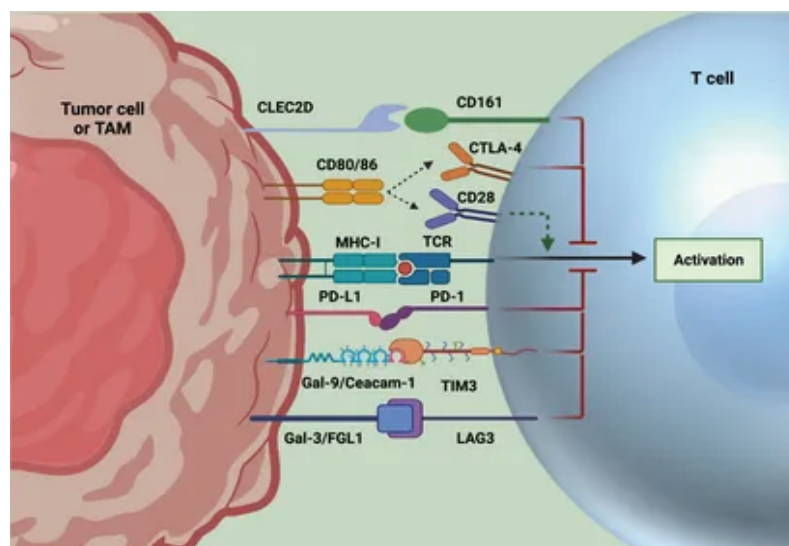


Figure 26: **T cell checkpoint inhibitors.** Checkpoints inhibitors expressed on T cells and their respective ligands expressed on tumor cells and TAMs have been identified. Their binding leads to the inhibition of T cell activation and constitute promising target for immunotherapies (Waibl Polania et al., 2021)

Immunotherapies have not been as extensively studied in HER2-positive breast tumors as they were described as "cold" tumors and were thought to not be immunogenic. However, recent evidence indicates that HER2-positive tumors are quite immunogenic and could benefit from immunotherapeutic treatments. Currently, various approaches are being developed,

including cancer vaccines, checkpoint inhibitors, T cell bispecific antibodies (TCBs), and adoptive cellular immunotherapies such as Chimeric Antigen Receptor (CAR) T cells (Figure 27).

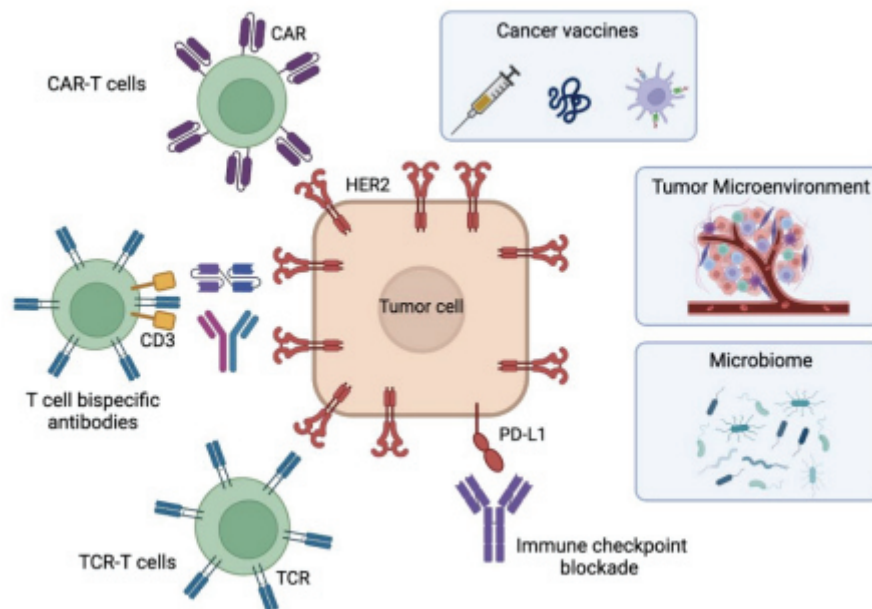


Figure 27 : **Immunotherapeutic approaches for HER2-positive breast cancer** . They have been developed to overcome resistance to current therapies. Different strategies are described such as polypeptide/protein-based or cell-based cancer vaccines, antibody-based immune checkpoint blockade, adoptive cell therapies using TCR-T cells, T-cell bispecific antibodies, and CAR-T cells. It also highlights factors that influence immunotherapeutic responses, including the tumor microenvironment and the microbiome (Duro-Sanchez et al., 2023)

I will focus in the next paragraphs on CAR-T cells and bispecific antibodies since my study focused on the use of bispecific antibodies and that CAR-T cells inspired the use of co-stimulation.

1.4.2. CAR T cells

CAR T cells are a revolutionary form of immunotherapy designed to enhance the body's ability to fight cancer. This therapy involves extracting a patient's T cells, a type of immune cell, and genetically modifying them to express CARs—receptors that are engineered to recognize specific proteins on the surface of cancer cells. Once these modified T cells are infused back into the patient, they can effectively identify and destroy cancer cells. The CARs typically combine an antigen-recognition domain from antibodies with T cell activating

domains, enabling a robust and targeted immune response. This approach has shown remarkable success, particularly in treating certain types of blood cancers like B-cell acute lymphoblastic leukemia and non-Hodgkin lymphoma. CAR T cell therapy represents a significant advancement in personalized medicine, offering hope for long-term remission in patients who have not responded to conventional treatments. Overtime, since the first CAR-T cells developed several generations have been developed with the addition of co-stimulatory receptors signaling domains in order to improve their T cell activity, proliferation and survival (Figure 28).

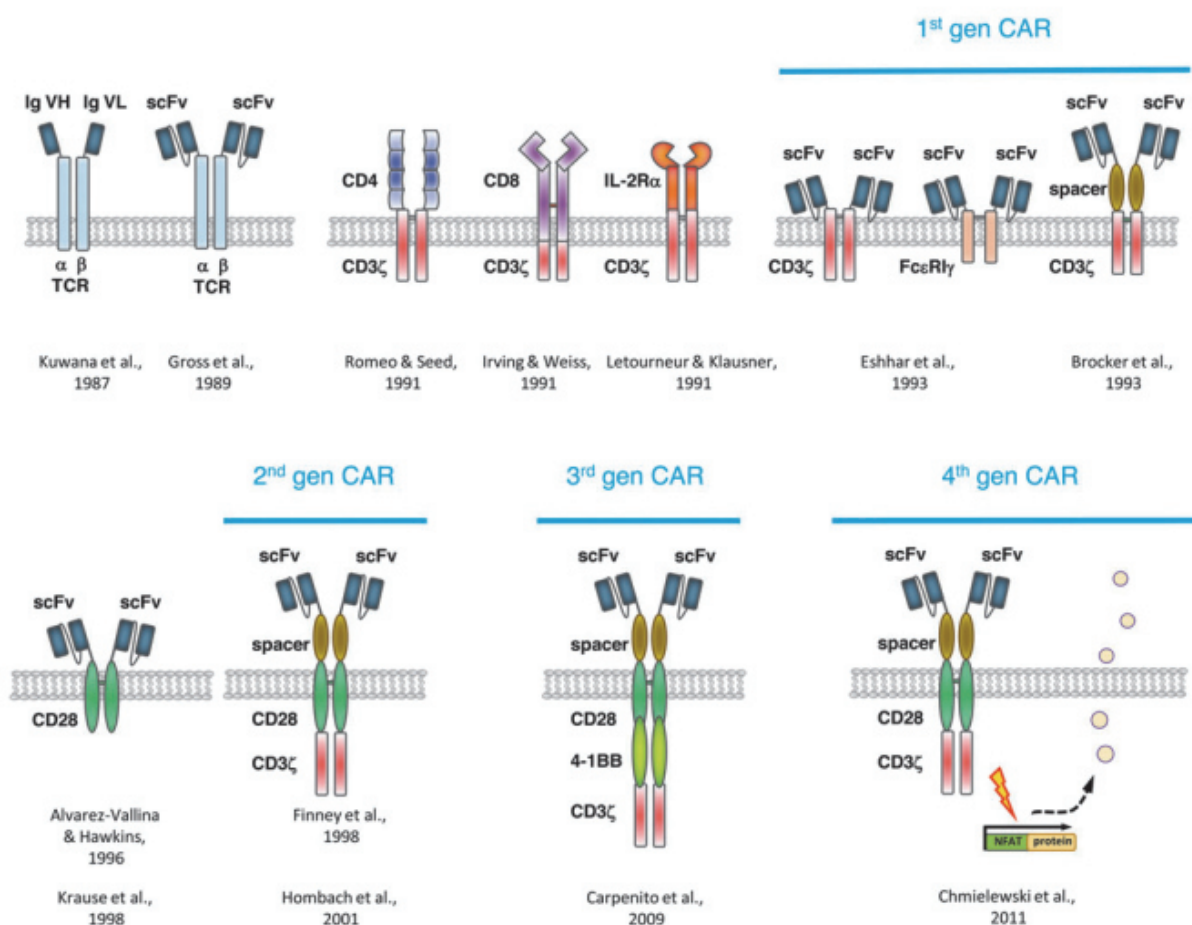


Figure 28 : **CAR T cells development.** Major steps in the development of CAR T cells with the addition of the signaling domain of multiple co-stimulatory receptors throughout the CAR T cells generations on order to improve T cell activity, proliferation and survival (Abken, 2021)

Among the CAR T cells currently in development, several are designed to target HER2, with some specifically aimed at treating breast cancer (Duro-Sanchez et al., 2023).

1.4.3. Immune cell engagers

TCBs are engineered to redirect T cells to target cancer cells by binding simultaneously to the TCR and a tumor antigen. This enables T cells to recognize and kill cancer cells in an MHC-independent manner. Similar approaches for engaging NK cells via CD16A are also in clinical development. TCBs and CAR-T cells have proven to be effective in hematological tumors, with blinatumomab targeting CD19, approved for B cell acute lymphoblastic leukemia, that was approved by the FDA in (Jen et al., 2019). This approach shows promise for treating relapsed HER2-positive breast cancer by using HER2 as the target antigen. T cells are preferred due to their high cytotoxic potential, though other immune cells can be targeted by altering the CD3 arm and can be used in different contexts (Figure 29).

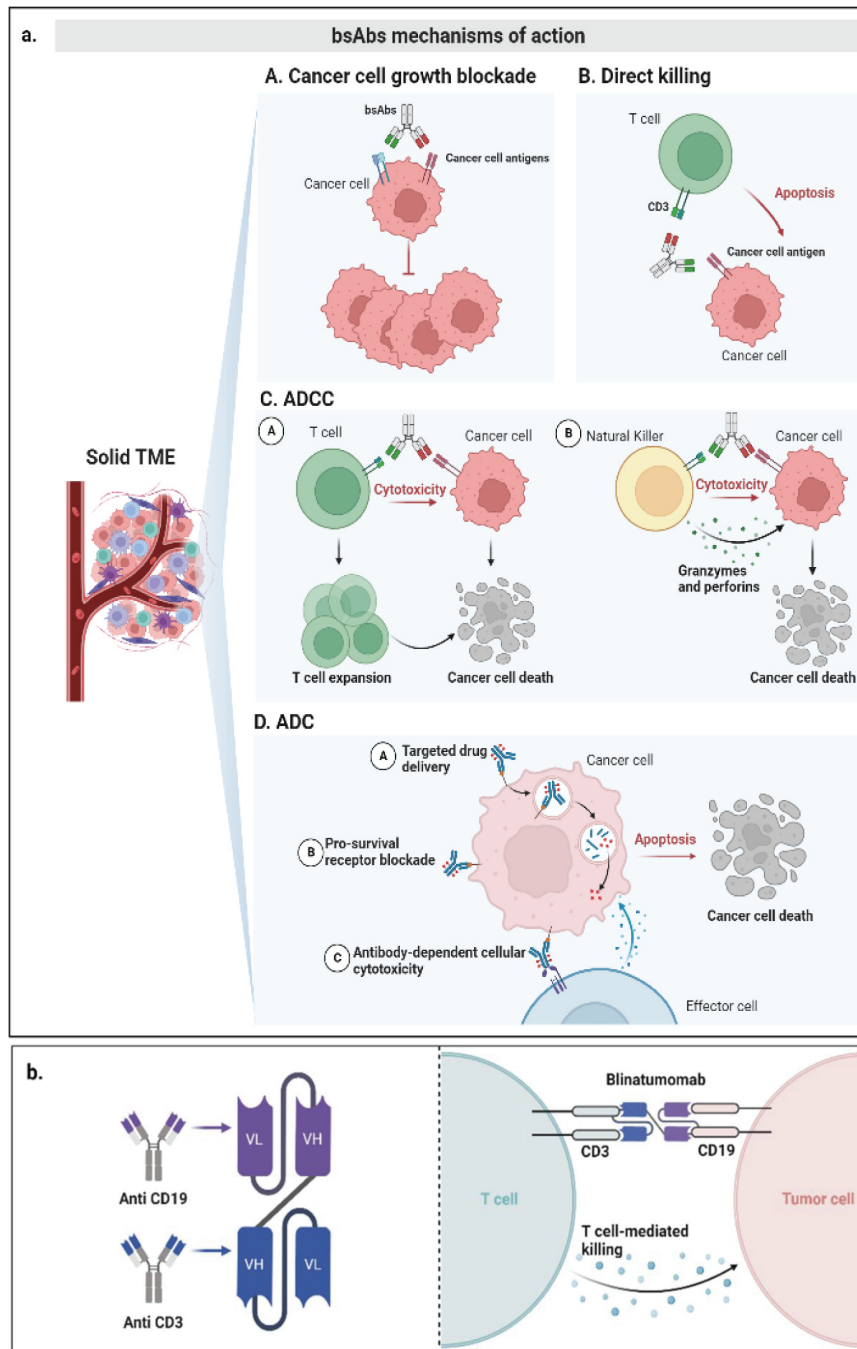


Figure 29 : **Bispecific antibody mode of action.** (a) Illustration of bispecific antibody (bsAb) mechanisms of action. When bsAb binds to its target and engage its signaling pathway, it can lead to (A) cancer cell growth blockade, (B) cancer cell apoptosis induction by cytotoxic T cells, (C) cancer cell apoptosis induction by ADCC (Antibody-Dependent Cell Cytotoxicity) followed by T-cell expansion (panel on the left) as well as by granzyme and perforin release from Natural Killer cells (panel on the right), (D) cancer cell apoptosis induction by ADC

(Antibody–Drug Conjugated) which mediates target drug delivery, pro-survival receptor blockade and ADCC (b) Structure and mechanism of action of Blinatumomab. TME: Tumor microenvironment

The first bispecific antibody targeting HER2 was reported in 2001 by Sen and colleagues, demonstrating that a HER2-specific TCB could generate cytotoxic T cells capable of killing chemotherapy-resistant tumor cells (Lum & Sen, 2001). Since then, numerous researchers have conducted preclinical studies on these agents, and several clinical trials are currently underway (Figure 30).

To enhance T cell function in order to counteract the mechanisms of resistance in solid tumors, the addition of co-stimulation molecules to the bispecific antibodies has been lately investigated. Recently HER2 and 4-1BB have been combined and show an increase of T cell proliferation survival and activity (Hinner et al., 2019). A trispecific has also been developed recently with HER2 and CD28 and showed promising efficacy (Seung et al., 2022). However, despite the great efficacy, CD28 raises toxicity concerns as shown recently in clinical trials by Regeneron. Overall mitigating side effects such as cytokine release syndrome and efficacy are very difficult to balance. This is why we thought that NKG2D was a very good candidate. It is capable to enhance T cell activation but also NK activation, doubling efficacy by the innate and adaptive immunity, it is not expressed on TRegs and didn't show as much toxicity concerns.

NCT Number	Drug	Target Antigens	Status	Sponsor/Collaborators	Phases	Start
NCT02829372	GBR 1302	HER2 x CD3	Terminated	Ichnos Sciences SA Glenmark Pharmaceuticals S.A., La Chaux-de-Fonds, Switzerland	Phase 1	May 2016
NCT03983395	ISB 1302	HER2 x CD3	Terminated	Ichnos Sciences SA Glenmark Pharmaceuticals S.A., La Chaux-de-Fonds, Switzerland	Phase 1 Phase 2	Apr 2020
NCT05076591	IMM2902	HER2 x CD47	Recruiting	ImmuneOnco Biopharmaceuticals Inc., Shanghai, China	Phase 1	Jun 2022
NCT04162327	IBI315	HER2 x PD-1	Recruiting	Innovent Biologics Co., Ltd., Suzhou, China	Phase 1	Nov 2019
NCT03650348	PRS-343	HER2 x 41BB	Active, not recruiting	Pieris Pharmaceuticals, Inc., Boston, MA, USA	Phase 1	Aug 2018
NCT03330561	PRS-343	HER2 x 41BB	Completed	Pieris Pharmaceuticals, Inc., Boston, MA, USA	Phase 1	Sep 2017
NCT05523947	YH32367	HER2 x 41BB	Recruiting	Yuhan Corporation, Seoul, Korea	Phase 1 Phase 2	Aug 2022

Figure 30 : **Summary of the clinical trials using HER2 bispecific antibodies for the treatment of HER2-positive tumors, including breast tumors** (Duro-Sanchez et al., 2023)

When I joined Dr Kevin Walsh's lab at Genentech, we focused on agonizing co-stimulatory receptors with a bispecific antibody and paired it with an in-house developed HER2 TDB (Junttila et al., 2014).

In the results section, I will elaborate on the strategy and rationale for choosing NKG2D over other co-stimulatory receptors. Targeting NKG2D allowed us to leverage both the innate and adaptive immune systems, as it is expressed on CD8 T cells and NK cells (Figure 31). Known to enhance survival, NKG2D could potentially reduce T cell exhaustion. It is not expressed on CD4 T cells, thus avoiding activation of T Regs. Additionally, targeting NKG2D could directly compete with NKG2D ligands shed by tumor cells for immune escape, thereby reinforcing the activation of NK and CD8 T cells.

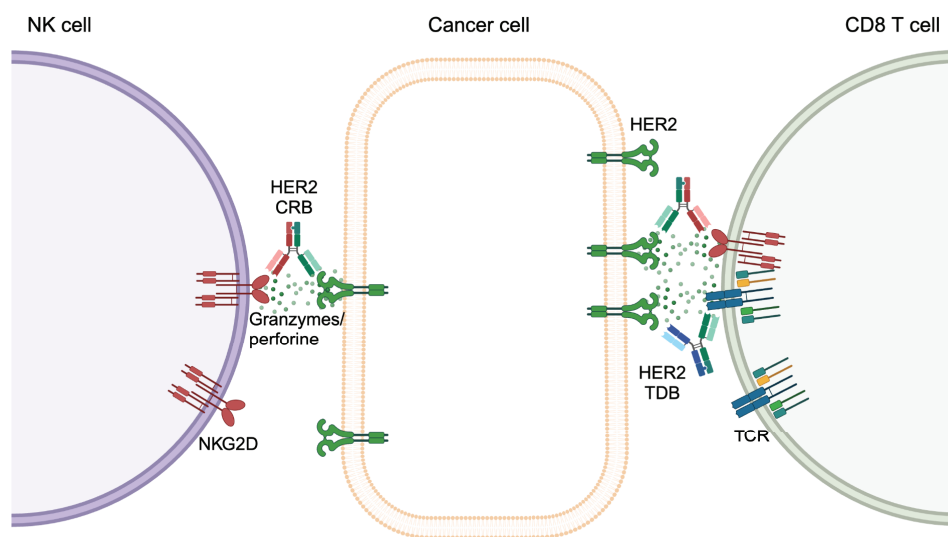


Figure 31 : **The targeting strategy using HER2 CRB.** It involves using HER2 TCB and HER2 CRB to activate NK and CD8 T cells simultaneously. HER2 TCB binds to HER2 on cancer cells and the TCR on CD8 T cells, resulting in T cell activation and the release of cytotoxic granules such as granzymes and perforin. HER2 CRB binds to HER2 and NKG2D on NK cells, leading to their direct activation, and also enhances the activation of CD8 T cells, leading to the lysis of cancer cells

A summary of scientific publications showing NKG2D or its ligands targeted with bispecific antibodies is presented in Figure 32 in comparison with our study showing the extensive research we have done with the HER2 CRB in combination or not with HER2 TDB

making it novel compared to the other studies ((Germain et al., 2008), (Chan et al., 2018), (von Strandmann et al., 2006), (Stamova et al., 2011), (Rothe et al., 2014), (Wang et al., 2018), (Vyas et al., 2016), (Han et al., 2019), (Chan et al., 2006), (Wang et al., 2020), (Zhao et al., 2021), (Flanagan et al., 2006), (Kellner et al., 2012), (Ravirala et al., 2021), (Raynaud et al., 2020), (Cho et al., 2010), (Kellner et al., 2022), (Zou et al., 2018), (Ding et al., 2021)).

Reference	Indication	NKG2D Arm	Target Arm	Mo. in vitro NK	Mo in vitro CD8	Hu. In vitro NK	Hu. In vitro CD8	Mo. in vivo NK	Mo in vivo CD8	Hu. In vivo NK	Hu. In vivo CD8
Germain C et al., 2008	Syngeneic	mH60	CEA, HER2	+ (LAK cells)	-	-	-	-	-	-	-
Chan JK et al 2006	Ovarian	Ab	CA125, HER2	-	-	+ (CIK cells)	+ (CIK cells)	-	-	+ (CIK cells)	+ (CIK cells)
Strandmann et al., 2006	MM	ULBP2	CD138	-	-	+	-	-	-	+? (PBLs)	+ (PBLs)
Stamova S et al., 2011	AML	ULBP2	CD33	-	-	+	+ (w/ CD33xCD3)	-	-	-	-
Rothe A et al., 2013	CRC	ULBP2	CEA	+	-	+	-	+? (↑ CD45, IHC)	+? (↑ CD45, IHC)	-	-
Wang T et al., 2018	CRC	MICA	CD24	-	-	+	+? (PBMCs)	+ (Nude mice)	-	-	-
Vyas M et al., 2016	CLL, MLL	ULBP2	CD33, CD19	-	-	+	-	-	-	+? (PBMCs)	+ (PBMCs)
Han Y et al., 2019	HCC	MICA	CD24	-	-	+ (NK92)	-	+ (Nude mice)	-	-	-
Chan WK et al., 2018	MM	Ab	CS1	-	-	+ (CIK cells)	+ (CIK cells)	-	-	+ (CIK cells)	+ (CIK cells)
Wang Y et al., 2020	MM	MICA	BCMA	-	-	+	-	-	-	+ (PBMCs, ↑ IHC)	+ (PBMCs, ↑ IHC)
Zhao Q et al. 2021	Lymphoma	ULBP1	CD19	-	-	+ (NK92)	-	-	-	-	-
Flanagan ML et al., 2006	Syngeneic	H60	DNA (necrotic)	+ (LAK cells)	-	-	-	+? (no PD)	+? (no PD)	-	-
Kellner C et al., 2021	BrCa	ULBP2	HER2	-	-	+	-	-	-	-	-
Ravirala D et al., 2021		OMCP	EGF	-	-	+ (TALL-104)	-	+ (IL2 NR)	+ (IL2 NR)	-	-
Raynaud A et al., 2020	BrCa	Ab	HER2	-	-	+	-	-	-	-	-
Cho G et al., 2010	BrCa	Rae (Fc WT)	HER2	+ (KY2 cells)	+? (spleen)	-	-	+ (depletion)	+ (depletion)	-	-
Kellner C et al., 2011	Lymphoma	ULBP2, MICA	CD20	-	-	+	-	-	-	-	-
Zou Y et al., 2018	Lymphoma	MICA	CD20	-	-	+	-	-	-	-	-
Ding H et al., 2021	Breast	MICA	PRLR	-	-	+ (NK92)	-	-	-	-	-
Herault A, et al, 2024	Breast	Ab	HER2	-	+	+	+	+	+	-	+ (PBMCs)

Figure 32 : **Summary of the scientific publications targeting NKG2D or its ligands.** It represents the targeting arms used and the cells studied and the technical approaches used in the studies

RESULTATS

Dans la première étude (Herault et al., 2024) que je vais aborder, NKG2D constitue un élément clé d'un projet portefeuille en immunologie du cancer auquel j'ai participé lors de mon travail chez Genentech. Il est important de souligner que cette étude a été précédée d'un travail considérable en amont que je décrirai brièvement. Pour ce projet, nous étions une équipe composée de 10 à 20 personnes, chacune apportant des expertises très différentes. En collaboration avec mon superviseur, Kevin Walsh, nous étions responsables des aspects biologiques du versant recherche de ce programme. Ces interactions avec des professionnels de divers horizons mais partageant tous le même objectif a été une expérience extrêmement enrichissante, et c'est l'une des raisons pour lesquelles j'ai souhaité réintégrer ce type d'institution.

Ces années passées sur ce projet ont commencé par le développement des outils et des assays afin de pouvoir identifier le meilleur anticorps candidat, un objectif qui n'aurait pas pu aboutir sans une vraie collaboration inter-département. Tout a commencé par la production des protéines NKG2D de souris et humaines afin d'immuniser des lapins et des rats pour en extraire et purifier les anticorps produits. Il a également fallu déterminer la pertinence du ciblage de NKG2D, en analysant son expression dans les tissus sains humain.

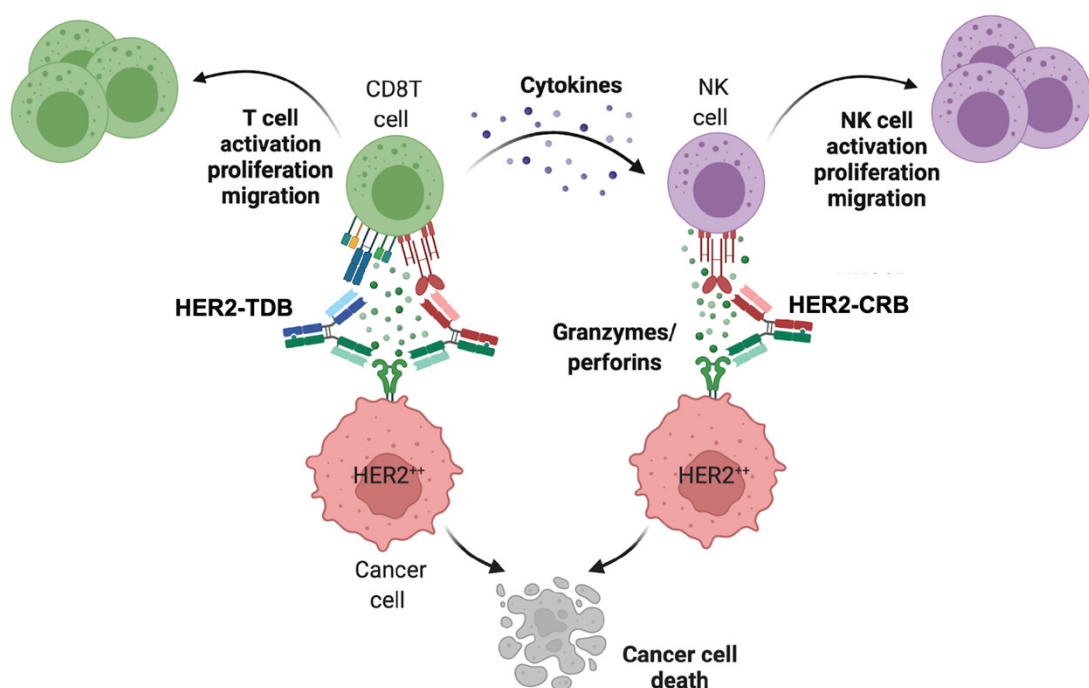
J'ai développé les outils qui ont permis de valider ces anticorps, notamment en sur-exprimant les protéines NKG2D dans des lignées cellulaires telles que les CHO (Chinese Hamster Ovary cells) et Jurkat NFAT luciférase. Les cellules CHO permettaient de valider la spécificité des anticorps en analysant leur bonne liaison aux protéines de surface cellulaire. La lignée Jurkat rapporteur de luciférase NFAT a été établie à partir de cellules T CD4, elle exprime la luciférase de luciole sous contrôle des éléments de réponse NFAT intégrés de manière stable dans le génome de ces cellules. NFAT fait partie de la voie de signalisation du TCR et de NKG2D donc lorsque les cellules sont activées dû à l'activation du TCR et co-stimulées dû à l'activation de NKG2D, nous pouvions monitorer l'augmentation de luminescence générée par la luciférase corrélant l'augmentation de l'activité des cellules Jurkat. J'ai testé et validé ces lignées cellulaires pour être certaine de leur bon fonctionnement, puis je les ai transférées aux personnes du département BCP (Biochemical, Cellular and Pharmacology) en charge du criblage des anticorps. J'ai aussi développé la méthode d'imagerie pour pouvoir quantifier le pourcentage de cellules tumorales tuées qu'ils ont par la suite adapté pour le criblage à haut-débit. En parallèle de ce criblage d'anticorps, j'ai étudié la biologie de NKG2D et les conséquences de son activation à la surface des cellules NK et des cellules T. La majorité des données présentées sont des données que j'ai moi-même générées, sauf les études de synapses immunologiques qui ont été effectuées par EVOTEC. Kevin Walsh, Judy Mak et moi-

même avons contribué de manière équivalente à l'ensemble des études *in vivo*. Enfin, des bioinformaticiens ont analysé les résultats de RNA-Seq.

1. Etude de l'efficacité de l'activité de NKG2D dans le cancer du sein

Résumé

Dans cette étude nous avons identifié NKG2D comme une cible thérapeutique prometteuse, en raison de son expression élevée sur une grande proportion de lymphocytes CD8+ infiltrant les tumeurs dans le cancer du sein. Cette expression est associée à une meilleure survie des patientes atteintes de cancer du sein triple négatif traitées par atezolizumab. Par conséquent, nous avons développé des anticorps bispécifiques humains et murins appelés HER2-CRB, avec un bras ciblant HER2 et un autre bras agoniste de NKG2D. Nous avons observé que HER2-CRB pouvait former des synapses immunologiques, induire la production de cytokines, et augmenter la cytotoxicité des cellules NK et des lymphocytes T CD8+ stimulés par les HER2-TDB. Les HER2-CRB se sont montrés efficaces dans des modèles de souris humanisées et immunocompétentes, en combinaison avec des TDB, améliorant la fonction effectrice des cellules NK et des lymphocytes T CD8+. Les HER2-CRB sont capable d'activer les cellules NK et les lymphocytes T CD8+, augmentant ainsi l'activité antitumorale et offrant un potentiel de combinaison étendu avec les immunothérapies.



Résumé graphique : Effet cytotoxique complémentaire de HER2-CRB sur les cellules T CD8 et les cellules NK

Comme mentionné dans l'introduction, malgré les avancées significatives dans le traitement du cancer du sein grâce à des anticorps ciblant HER2 tels que le trastuzumab, le pertuzumab et le margetuximab, de nombreux patients connaissent encore des rechutes et une progression de la maladie. Par conséquent, il reste un besoin thérapeutique important dans cette indication.

L'immunothérapie est devenue une stratégie prometteuse pour le traitement de divers cancers au cours de la dernière décennie. Les anticorps bispécifiques, activant artificiellement une réponse immunitaire contre les cellules tumorales, font partie de ces approches innovantes. L'équipe du docteur Teemu Junttila à Genentech a développé un anticorps bispécifique ciblant à la fois CD3 du TCR des cellules T et HER2 afin d'activer les cellules T CD8+ entraînant la mort des cellules tumorales de sein (Junttila et al., 2014). En collaboration avec son équipe, nous avons aussi pu démontrer que HER2 TDB (T cell Dependant Bispecific) entraînait une infiltration des lymphocytes T dépendant des chemokines CXCL9 et CXCL10 (Li et al., 2018). Cependant, dans le contexte des tumeurs solides, des défis subsistent, notamment le manque d'infiltration tumorale des cellules T, l'hostilité de l'environnement tumoral qui réduit l'efficacité des cellules T et l'expression variable de l'antigène tumoral (Middelburg et al., 2021). Ainsi, l'identification de stratégies visant à renforcer l'activité des cellules immunitaires est une priorité pour ces thérapies.

Dans cette optique, nous avons développé des récepteurs co-stimulateurs bispécifiques (CRB) humains et murins ciblant NKG2D (KLRK1), qui se lie à la fois aux cellules immunitaires et aux cellules cancéreuses du sein exprimant HER2. Nous avons évalué la capacité de ces molécules à activer les cellules NK et CD8+ T, ainsi que leur efficacité antitumorale in vitro et in vivo. En utilisant un modèle murin de cancer du sein HER2+, nous avons caractérisé les effets de ces CRB sur les cellules NK et CD8+ T en combinaison avec des anticorps bispécifiques dépendants des cellules T.

1.1. NKG2D est un facteur pronostique dans le cancer du sein triple négatif et son expression est restreinte aux cellules CD8+ T

Pour identifier un récepteur co-stimulateur afin d'améliorer l'activité des cellules NK et cellules T CD8+ dans le cancer du sein, nous avons analysé l'expression des récepteurs co-stimulateurs 4-1BB, GITR, ICOS, NKG2D et OX40 sur les Lymphocytes infiltrant la tumeur (TILs) issus des cellules tumorales dissociées (DTC) de cancer du sein humain. Une plus grande proportion de cellules CD8+ exprimait NKG2D par rapport à 4-1BB, GITR, ICOS ou OX40 (Figure 33).

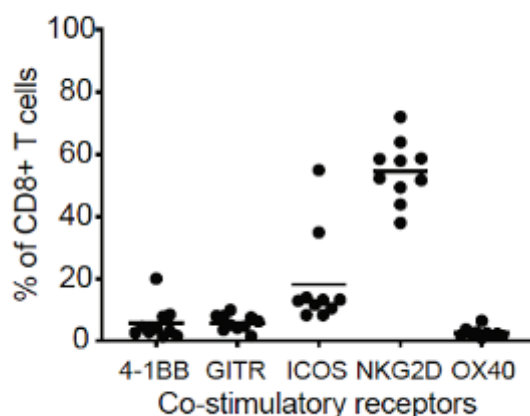


Figure 33: **Expression de récepteurs de costimulation à la surface des cellules T CD8 dans des tissus dissociés de cancer du sein par FACS**

Nous avons observé une expression de NKG2D principalement sur les cellules CD8+, tandis que les sous-populations de cellules CD4+ montrent des niveaux d'expression plus faibles (Figure 34). En revanche, les autres molécules de co-stimulation présentaient une expression sur les cellules T effectrices CD4+FoxP3- et les cellules T régulatrices CD4+FoxP3+. L'expression de 4-1BB, GITR, ICOS et OX40 sur les Tregs rendait ces cibles moins favorables car la signalisation à travers ces récepteurs peut diminuer les effets anti tumoraux (Toker & Ohashi, 2019). Les cellules NK étaient trop peu nombreuses dans les échantillons de DTC pour évaluer de manière précise l'expression des récepteurs co-stimulateurs.

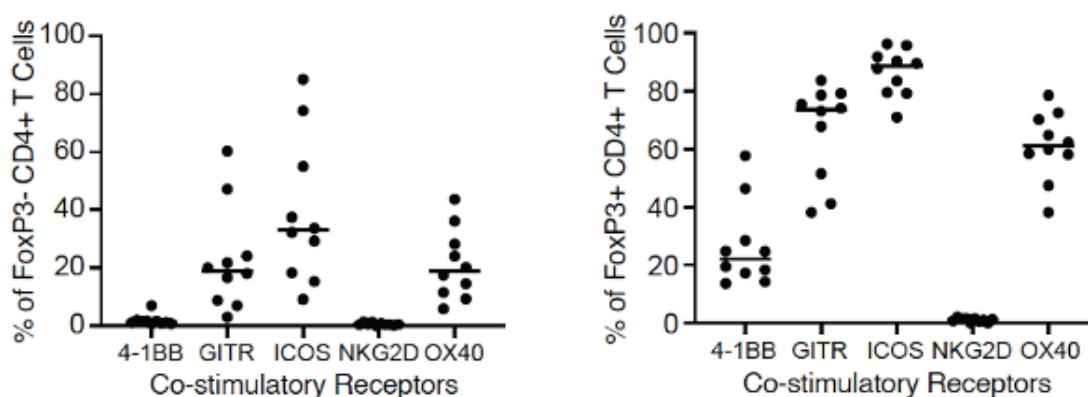


Figure 34: **Expression de récepteurs de costimulation des cellules T CD4 FOXP3 positive et négative dans des tissus dissociés de cancer du sein par FACS**

Nous avons ensuite utilisé les données des patients TNBC de l'essai IMPassion130 afin d'étudier l'effet de l'expression de NKG2D sur la survie de patients traités avec atezolizumab, un anticorps monoclonal qui se lie directement à PD-L1, en combinaison avec de la chimiothérapie.

Les patients ont été stratifiés en fonction du niveau d'expression (élevée/total) de KLRK1 (codant pour NKG2D) sans normalisation ou avec normalisation par rapport aux cellules NK et CD8+. Des signatures transcriptomiques ont permis de définir les types cellulaires des cellules NK et CD8+ afin de déterminer si l'expression de NKG2D dans les cellules NK ou CD8+ donnent un avantage lors des traitements et augmente la survie des patients.

Les patients traités par atezolizumab en combinaison avec nab-paclitaxel et caractérisés par une expression élevée de KLRK1 ont montré une amélioration significative du résultat pour les données non normalisées (Figure 35) et les données normalisées aux signatures des cellules NK (Figure 36) ou CD8+ T (Figure 37). De manière importante, l'expression de KLRK1 n'était pas pronostique dans la population traitée uniquement par chimiothérapie, indépendamment de la normalisation, démontrant une association entre l'expression de KLRK1 et le traitement par atezolizumab.

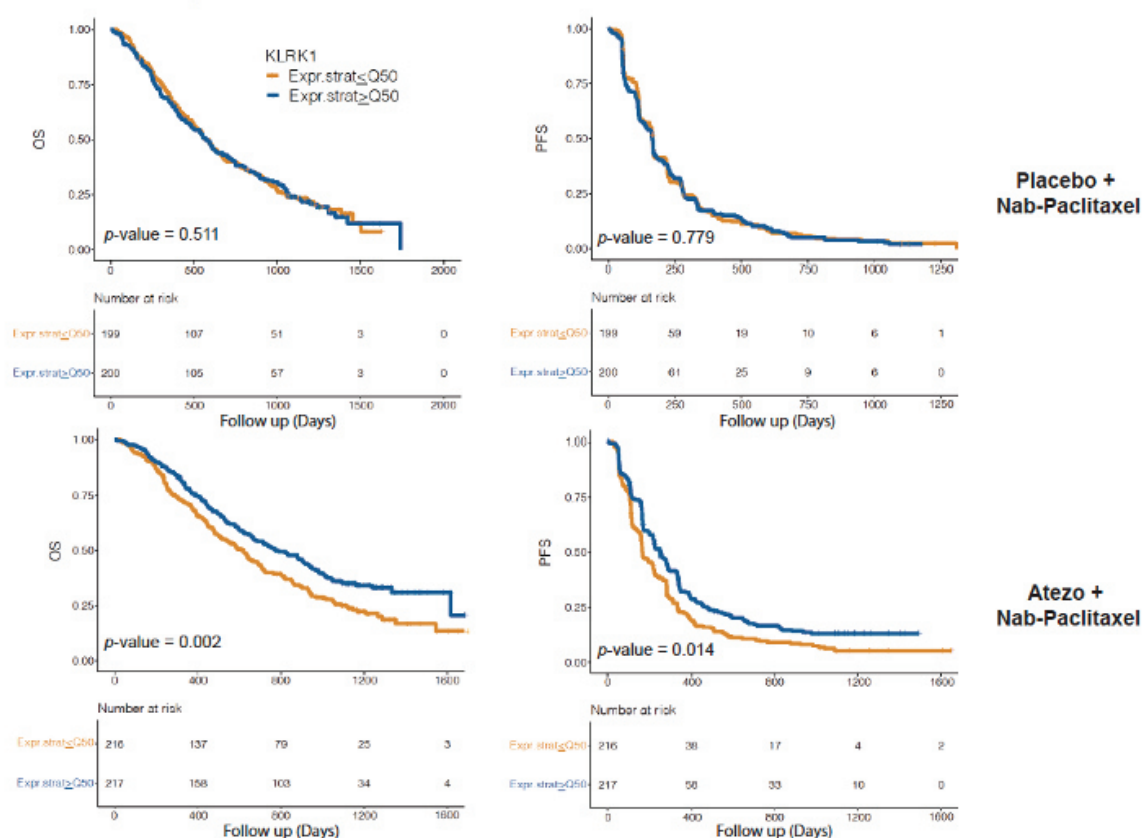


Figure 35: **Comparaison de survie des patients atteints de TNBC traités en fonction de l'expression de KLRK1, sans normalisation.** Analyse de Kaplan-Meier de la survie globale (OS, gauche) et de la survie sans progression (PFS, droite) chez les patients atteints de TNBC traités avec un placebo + paclitaxel lié à l'albumine sous forme de nanoparticules (Nab) (en haut) ou avec de l'atezolizumab + Nab-Paclitaxel (en bas), stratifiés par une expression élevée et faible de KLRK1 (NKG2D) non-normalisée à une signature des cellules CD8

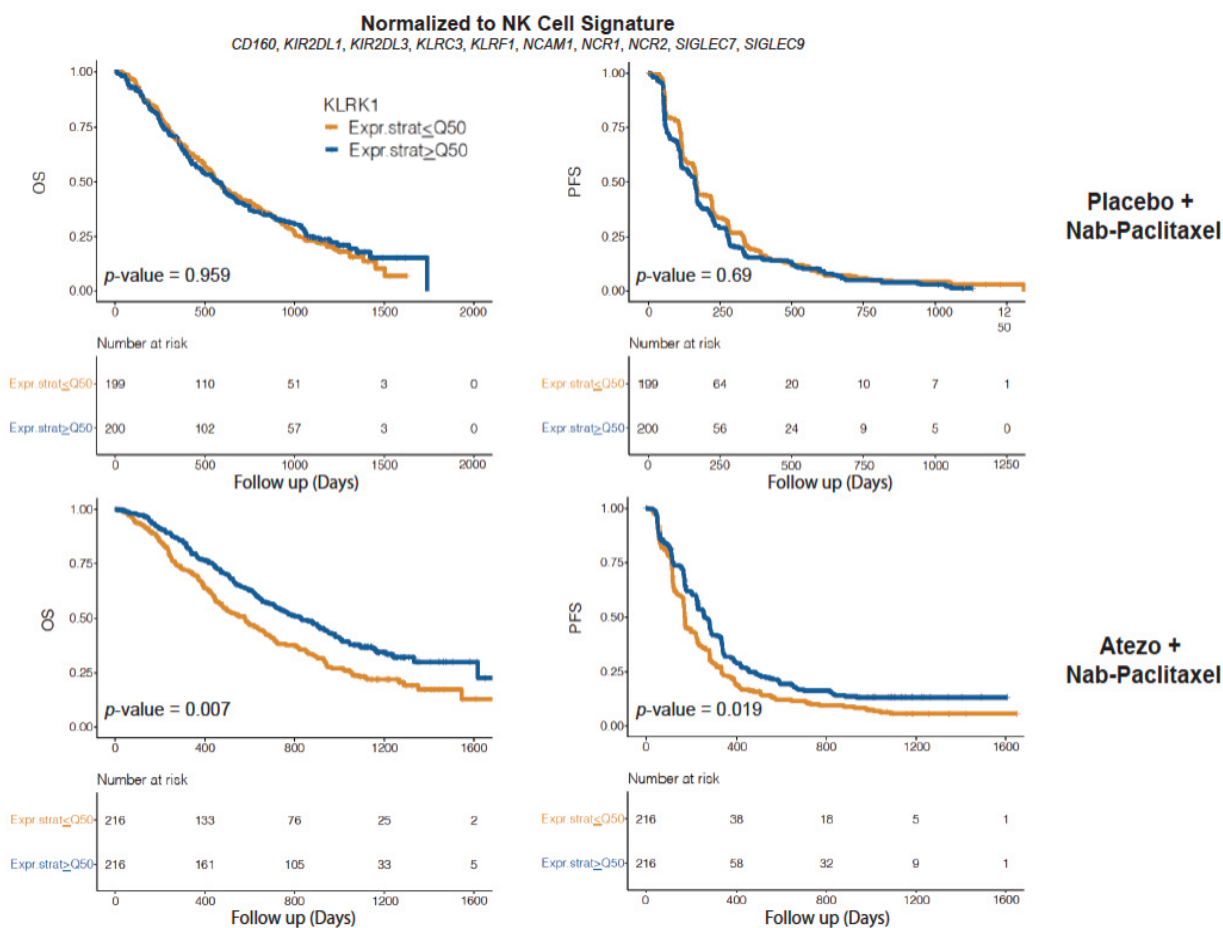


Figure 36: **Comparaison de survie des patients atteints de TNBC traités en fonction de l'expression de KLRK1, avec normalisation des cellules NK.** Analyse de Kaplan-Meier de la survie globale (OS, gauche) et de la survie sans progression (PFS, droite) chez les patients atteints de TNBC. Les patients ont été traités avec un placebo + paclitaxel lié à l'albumine sous forme de nanoparticules (Nab) (en haut) ou avec de l'atezolizumab + Nab-Paclitaxel (en bas),

stratifiés par une expression élevée et faible de KLRK1 (NKG2D) normalisée à une signature des cellules NK

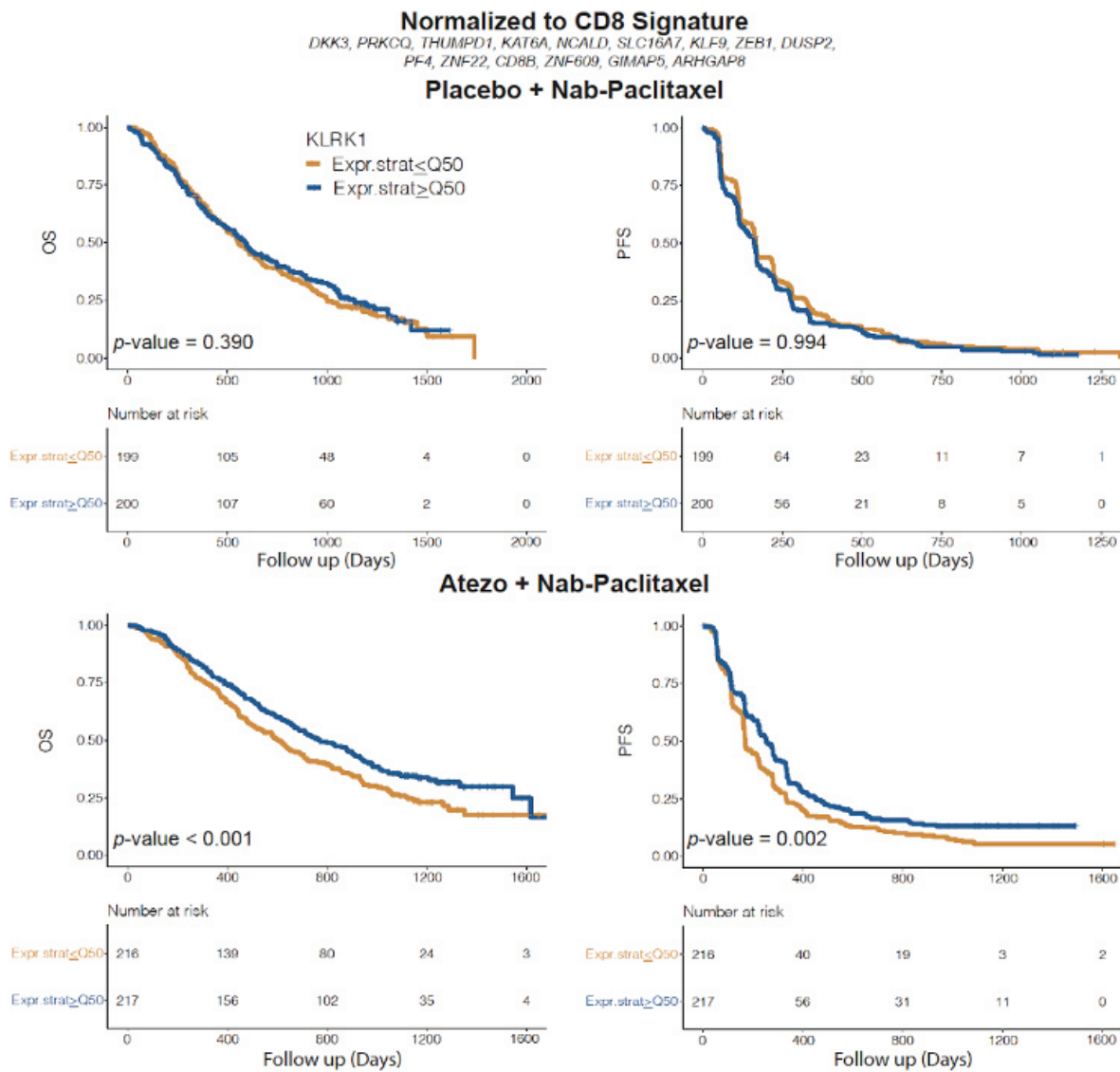


Figure 37: **Comparaison de survie des patients atteints de TNBC traités en fonction de l’expression de KLRK1, avec normalisation des cellules T CD8.** Analyse de Kaplan-Meier de la survie globale (OS, gauche) et de la survie sans progression (PFS, droite) chez les patients atteints de TNBC traités avec un placebo + paclitaxel lié à l’albumine sous forme de nanoparticules (Nab) (en haut) ou avec de l’atezolizumab + Nab-Paclitaxel (en bas), stratifiés par une expression élevée et faible de KLRK1 (NKG2D) normalisée à une signature des cellules CD8

Étant donné que le TNBC manque d'antigènes tumoraux définis et que les TILs partagent des similitudes entre le TNBC et le cancer du sein HER2+ (Pal et al., 2021), nous avons analysé l'expression de NKG2D sur les TILs des tumeurs HER2+ et les PBMC appariés. Nous avons confirmé que NKG2D était exprimé sur les cellules CD8+, mais pas sur les cellules CD4+ des tumeurs HER2+ et des échantillons appariés de PBMC (Figure 38).

Par conséquent, l'expression de NKG2D constitue un facteur pronostique du cancer du sein TNBC et se situe sur une grande proportion de TIL CD8+ mais pas sur les TIL CD4+. NKG2D pouvait donc constituer un parfait candidat pour un ciblage thérapeutique afin d'augmenter l'activité cytotoxique des cellules CD8+.

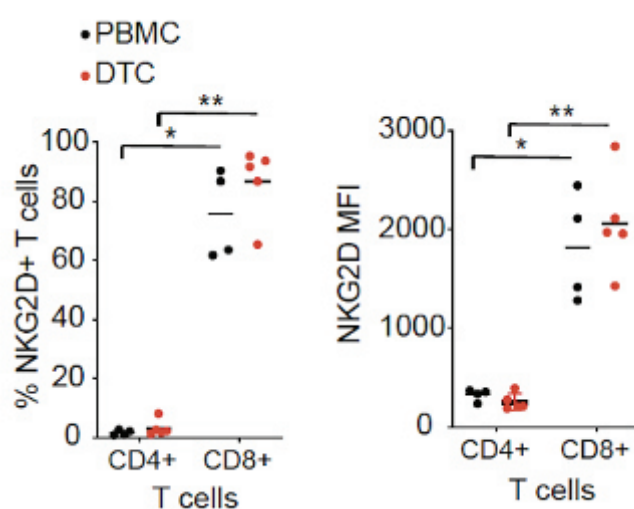


Figure 38: **Comparaison de l'expression de surface de NKG2D des cellules T dans les PBMC et dans les DTC de cancer du sein.** Comparaison des fréquences des cellules T CD4+ et CD8+ NKG2D+ (à gauche) et intensités de fluorescence moyennes de NKG2D (MFI, à droite) à partir de PBMC appariés et dans les cellules dissociées de cancer du sein HER2+ humaines. Le test de Mann-Whitney a été utilisé pour les analyses statistiques ; *, $p \leq 0,05$; **, $p \leq 0,01$

1.2. HER2-CRB induit la formation de la synapse immunitaire entre les cellules NK et les cellules tumorales et active une voie de signalisation

Un anti-NKG2D bispécifique ciblant HER2 (anti-HER2 clone 4D5) a été produit en utilisant la méthodologie "knob-into-hole" (boulon-dans-le-trou), une méthode utilisée pour la production d'anticorps bispécifiques pour assembler deux fragments d'anticorps différents de manière spécifique et contrôlée. De plus, la liaison aux récepteurs Fc a été atténuée par l'introduction d'une mutation N297G. La liaison du HER2-CRB au NKG2D humain (hNKG2D) est caractérisée par une constante de dissociation d'équilibre de $1.752E-7M$. Nous avons aussi

développé un contrôle non ciblé sur les tumeurs, le NIST-CRB (anti-NIST x anti-NKG2D ; NIST, National Institute of Standards and Technology) (Formolo et al., 2015), ainsi qu'un contrôle incapable de se lier à NKG2D, le HER2/NIST (Figure 39).



Figure 39: **Description des anticorps bispécifiques.** Représentation des molécules bispécifiques et courbe de dissociation de HER2-CRB obtenue en utilisant la technologie de Bioacore

La lignée cellulaire de cancer du sein BT474 exprimant des niveaux élevés de HER2 a été utilisée pour les expériences. Nous avons vérifié que le HER2-CRB se liait aux cellules BT474, mais pas le NIST-CRB, comme attendu (Figure 40).

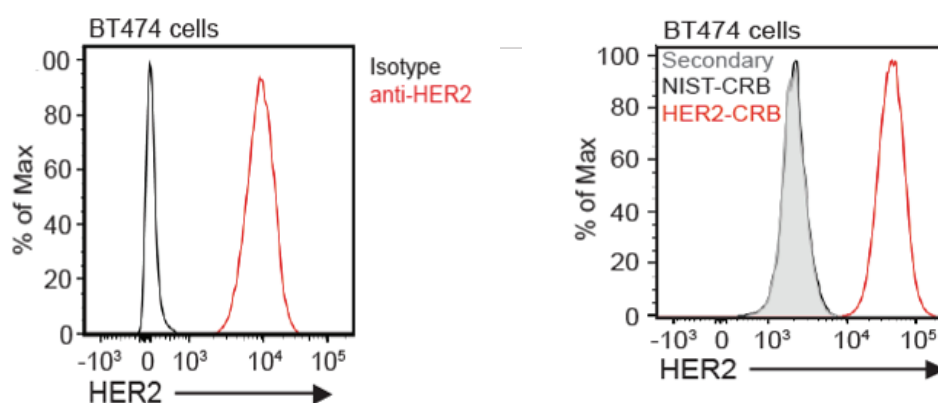


Figure 40: **Expression de surface de HER2 sur les cellules BT474.** Un anticorps témoin isotypique a été utilisé comme contrôle négatif (à gauche). Détection de HER2-CRB ou NIST-CRB sur les cellules BT474

Nous avons intégré la sur-expression de hNKG2D dans la lignée cellulaire Jurkat-NFAT luciférase et avons pu valider que les deux HER2- et NIST-CRB se liaient aux cellules (Figure 41).

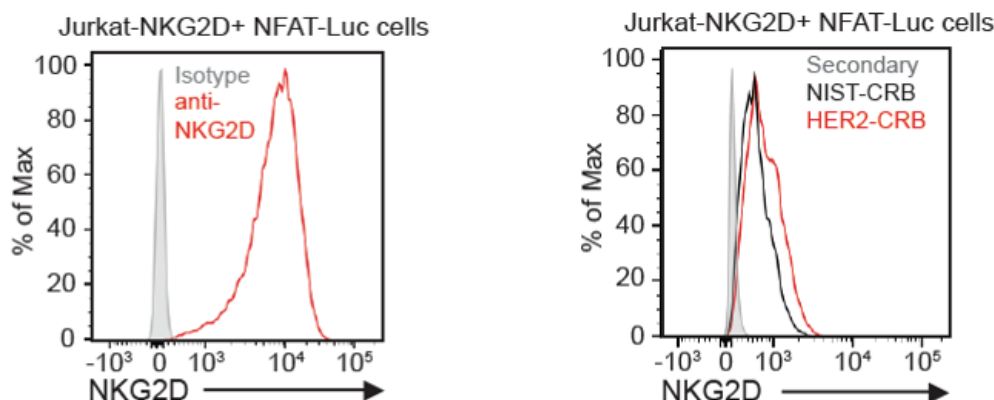


Figure 41: **Expression de surface de HER2 sur les cellules Jurkat-NKG2D+ NFAT-Luc.** Un anticorps témoin isotypique a été utilisé comme contrôle négatif (à gauche). Détection de HER2-CRB ou NIST-CRB sur les cellules Jurkat-NKG2D+ NFAT-Luc

Nous avons également comparé par FACS l'expression de surface de NKG2D dans les cellules NK primaires, non stimulées, préactivées avec IL-2 et IL-15. Les cellules préactivées présentaient une augmentation de l'expression de NKG2D. De plus, les cellules NK primaires marquées avec un traceur cellulaire violet (CTV) conjuguées avec des cellules BT474 marquées avec du tétraméthylrhodamine 5-(et-6)-(((4-chlorométhyl)benzoyl)amino) (CMTMR). Ceci a permis de quantifier la formation de conjugués par cytométrie de flux. Nous avons observé que les cellules NK formaient plus de conjugués avec les cellules BT474 en présence de HER2-CRB comparé au NIST-CRB (Figure 42).

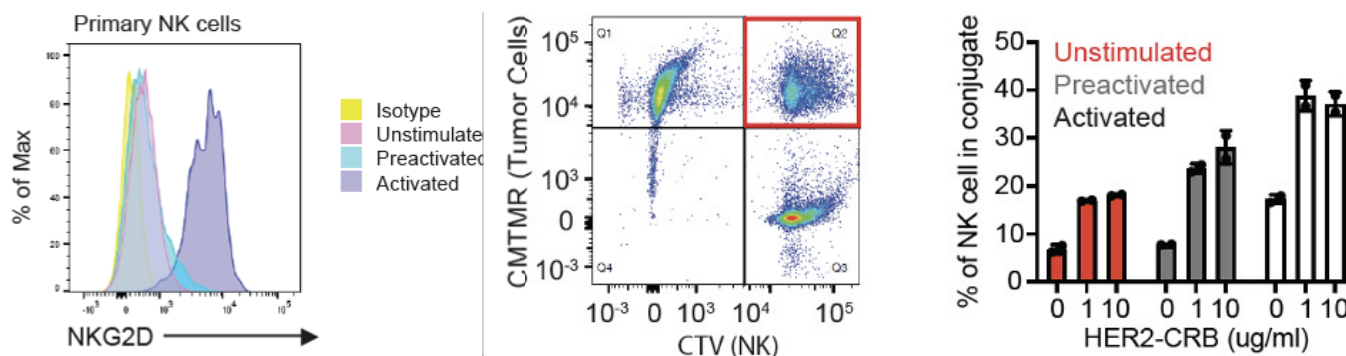


Figure 42: **Comparaison de l'expression de surface de NKG2D de cellules NK activées ou non.** Comparaison de l'expression de surface de NKG2D par cytométrie en flux sur des cellules NK primaires fraîchement isolées, préactivées et activées avec de l'IL-15. Un anticorps de contrôle isotypique a été utilisé comme témoin négatif (à gauche). Cytométrie de flux représentant la formation de conjugués par cytométrie de flux. Quantification des conjugués après une incubation de 10 minutes des cellules NK primaires avec les cellules BT474 en l'absence ou en présence de 1 ou 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de HER2-CRB. Résultats obtenus à partir de deux donneurs sains indépendants à droite

Utilisant la microscopie confocale nous avons pu analyser l'effet de HER2-CRB comparé au NIST-CRB sur l'activation des NK cellules en présence de cellules tumorales exprimant HER2. En effet, la quantification de l'intensité de fluorescence de l'actine et de la phosphorylation de la tyrosine permet de traduire de l'activation de la voie de signalisation de phosphorylation de la tyrosine et donc l'activation des cellules NK lors de la formation de synapse immunologique avec les cellules tumorales. Les cellules NK pouvaient être distinguées grâce à leur coloration par le CTV (Cell Trace Violet) lorsque les cellules NK et BT474 étaient mises en contact. Après incubation, lorsque les cellules NK et BT474 étaient très proches, une zone de quantification a été déterminée et l'intensité de fluorescence a pu être mesurée. Les résultats ont confirmé que le HER2-CRB comparé au NIST-CRB améliorait significativement la formation de la synapse immunologique et engendrait une activation des voies de signalisation intracellulaire dans les cellules NK (Figure 43).

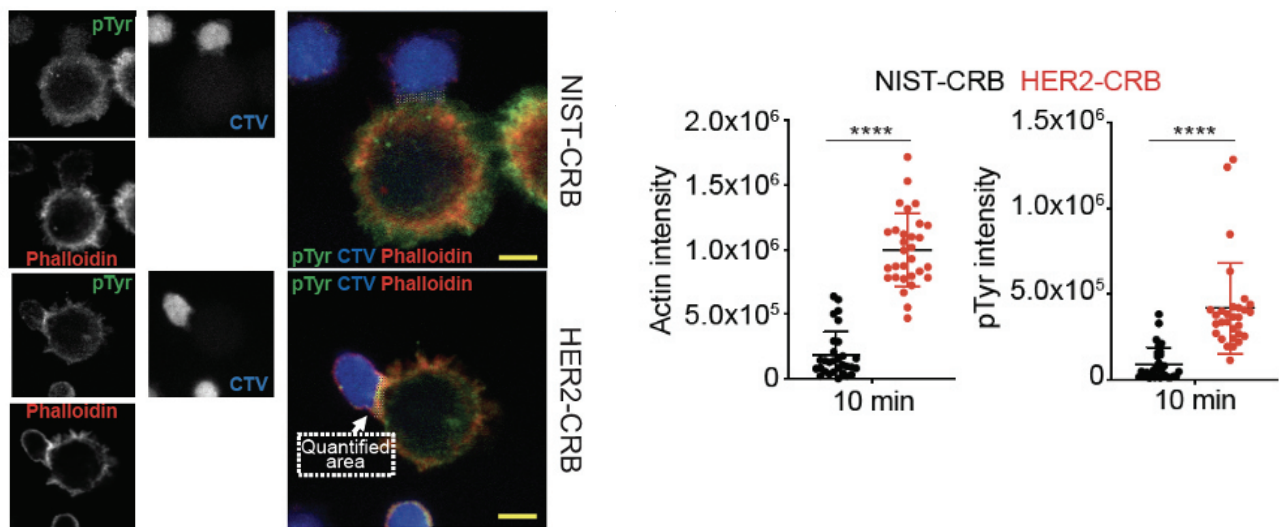


Figure 43: **Imagerie et quantification de la formation de la synapse immunologique en présence de HER2-CRB.** Images représentatives par imagerie confocale de cellules NK primaires marquées avec du CTV conjuguées avec des cellules BT474 en présence de NIST- ou HER2-CRB. La zone quantifiée représentant la synapse immunologique a été utilisée pour quantifier les intensités de fluorescence de phosphotyrosine et de phalloïdine (marqueur de l'actine). La quantification des intensités de fluorescence d'actine et de phosphotyrosine par imagerie confocale de 30 interactions individuelles après une incubation de 10 minutes des cellules NK primaires avec des cellules BT474 en présence de NIST- ou HER2-CRB est représentée à droite

En utilisant des billes revêtues de HER2 humain, nous avons pu montrer que le HER2-CRB augmentait la phosphorylation de ERK - une kinase en aval de la voie NKG2D - (pERK) dans les cellules NK primaires pré-stimulées avec de l'IL-15 (Quatrini et al., 2015). Par conséquent, le HER2-CRB est capable de relier les cellules tumorales aux cellules NK et d'entraîner une activation de la voie de signalisation dépendant de ERK (Figure 44).

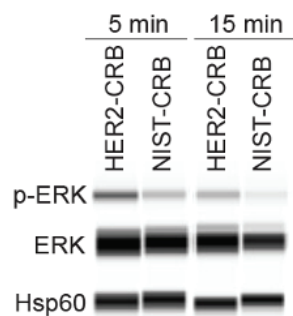


Figure 44: **Activation de la voie de signalisation en présence de HER2-CRB.** Western blot révélant l'expression de la protéine ERK phosphorylée, de la protéine ERK totale et du contrôle de chargement Hsp60 après une incubation pendant 5 et 15 minutes des cellules NK pré-stimulées avec de l'IL-15 et des billes revêtues avec HER2-CRB ou NIST-CRB

1.3. HER2-CRB entraîne l'activation des cellules NK

Pour valider l'activité fonctionnelle de HER2-CRB, nous avons d'abord utilisé les cellules NK92.6DF5 qui expriment NKG2D et les cellules HCC2218 exprimant fortement HER2 (Figure 45).

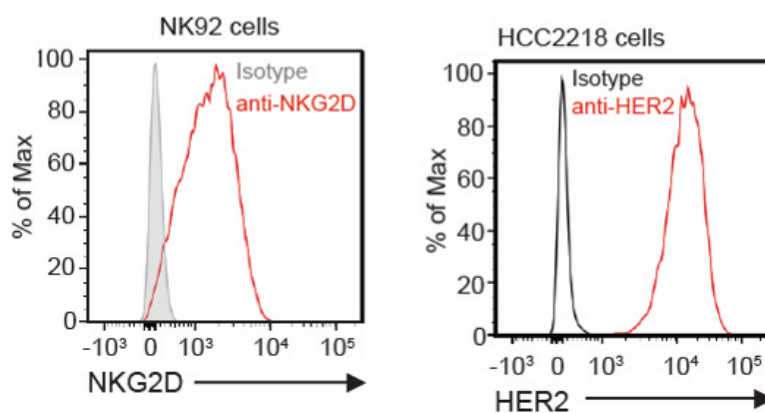


Figure 45: **Expression de NKG2D sur les cellules NK-92 (6D5)** par cytométrie en flux. Un anticorps isotypique a été utilisé comme contrôle négatif (gauche). Expression de HER2 sur les cellules HCC2218. Un anticorps isotypique correspondant a été utilisé comme contrôle négatif (droite)

Afin de quantifier la proportion de cellules tuées par les cellules effectrices, nous avons utilisé la lignée cellulaire BT474 dotée d'un rapporteur nucléaire fluorescent ce qui permet de

compter par microscopie le nombre de cellules en temps réel en utilisant l'instrument de microscopie Incucyte (Essen Bioscience). Bien que les cellules NK92.6DF5 aient montré une cytotoxicité spontanée élevée par rapport aux cellules NK primaires, la cytotoxicité a été augmentée avec HER2-CRB (Figure 46).

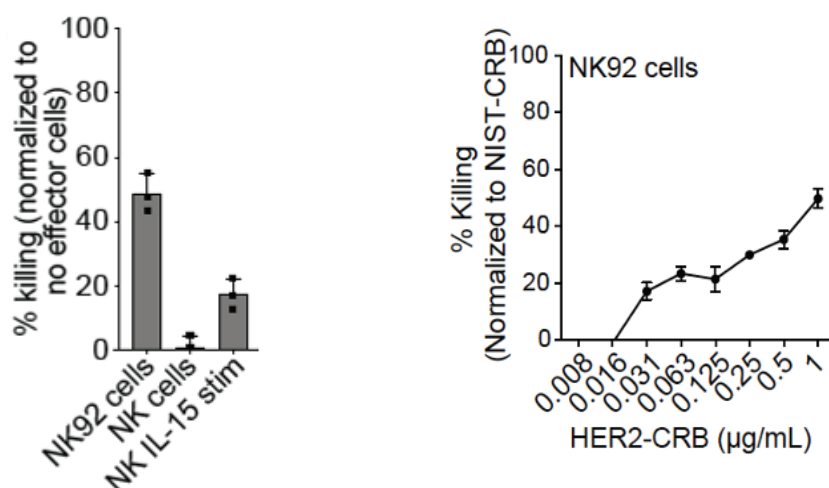


Figure 46: **Comparaison de l'activité cytotoxique de cellules NK en présence de HER2-CRB.** Pourcentage de mort cellulaire des cellules BT474 cultivées avec les cellules NK-92 (6D5), des cellules NK primaires, ou des cellules NK primaires pré-stimulées avec de l'IL-15 pendant quatre jours

Pour étudier l'activité de HER2-CRB dans un type cellulaire plus pertinent, nous avons utilisé des cellules NK primaires stimulées par l'IL-15 car cette cytokine induit des niveaux plus élevés de NKG2D et augmente leur potentiel cytotoxique (Zhang et al., 2008). De manière similaire aux cellules NK92.6DF5, HER2-CRB a engendré la mort spécifique des cellules BT474 par rapport aux témoins négatifs (Figure 47).

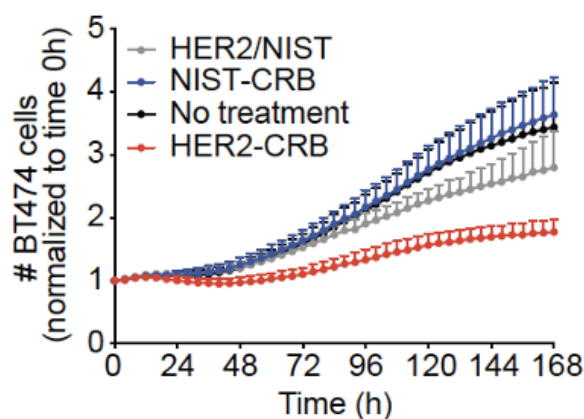


Figure 47: **Comparaison cinétique de l'activité cytotoxique des cellules NK en présence de HER2-CRB.** Ratio de détection des cellules BT474 normalisé à l'instant initial (0 h). Les cellules BT474 ont été mises en co-culture avec des cellules NK primaires pré-stimulées par IL-15 avec un rapport E:T (cellules effectrices : cellules cibles) de 1:1 en l'absence ou en présence de HER2-CRB. Les données sont issues de trois donneurs indépendants de cellules T CD8+.

L'analyse des analytes par ELISA dans le milieu de culture pour chaque condition a permis de révéler une augmentation des cytokines telles que IFN- γ et TNF- α ainsi que des chimiokines comme CXCL10 (ligand 10 du motif chimiokine CXC) et les protéines inflammatoires des macrophages-1 α et 1 β (MIP-1 α et MIP-1 β) avec le traitement HER2-CRB par rapport aux témoins négatifs (Figure 48).

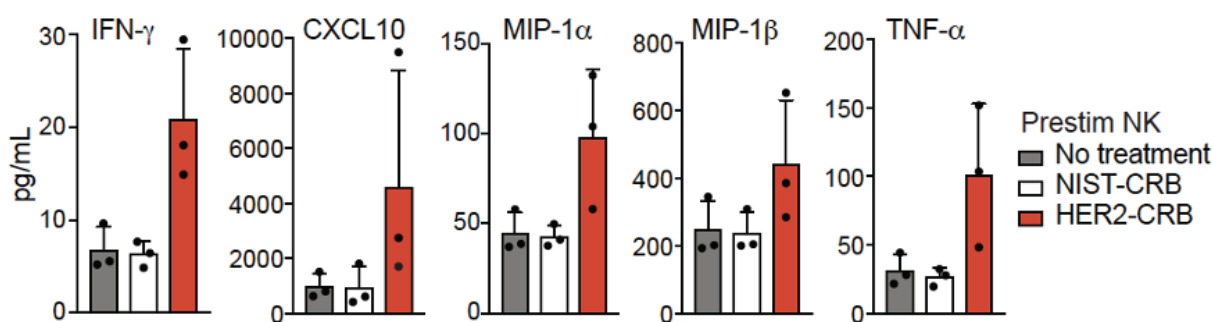


Figure 48 : **Analyse d'analytes sécrétées par les cellules NK en présence de HER2-CRB.**

Analyse des cytokines et chemokines sécrétées par les cellules NK pré-stimulées avec de l'IL-15, en absence de traitement et après traitement avec le NIST-CRB ou le HER2-CRB

Nous avons également confirmé par cytométrie en flux que HER2-CRB induit une fréquence plus élevée des cellules NK CD69+ activées et Ki67+ en division et provoque une augmentation du niveau d'expression de ces protéines. Cela confirme que HER2-CRB entraîne l'activation des cellules NK en présence de cellules cibles tumorales (Figures 49).

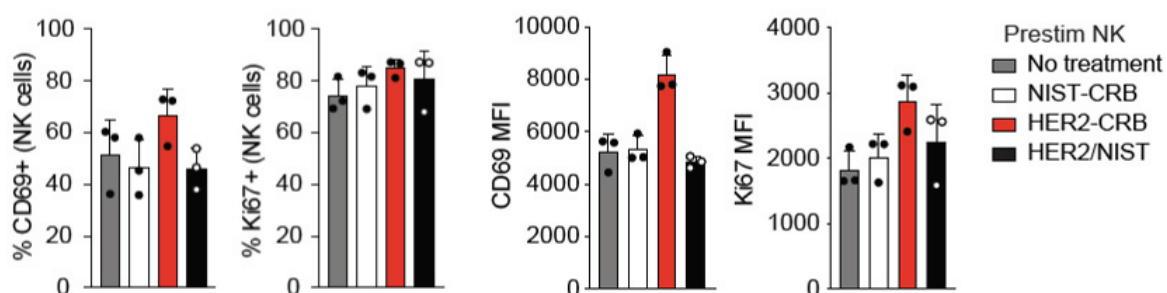


Figure 49: **Comparaison d'expression de marqueurs d'activation en présence de HER2-CRB.** Fréquence et moyenne d'intensité de fluorescence des marqueurs d'activité (CD69) et de cellules en division (Ki67) dans les cellules NK pré-stimulées avec de l'IL-15, en absence de traitement et après traitement avec NIST-CRB, HER2-CRB ou HER2/NIST

Pour évaluer comment les conditions pro-inflammatoires influencent l'activité de HER2-CRB, nous avons réalisé un essai de cytotoxicité en utilisant un milieu conditionné de 24 heures provenant de co-cultures de PBMC contenant des lymphocytes T et des cellules BT474 en présence de HER2-TDB (anti-HER2 clone 4D5xanti-CD3) ou de NIST-TDB (anti-NISTxanti-CD3, témoin négatif).

Puis, les cellules NK ont été mises en co-culture avec les cellules BT474 à un rapport E:T de 1:1 en présence de HER2-CRB, de témoins négatifs ou de trastuzumab comme témoin positif avec ou sans milieu conditionné.

Le milieu conditionné de la co-culture avec HER2-TDB a induit une plus grande activité cytotoxique des cellules NK avec HER2-CRB par rapport à NIST-CRB ou au milieu conditionné avec NIST-TDB (Figure 50). Dans l'ensemble, ces données confirment que HER2-CRB améliore la fonction effectrice des cellules NK, elle-même augmentée par des conditions pro-inflammatoires.

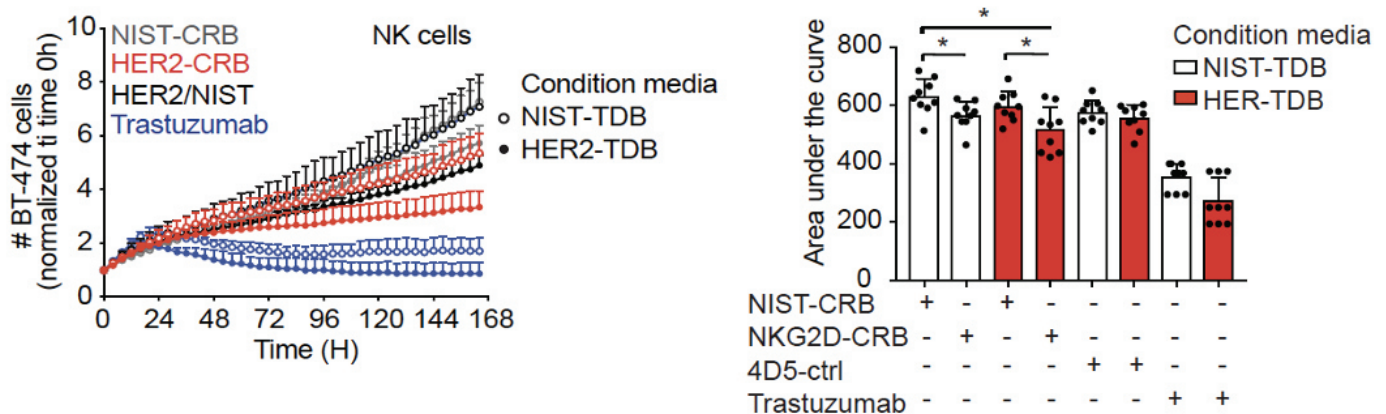


Figure 50: **Comparaison cinétique de l'activité cytotoxique des cellules NK en présence de HER2-CRB et de milieux de différentes conditions expérimentales.** Ratio de la toxicité normalisé par le temps 0 et quantification de l'aire sous la courbe. Les cellules BT474 ont été mises en co-culture avec des cellules NK primaires en présence de HER2-CRB, de témoins négatifs ou de trastuzumab avec des milieux conditionnés obtenus à partir de la co-culture de 24 h de PBMC et de cellules BT-474 en présence de HER2-4D5-TDB ou de NIST-TDB. Trois donneurs indépendants sont représentés pour le mélange de milieux conditionnés de donneurs cultivés avec des cellules NK de 3 donneurs distincts (9 échantillons au total)

1.4. HER2-CRB augmente l'activation des cellules T CD8+ médiée par HER2-TDB.

La séquence du domaine variable de deux clones anti-HER2, 4D5 (HER2-TDB) et 2C4 (HER2.2C4-TDB) a été utilisée pour générer des TDB (Junttila et al., 2014). 4D5 est le clone utilisé pour la génération de Trastuzumab et 2C4 est le clone correspondant à la molécule Pertuzumab. Nous avons utilisé les deux HER2-TDB en combinaison avec HER2-CRB pour évaluer l'activité sur les cellules T. Les cellules Jurkat-HuNKG2D+ NFAT-Luc ont été mises en co-culture avec des cellules BT474 en présence de concentrations sous-optimales de HER2.2C4-TDB, HER2-TDB ou NIST-TDB en combinaison avec HER2-CRB ou des molécules des témoins négatifs. HER2-CRB a induit une activité de luciférase plus importante lorsqu'elle était combinée avec HER2.2C4-TDB et HER2-TDB, respectivement, par rapport à NIST-CRB (Figure 51).

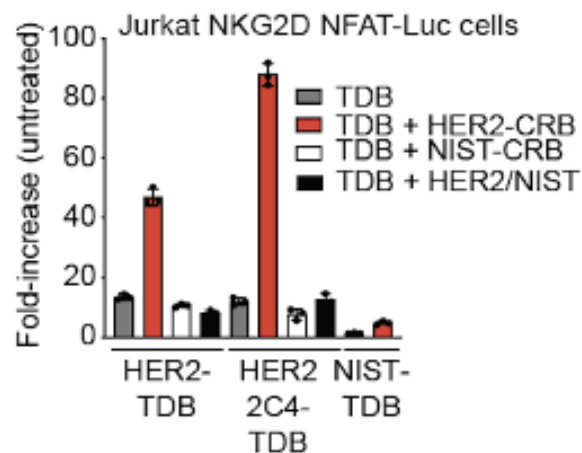


Figure 51: **Activité de la luciférase normalisée par rapport aux cellules Jurkat-NKG2D+ NFAT-Luc non traitées.** Les cellules Jurkat ont été mises en co-culture avec des cellules BT474 pendant 6 heures avec HER2-2C4-TDB, HER2-4D5-TDB ou NIST-TDB en combinaison avec soit HER2-CRB, NIST-CRB ou HER2/NIST

Le traitement des co-cultures de cellules CD8+ T et BT474 avec HER2-TDB a donné une fenêtre de concentration étroite pour l'activité cytotoxique. En revanche, HER2.2C4-TDB a permis de réaliser une titration et de sélectionner la concentration de 10 ng/mL pour évaluer les effets de HER2-CRB sur l'activité des cellules T (Figure 52).

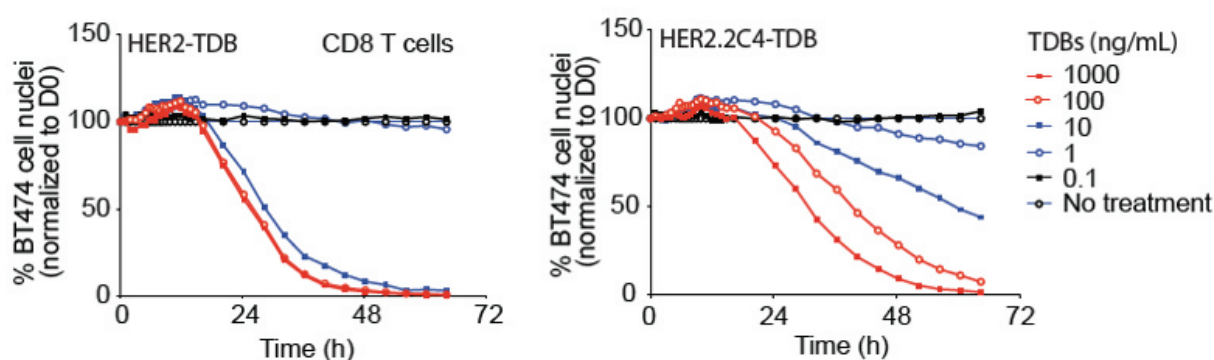


Figure 52: **Comparaison cinétique de l'activité cytotoxique des cellules T CD8 en présence de HER2-TDBs.** Pourcentage des cellules BT474 vivantes après avoir été mises en co-

culture avec des cellules T CD8+, en présence de HER2-TDB titré ou HER2-2C4-TDB. Le décompte des noyaux des cellules BT-474 a été normalisé au temps 0 h

Basé sur les données ci-dessus, les cellules BT474 ont été mises en co-culture pendant plus de cinq jours avec des cellules T CD8+ primaires à un rapport E:T de 1:1 en présence de 10 ng/mL de HER2-2C4-TDB seul ou en combinaison avec HER2-CRB titré. Nous avons constaté que HER2-CRB améliorait la cytotoxicité des cellules T CD8+ médiée par HER2.2C4-TDB contre les cellules BT474 de manière dose-dépendante (Figure 53).

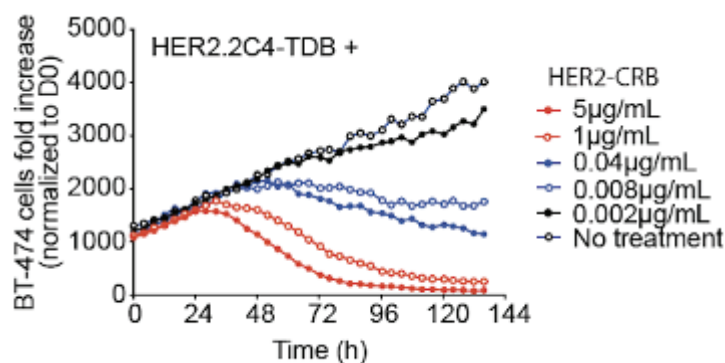


Figure 53: **Comparaison cinétique de l'activité cytotoxique des cellules T CD8 en présence de HER2-2C4 TDB and HER2-CRB.** Cytotoxicité des cellules cibles BT474 normalisée au temps 0 h en présence de HER2.2C4-TDB et différentes concentrations de HER2-CRB. Représentatif de quatre donneurs indépendants.

Dans cette même expérience, nous avons analysé la présence de cytokines. De manière concordante, HER2-CRB a aussi entraîné une sécrétion accrue de médiateurs pro-inflammatoires. Les témoins négatifs CRB n'ont pas modifié les niveaux de cytokines par rapport à HER2.2C4-TDB seul (Figure 54).

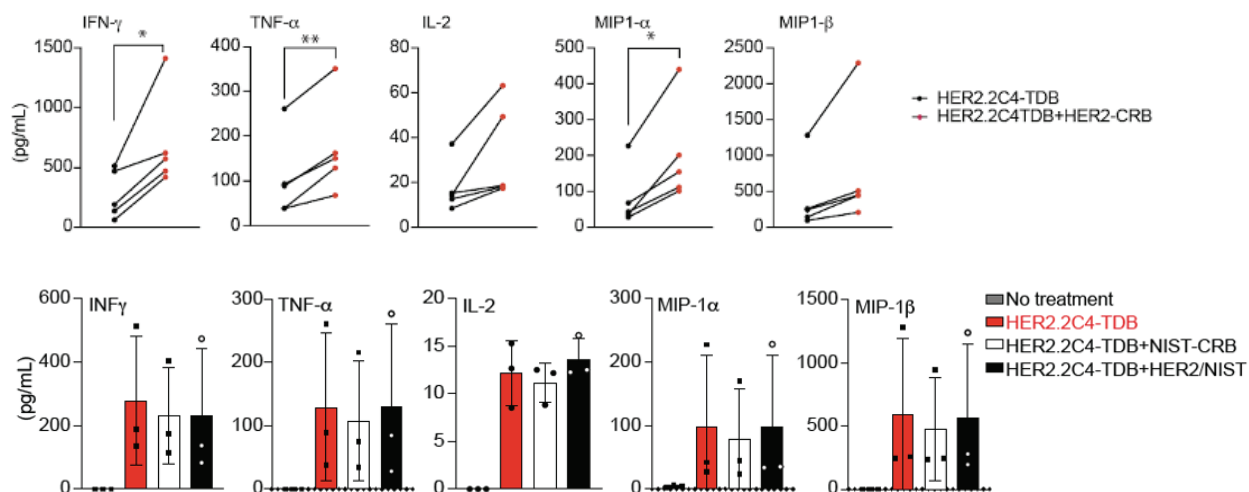


Figure 54: **Quantification des cytokines dans la co-culture de cellules T CD8⁺ et de cellules BT474** à un rapport E:T de 1:1 en présence de 10 ng/mL de HER2-2C4-TDB seul ou en combinaison avec HER2-CRB (au-dessus) ou avec les contrôles négatifs (dessous) après 96 heures

Pour comprendre comment la signalisation de NKG2D influence les cellules T CD8⁺, nous avons réalisé une analyse de RNAseq sur la totalité des cellules CD8 T (Bulk) 24h après la co-culture avec des cellules BT474 en présence de 10 ng/mL de HER2-2C4-TDB seul ou en combinaison avec HER2-CRB. HER2.2C4-TDB à elle seule a provoqué des changements transcriptomiques robustes et l'analyse de l'enrichissement des ensembles de gènes (GSEA) était cohérente avec l'engagement du TCR (Figure 55).

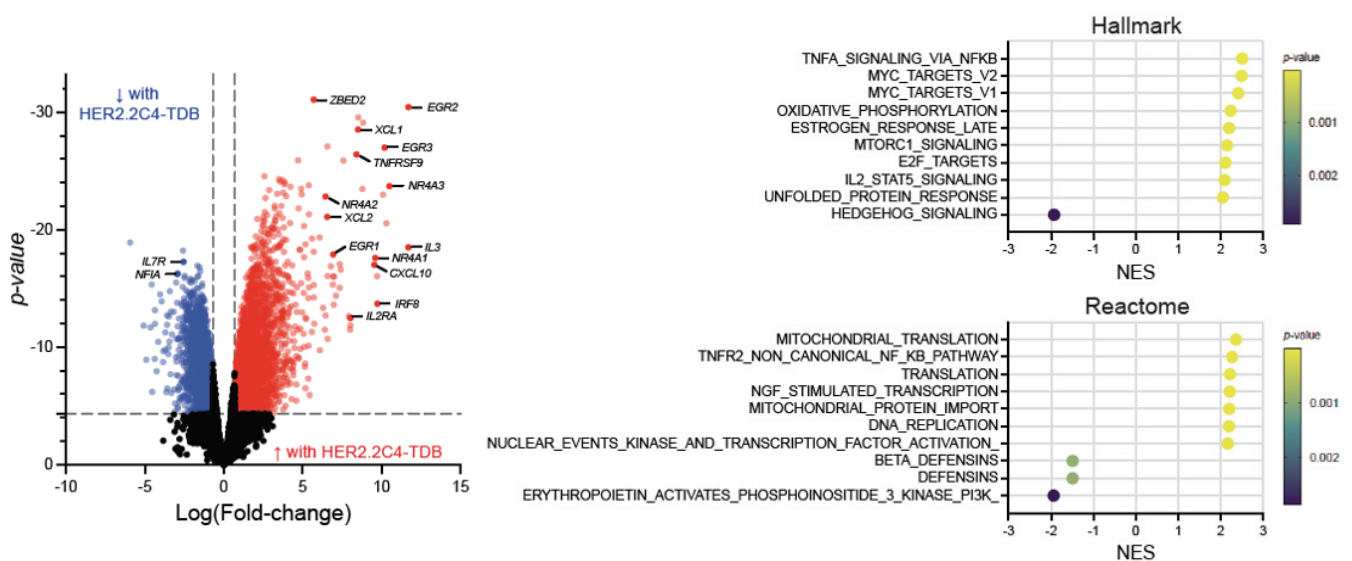


Figure 55: **Expression transcriptionnelle des cellules T CD8 après 24H de co-culture en présence de HER2.2C4-TDB.** Analyse de l'expression génique différentielle représentée sous forme de graphique en volcan à partir de données de séquençage d'ARN en bulk des cellules T CD8+ en co-culture pendant 24 heures avec des cellules BT474 en présence de 10 ng/mL de HER2-2C4-TDB (à gauche). Les points bleus représentent un Log(fold-change) < -0.7 et les points rouges représentent un Log(fold-change) > 0.7, avec une valeur de $p < 0.05$. Les points noirs sont en dessous du seuil de significativité. GSEA issues de Hallmark (en haut à droite) et de Reactome (en bas à droite) dans les mêmes conditions

L'addition de HER2-CRB aux cellules T CD8+ en co-culture pendant 24 heures avec des cellules BT474 en présence de 10 ng/mL de HER2-2C4-TDB a augmenté l'expression de transcrits associés à l'activation des cellules T (Figure 56).

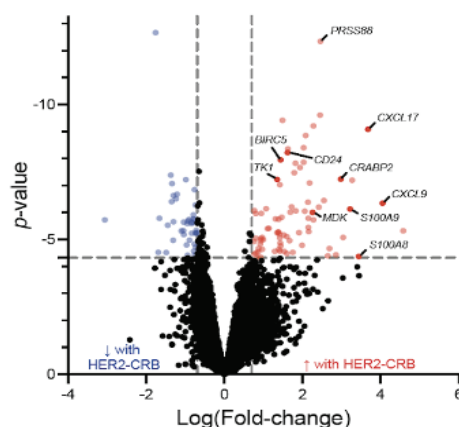


Figure 56: **Comparaison de l'expression transcriptionnelle des cellules T CD8 après 24H de co-culture en présence de HER2.2C4-TDB avec et sans HER2-CRB.** Analyse de l'expression génique différentielle à partir de données de séquençage d'ARN en bulk des cellules T CD8+ en co-culture pendant 24 heures avec des cellules BT474 en présence de 10 ng/mL de HER2-2C4-TDB en combinaison avec HER2-CRB, représentée sous forme de graphique en volcan. Les points bleus représentent un Log(fold-change) < -0.7 et les points rouges représentent un Log(fold-change) > 0.7, avec une valeur de $p < 0.05$. Les points noirs sont en dessous du seuil de significativité.

HER2-CRB a amélioré plusieurs processus biologiques, y compris la phosphorylation oxydative, la signalisation des voies cytokiniques, la traduction, la transcription et la prolifération ainsi qu'une signature génique de cellules T CD8+ activées de manière aiguë, mettant en évidence les effets biologiques multifacettes de NKG2D sur les cellules T CD8+ humaines (Figure 57).

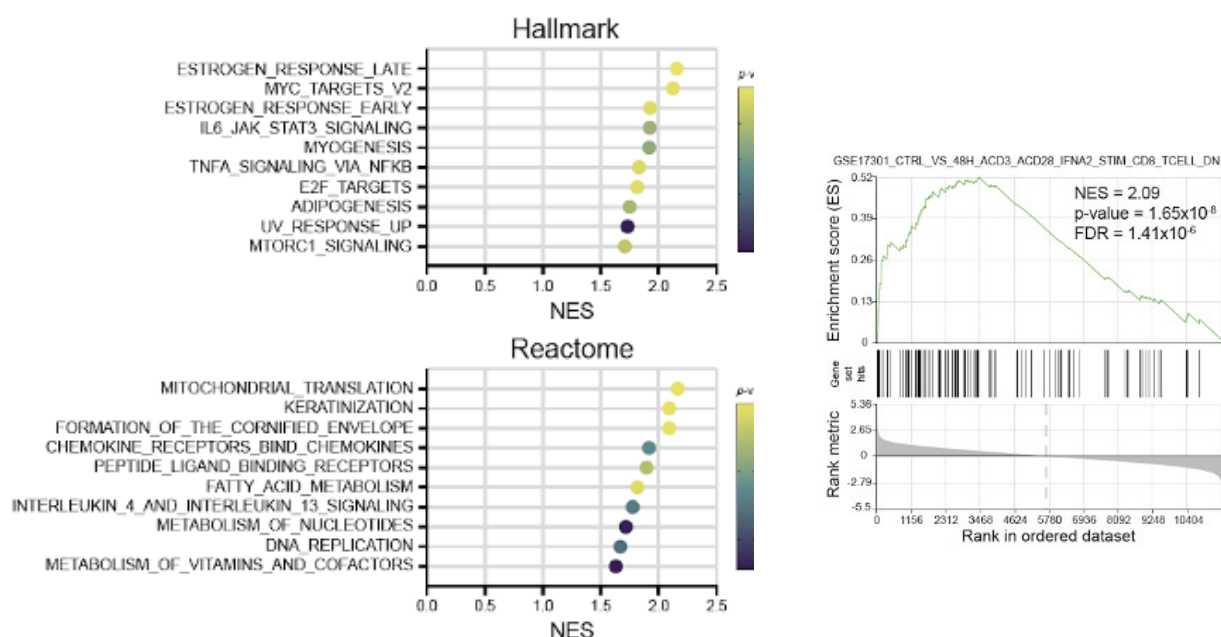


Figure 57: **Etude de l'enrichissement génique.** Données GSEA provenant des ensembles de gènes Hallmark (en haut) et Reactome (en bas) des résultats ci-dessus. Enrichissement d'un ensemble de gènes à fonction immunologique identifiés par GSEA à partir des données de (D).

1.5. HER2-CRB améliore l'activité *in vivo* de HER2-TDB

Pour évaluer l'activité *in vivo* de HER2-CRB, des souris immunodéficientes ont été inoculées avec une lignée cellulaire résistante au trastuzumab et au pertuzumab, JIMT-1 (Tanner et al., 2004). Les souris porteuses de tumeurs ont été ou non inoculées avec des PBMC humains et traitées avec HER2-CRB et/ou HER2-TDB. Bien que HER2-CRB et HER2-TDB soient composés du même clone anti-HER2 et concurrencent le même épitope HER2, HER2-TDB est efficace *in vivo* sur les tumeurs exprimant fortement HER2 lorsqu'il est co-dosé avec trastuzumab (clone bivalent 4D5). La combinaison de HER2-CRB avec HER2-TDB a réduit significativement la croissance tumorale par rapport à HER2-TDB seul. Les cohortes de contrôle n'ayant reçu que le véhicule, HER2-CRB seul ou des conditions sans PBMC n'ont eu aucun effet sur la croissance tumorale (Figures 58).

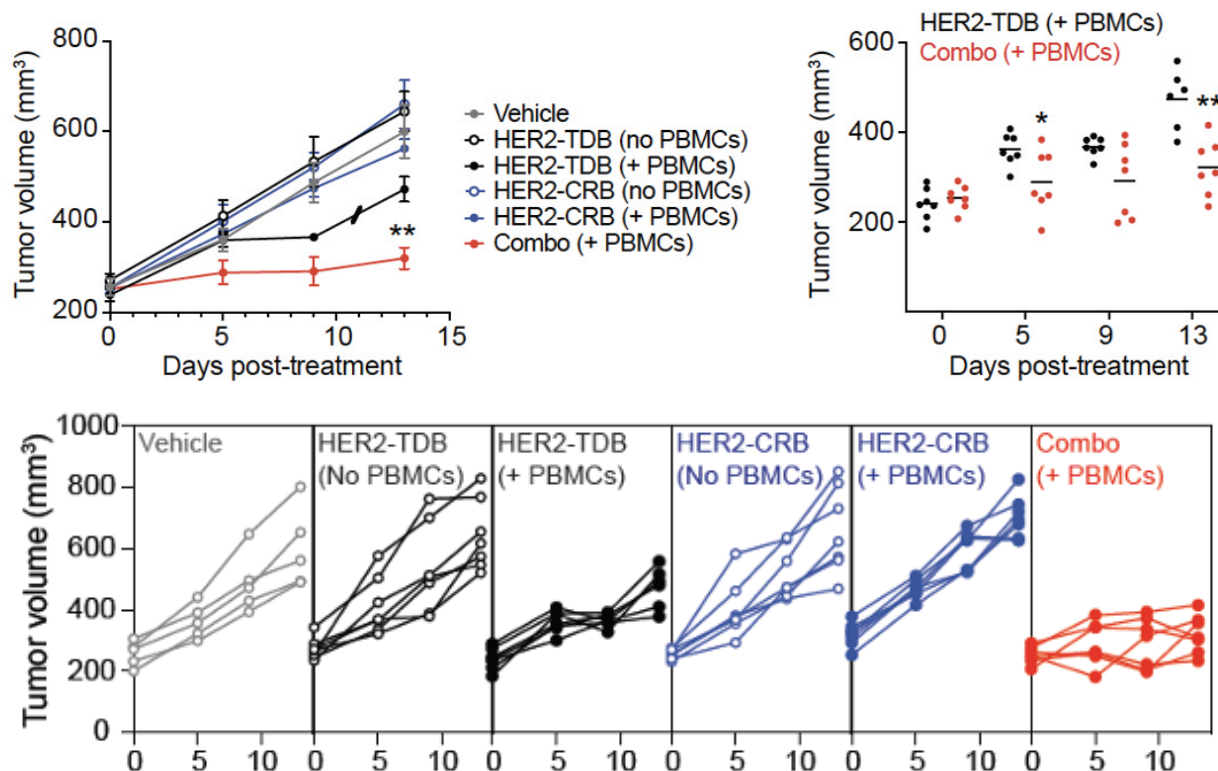


Figure 58: **Comparaison des volumes tumoraux des souris xénotransplantées traitées avec en combinaison ou non avec HER2-CRB.** Croissance du volume tumoral de JimT-1 au fil du temps chez les souris NSG (à gauche et en bas) avec ou sans transfert adoptif de PBMC humains traités avec HER2-4D5-TDB seul, HER2-CRB seul ou en combinaison (combo). La barre oblique représente le décès d'une souris dû à des problèmes de santé. A droite la comparaison des volumes tumoraux individuels des souris entre le traitement avec HER2-TDB ou en combo sont représentés.

Pour étudier l'activité anti tumorale de HER2-CRB dans un système immunocompétent, nous avons développé un anticorps bispécifique HER2-CRB réactif chez la souris (anti-HER2 clone 4D5xanti-souris NKG2D, mHER2-CRB). mHER2-CRB avait une constante de dissociation d'équilibre monovalente de $7.183 \times 10^{-9} \text{ M}$ pour NKG2D murin. Nous avons surexprimé NKG2D murin dans la lignée cellulaire Jurkat NFAT-Luciférase et avons confirmé la liaison de mHER2-CRB à ces dernières (Figure 59).

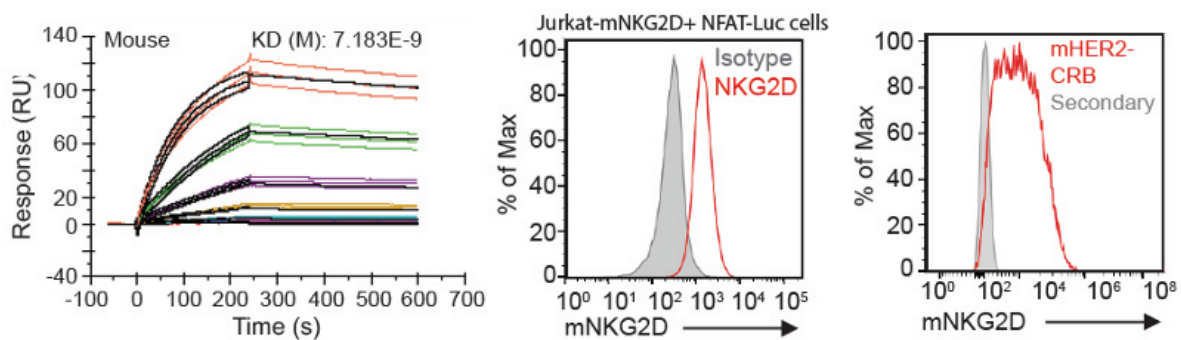


Figure 59: **Expression de mNKG2D et binding de mHER2-CRB sur les cellules Jurkat-mNKG2D+ NFAT luciférase.** Quantification de la constante de dissociation pour mHER2-CRB à NKG2D de souris par analyse Biacore (gauche). Expression de NKG2D de souris par cytométrie en flux (FACS) sur des cellules Jurkat-mNKG2D+ NFAT-luciférase. Un contrôle isotypique a été utilisé comme témoin négatif (centre). Liaison de mHER2-CRB aux cellules Jurkat-mNKG2D+ NFAT luciférase avec l'anticorps secondaire uniquement comme contrôle négatif (droite)

mHER2-CRB en combinaison avec un mHER2-TDB de substitution murin (anti-HER2 clone 4D5xanti-souris CD3ε clone 2C11, mHER2-TDB) augmentait l'activité luciférase dans la lignée cellulaire susmentionnée par rapport à mHER2-TDB seul (Figure 60).

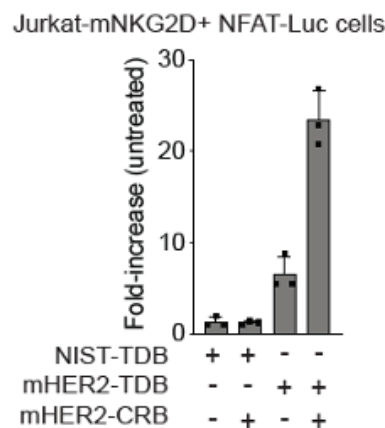


Figure 60: **Analyse de l'activité luciférase des cellules Jurkat-mNKG2D+ NFAT luciférase.** Activité de la luciférase dans les cellules Jurkat NFAT luciférase surexprimant NKG2D murin. Les cellules Jurkat ont été mises en co-culture pendant 6 heures avec mHER2-4D5-TDB ou NIST-TDB, avec ou sans mHER2-CRB

Pour évaluer l'activité de mHER2-CRB sur les cellules T CD8+ murines *in vitro*, nous avons confirmé que les cellules MC38 surexprimant HER2 humain étaient sensibles à mHER2-

TDB et avons sélectionné une dose sub-optimale de 72 ng/mL. En utilisant ce test, nous avons confirmé que mHER2-CRB améliorait la cytotoxicité des cellules T CD8+ murines (Figure 61).

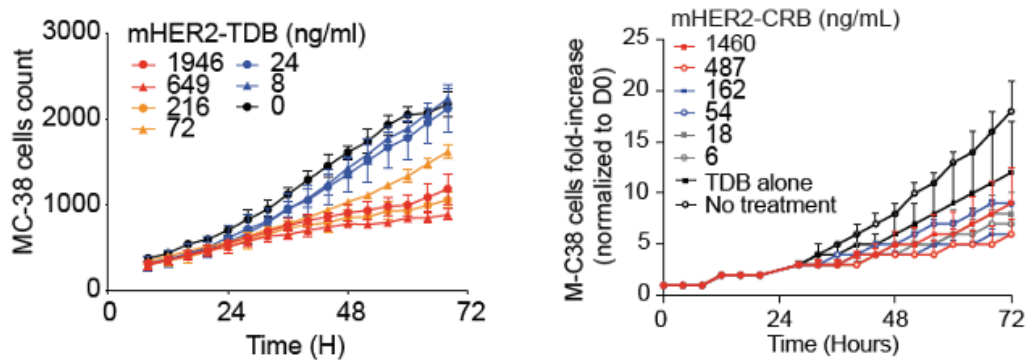


Figure 61: **Titration et analyse de l'activité cytotoxique de mHER-TDB en combinaison avec mHER2-CRB.** Titration cytotoxique de mHER2-TDB sur les cellules MC-38 en co-culture avec des cellules T CD8+ murines (à gauche). Titration cytotoxique de mHER2-CRB sur les cellules MC-38 en co-culture avec des cellules T CD8+ murines en présence ou non de mHER2-TDB (à droite)

Pour évaluer les conséquences biologiques de mHER2-CRB dans un modèle *in vivo* immunocompétent, nous avons utilisé le modèle de tumeur Founder #5 (Fo5) développé à partir de souris transgéniques MMTV-HER2 et présentant une résistance inhérente au trastuzumab (Lewis Phillips et al., 2008). L'expression de NKG2D a été confirmée sur les cellules T CD8+ suite au traitement par mHER2-TDB dans les tumeurs Fo5 (Figure 62).

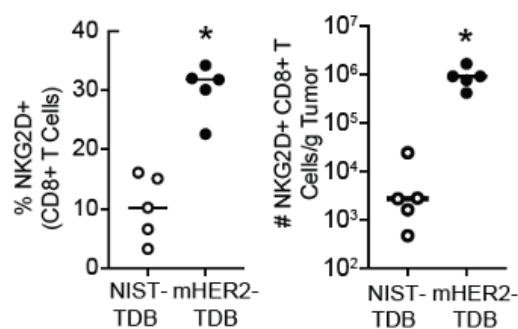


Figure 62: **Analyse de l'expression de NKG2D des cellules T CD8 murines.** Fréquence des cellules T CD8+ NKG2D+ et nombre absolu de cellules T CD8+ NKG2D+ par gramme de tumeur Fo5 quatre jours après le traitement avec mHER2-TDB ou NIST-TDB

Les souris ont été traitées soit avec le véhicule, mHER2-TDB seul, mHER2-CRB seul ou les deux molécules combinées. Le traitement combiné a significativement diminué le volume des tumeurs par rapport aux cohortes d'agents uniques. Par conséquent, les HER2-CRB améliorent l'efficacité *in vivo* de HER2-TDB dans les modèles immunocompétents humains et murins (Figure 63).

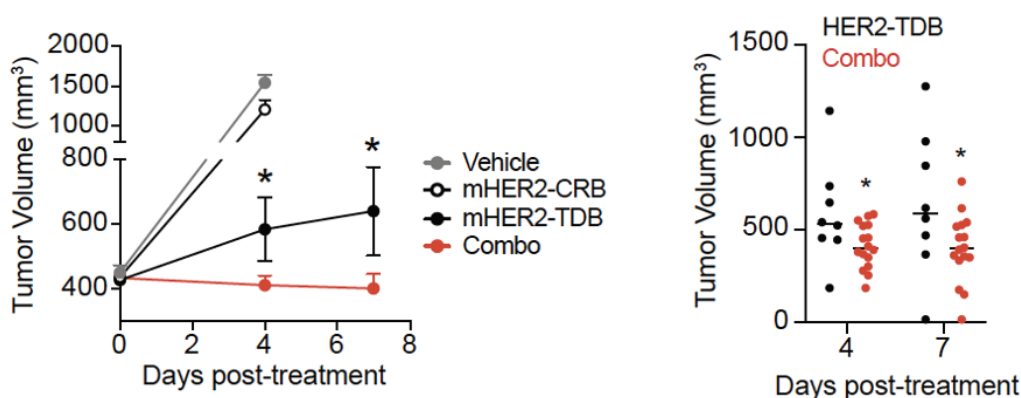


Figure 63: **Changement des volumes tumoraux du modèle de tumeur Fo5.** Les souris ont été traitées avec mHER2-4D5-TDB, mHER2-CRB ou en combinaison (combo). Un traitement avec un véhicule a été utilisé comme témoin négatif (gauche). Volumes tumoraux individuels au jour 4 et au jour 7 (droite)

1.6. NKG2D-CRB renforce la fonction effectrice des cellules NK et CD8+ en combinaison avec HER2-TDB

Ensuite, nous avons étudié les conséquences pharmacodynamiques de la combinaison mHER2-CRB et mHER2-TDB dans le modèle Fo5. Les souris porteuses de tumeurs Fo5 ont été traitées avec NIST-TDB ou mHER2-TDB en combinaison avec NIST-CRB ou mHER2-CRB. Le sang a été prélevé au jour 1 et les tumeurs ont été collectées 4 jours après le traitement pour l'analyse. La quantité de lymphocytes était similaire entre la cohorte traitée uniquement avec HER2-TDB et les animaux traités avec la combinaison des deux molécules (Figure 64).

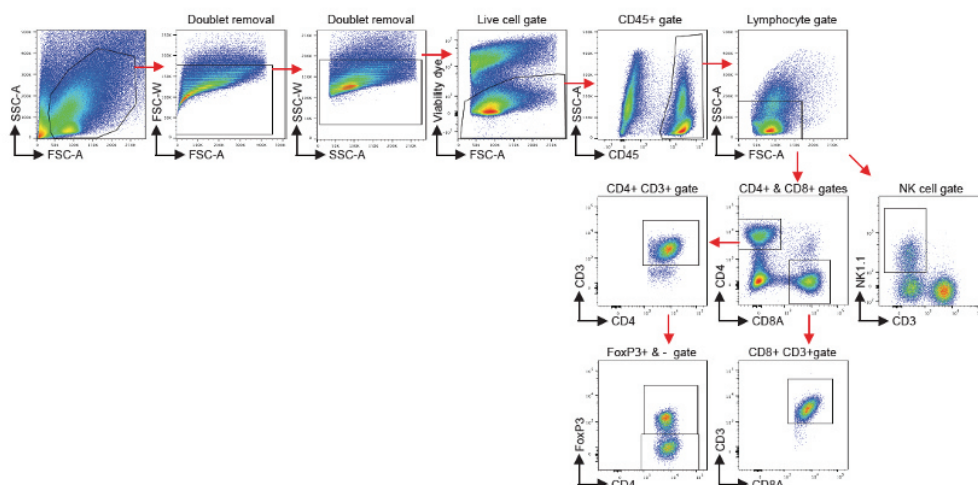


Figure 64: **Stratégie d'analyse par cytométrie en flux**

Néanmoins, une augmentation significative de la fréquence de cellules CD8+ T et/ou NK exprimant Ki67, Granzyme B, CD107a/b, IFN- γ et TNF- α a été détectée après le traitement combiné par rapport au traitement uniquement avec mHER2-TDB (Figure 65).

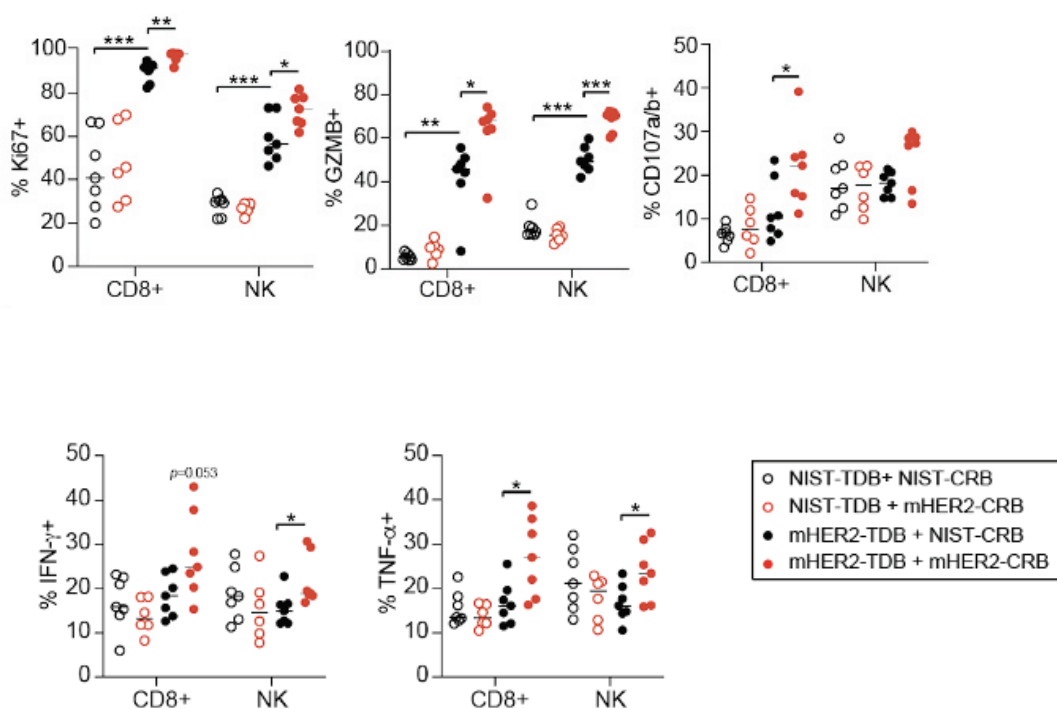


Figure 65: **Analyse de marqueurs d'activation des cellules T CD8 et NK.** Pourcentage de cellules T CD8+ et NK exprimant Ki67, Granzyme B, CD107a/b, IFN- γ et TNF- α dans les souris porteuses de tumeurs Fo5 après traitement avec NIST-TDB ou mHER2-TDB en combinaison avec NIST-CRB ou mHER2-CRB

La proportion similaire de cellules CD8+ T exprimant des marqueurs de dysfonction entre les animaux traités avec mHER2-TDB et ceux traités avec la combinaison indique que mHER2-CRB ne semble donc pas entraîner une augmentation de cellule T dysfonctionnelles lorsque les souris sont traitées avec mHER2-TDB (Figure 66).

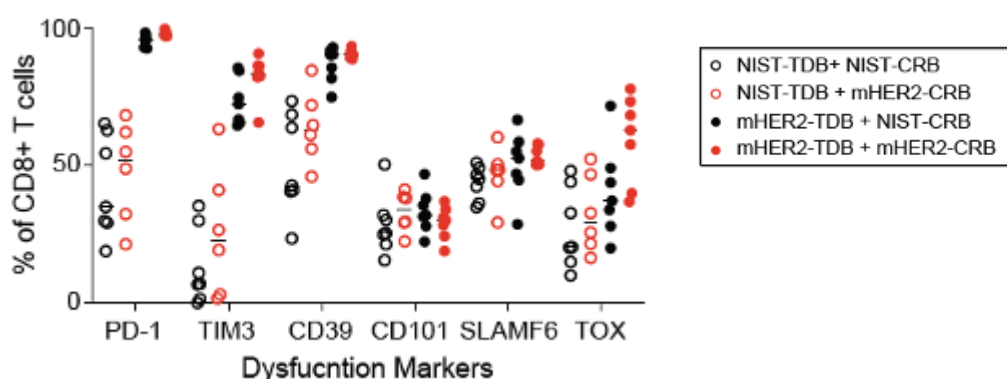


Figure 66: **Analyse de marqueurs négatifs de régulation des cellules T CD8.** Pourcentage de cellules T CD8+ exprimant des marqueurs de dysfonction des cellules T dans les souris porteuses de tumeurs Fo5 après traitement avec NIST-TDB ou mHER2-TDB en combinaison avec NIST-CRB ou mHER2-CRB

Étant donné que le syndrome de libération de cytokines est une complication avec les TDBs en clinique, il est important de noter que la production de cytokines/chemokines pro-inflammatoires dans le sérum des animaux était similaire entre les groupes mHER2-TDB et combinaison. Ces résultats montrent que mHER2-CRB n'augmente pas le risque de syndrome de libération de cytokines par rapport au traitement avec mHER2-TDB seul (Figure 67).

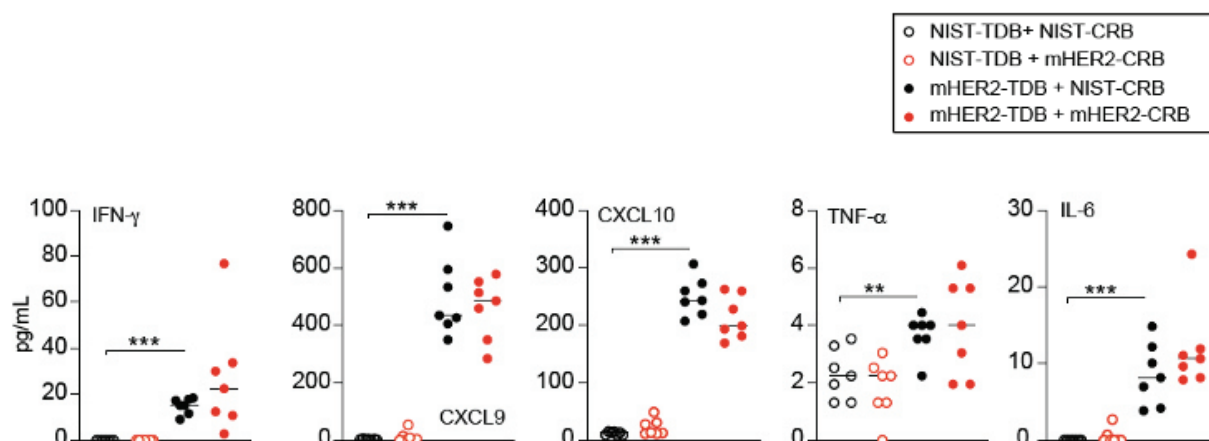


Figure 67: **Analyse d'analytes dans le sérum de souris.** Niveau des cytokines IFN- γ , CXCL9, CXCL10, TNF- α and IL-6 détectées dans le sérum des souris porteuses de tumeurs Fo5 24H après traitement avec NIST-TDB ou mHER2-TDB en combinaison avec NIST-CRB ou mHER2-CRB

L'analyse différentielle de l'expression génique sur les cellules CD8+ T triées à partir d'animaux ayant reçu le traitement combiné a montré une expression élevée de gènes d'activation cellulaire et de cytotoxicité, notamment Ccr5, Ccl5, Ifng, Prf1 et Gzmb (Figure 68).

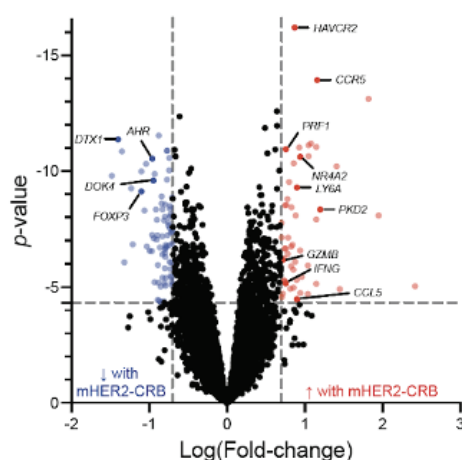


Figure 68: **Comparaison de l'expression transcriptionnelle des cellules T CD8 chez la souris fo5 traitées ou non avec mHER2-CRB.** Représentation en volcan de l'expression génique différentielle à partir de données de séquençage d'ARN en bulk des TIL CD8+ triés après traitement de souris fo5 avec mHER2-TDB en combinaison avec mHER2-CRB. Les points bleus représentent un Log(fold-change) < -0.7 et les points rouges représentent un Log(fold-change) > 0.7, avec une valeur de $p < 0.05$. Les points noirs sont en dessous du seuil de significativité

L'analyse GSEA a montré un enrichissement des voies associées aux réponses pro-inflammatoires, à la signalisation des cytokines et aux cellules T effectrices par rapport au mHER2-TDB seul. Dans l'ensemble, l'engagement de NKG2D avec un BsAb ciblant HER2 a conduit à une activité antitumorale améliorée et à une fonction effectrice des cellules CD8+ et NK renforcée lorsqu'il est combiné avec HER2-TDB *in vivo* (Figure 69).

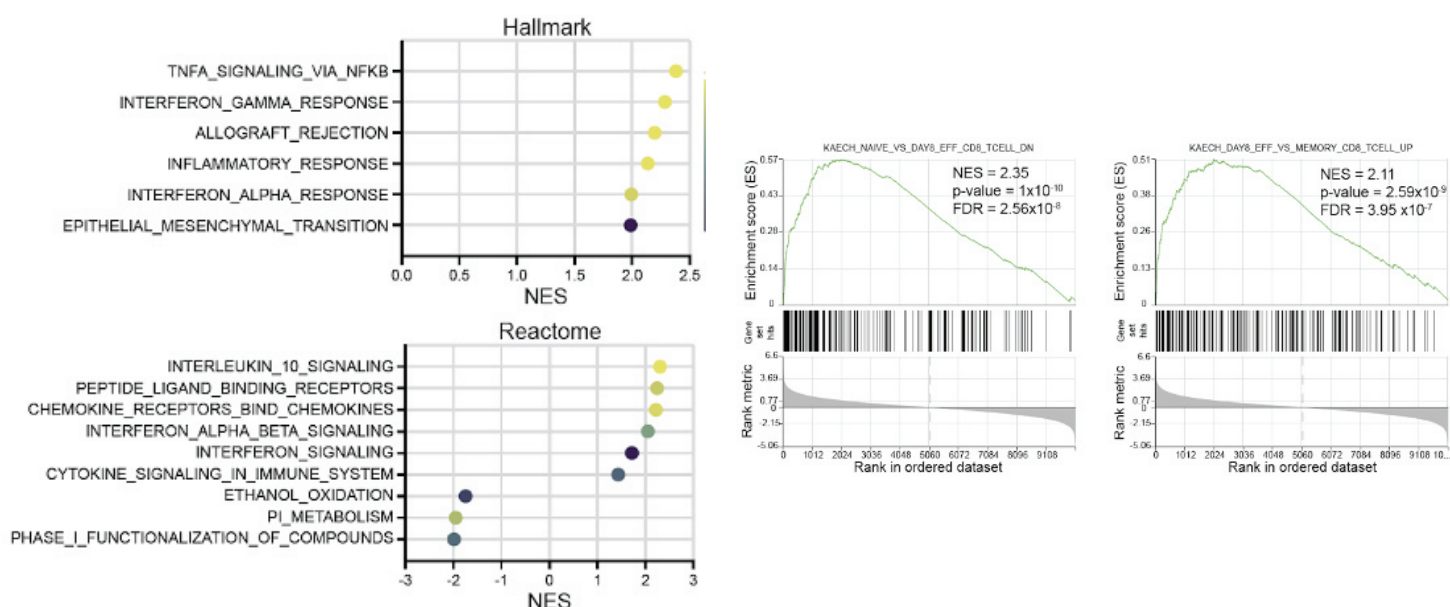


Figure 69: **Etude de l'enrichissement génique.** Données GSEA des ensembles de gènes Hallmark (en haut) et Reactome (en bas). GSEA des ensembles de gènes immunologiques à partir des données de Figure 68

En conclusion, dans cette étude, nous avons identifié NKG2D comme une cible thérapeutique en raison de son expression sur une grande proportion de lymphocytes CD8+ TILs dans les cancers du sein et de son association avec une meilleure survie des patients atteints de cancer du sein triple négatif (TNBC) traités par atezolizumab, un anticorps anti-PD-L1. Par conséquent, HER2-CRB, un anticorps bispécifique portant un bras ciblant HER2 et un bras agoniste de souris ou humain de NKG2D, a été développé. Nous avons constaté que HER2-CRB était capable de former des synapses immunologiques, d'induire la production de cytokines et d'augmenter la cytotoxicité par les cellules NK et les lymphocytes T CD8+ stimulés par TDB. Les HER2-CRB se sont révélés efficaces dans les modèles de souris humanisées et immunocompétentes en combinaison avec des TDBs et ont amélioré la fonction effectrice des NK et des lymphocytes T CD8+. Dans l'ensemble, les HER2-CRB mobilisent les NK et les lymphocytes T CD8+ conduisant à une activité antitumorale accrue et présentent un potentiel de combinaison large avec les immunothérapies.

Jusqu'à présent, les médicaments basés sur les anticorps bispécifiques ont prouvé leur efficacité clinique et ont été approuvés pour le traitement de cancers hématologiques, mais aucun anticorps bispécifique n'a encore été approuvé dans le cas de tumeurs solides. Les mécanismes de résistances sont nombreux et il est primordial d'en comprendre les mécanismes afin de cibler les cellules ou molécules qui en sont la cause. Ceci permettra d'établir des combinaisons thérapeutiques plus efficaces notamment avec les anticorps bispécifiques que nous avons développé.

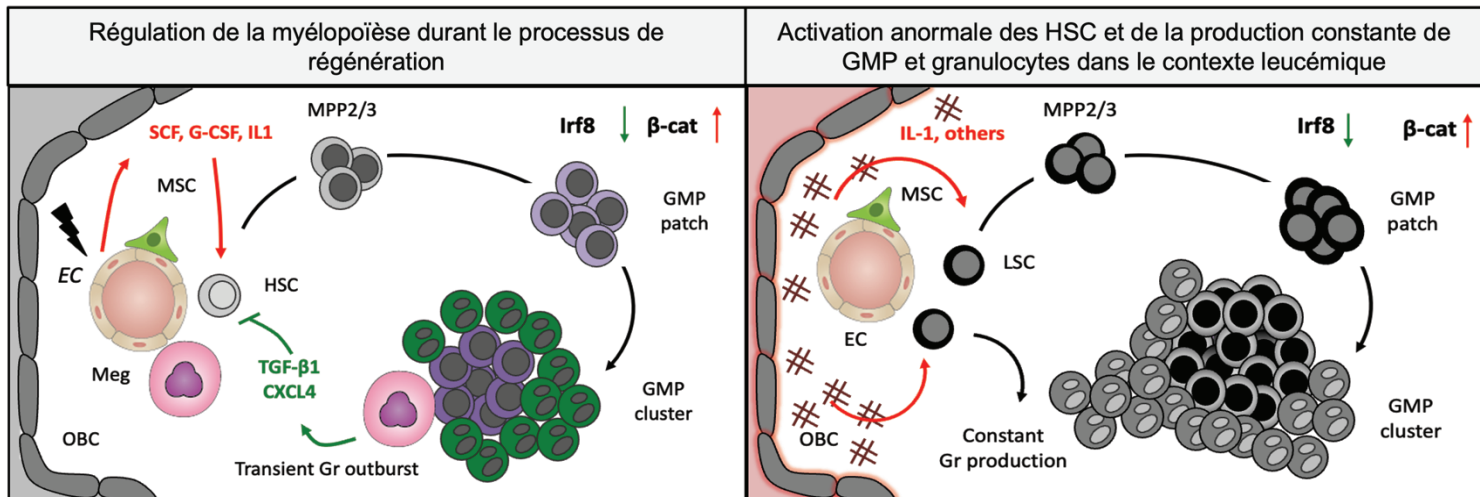
Plusieurs mécanismes de résistance ont été décrits (cf introduction) et l'un d'eux concerne la qualité des lymphocytes T infiltrants. Les TILs peuvent être dysfonctionnels en raison de la présence de cellules immunosuppressives dans le TME, comme les fibroblastes associés au cancer (CAFs), les MDSCs et les cellules Tregs. Contourner ces limitations et induire une meilleure efficacité des anticorps bispécifiques constitue dès lors un réel défi. De plus, le syndrome de libération de cytokines (CLS) est un des effets secondaires des plus problématiques pouvant entraîner la mort des patients lors de l'usage des anticorps bispécifiques, ce qui limite leur potentiel. En effet, lorsque les cellules T sont activées et commencent à tuer les cellules tumorales, elles produisent des cytokines telles que l'IFN- γ et le TNF- α . Ces cytokines, induisent à leur tour l'activation d'autres cellules immunitaires, en particulier les macrophages qui eux même produisent des cytokines inflammatoires comme l'IL-6, le TNF- α et l'IL-10, une situation pouvant évoluer vers un syndrome de CLS mettant en danger les patients. Différentes stratégies sont mises en place par les cliniciens pour limiter cet effet secondaire lors de ce type de traitement (Middelburg et al., 2021).

2. La formation de clusters de progéniteurs myéloïdes conduit à la myélopoïèse d'urgence et leucémique (Herault et al., 2017)

Résumé

Bien que la production sanguine soit bien comprise à bien des égards, l'organisation spatiale de la différenciation myéloïde au sein de la moelle osseuse reste floue. Dans cette étude, nous avons utilisé l'imagerie pour suivre le comportement des progéniteurs granulocyte/macrophage (GMP) chez les souris pendant la myélopoïèse d'urgence et leucémique. Dans des conditions normales, les GMP individuels sont dispersés dans toute la moelle osseuse. Cependant, pendant la régénération, nous avons observé que les amas de GMP en expansion se regroupent en clusters distincts, qui se différencient ensuite localement en granulocytes. La libération régulée de signaux clés de la niche de la moelle osseuse (SCF, IL-1 β , G-CSF, TGF β et CXCL4) et l'activation d'un réseau de renouvellement des progéniteurs impliquant Irf8 et β -caténine induisent la formation transitoire de ces clusters de GMP en régénération. Dans la leucémie, les clusters de GMP sont continuellement générés en raison

de l'activation persistante du réseau de renouvellement et de l'absence de cytokines de terminaison qui rétabliraient normalement la quiescence des cellules souches hématopoïétiques.



Résumé graphique : La formation de clusters de progéniteurs myéloïdes stimule la myélopoïèse d'urgence et leucémique

Les cellules myéloïdes sont souvent une cible thérapeutique afin de lever des problèmes de résistance aux traitements ou d'effets secondaires indésirables, mais aussi dans un but de ciblage local, autour et dans la tumeur. Or, Casbon et al., puis Gerber-Ferder et al., on décrit que les tumeurs du sein entraînent un remaniement à distance de la niche des cellules hématopoïétiques dans la moelle osseuse, entraînant une myélopoïèse accrue (Casbon et al., 2015; Gerber-Ferder et al., 2023). Ces travaux montrent tout l'intérêt d'étudier les mécanismes liés à la biologie des cellules souches à l'origine des cellules immunitaires et le tissu dans lequel elles sont maintenues et régulées afin de pouvoir agir de manière plus globale et non ciblée uniquement.

Les travaux qui font l'objet de la seconde partie de ma thèse montrent également un remaniement des niches de la moelle osseuse impactant directement la régulation des cellules souches hématopoïétiques et conduisant à la sur-activation de manière chronique ou transitoire de la myélopoïèse. Ces travaux ont un impact dans le contexte de la leucémie mais aussi sur les processus de régénération lors d'un traitement de chimiothérapie ou par radiothérapie. Comprendre de manière plus globale la régulation des cellules immunitaires en amont de leur activité finale dans les tumeurs solides ou lors de traitements peut aider à contrôler la maladie ainsi que les effets secondaires liés au traitement.

Ce projet a abouti à une publication dans Nature, dont je suis l'une des trois co-premiers auteurs ; il était donc important pour moi d'expliquer nos contributions respectives. Lorsque j'ai commencé mon travail dans le laboratoire du Docteur Emmanuelle Passegué à l'UCSF, Mikail Binnewies un ancien lab manager du laboratoire avait déjà mis au point une technique afin de visualiser les GMP. C'est lui qui a observé le phénotype des GMP formant des clusters de cellules dans le modèle de souris BCR/ABL. Il a ensuite rejoint un autre laboratoire pour faire sa thèse. Stephanie Leong a continué ce projet et a observé que les GMP formaient des clusters de manière transitoire lors de traitement de souris sauvages au 5-FU. J'ai ensuite continué et terminé ce projet. J'ai confirmé ce phénotype dans d'autres modèles de souris leucémiques et dans d'autres contextes de régénération. De plus, j'ai mis en évidence les mécanismes biologiques impliqués dans l'établissement de ces clusters de GMP ainsi que le rôle des cellules associées présentes dans les niches des cellules souches hématopoïétiques contrôlant ces mécanismes.

La production de sang se produit dans la moelle osseuse grâce à l'hématopoïèse, qui est initiée par un nombre relativement petit de cellules souches hématopoïétiques (HSC) quiescentes, multipotentes et auto-renouvelées, ayant la capacité unique de donner naissance à tous les différents types de cellules sanguines matures.

Les HSC sont à l'origine des populations de progéniteurs multipotentes myélocytaires (MPP). Les MPP4 sont les plus abondantes et sont orientées vers les cellules lymphoïdes. En revanche, les MPP2/3 sont une petite population comparée aux MPP4 et donnent ensuite naissance aux GMP, qui constituent un compartiment abondant, très prolifératif et donnent naissance aux macrophages et aux granulocytes (Figure 70).

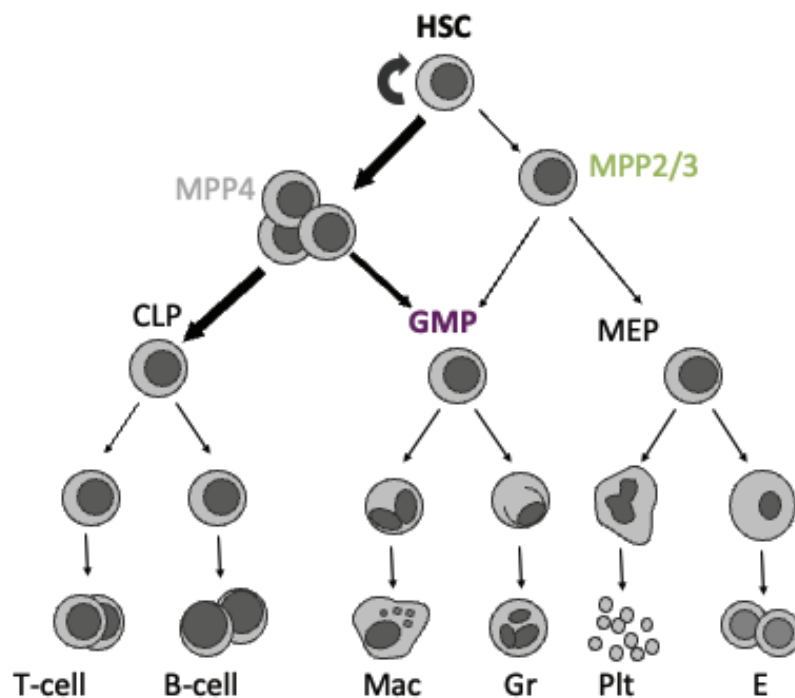


Figure 70: **Hiérarchie de l'hématopoïèse.** Les cellules sanguines sont produites à partir des cellules souches hématopoïétiques qui sont multipotentes et capables de s'auto-renouveler dans la moelle osseuse. Elles se différencient en cellules progénitrices multipotentes MPP4 ou MPP3, qui eux même se différencient en cellules progénitrices lymphoïdes, CLP (Common Lymphoid progenitor), GMP (Granulocyte Macrophage Progenitor) ou MEP (Megacaryocyte, Erythrocyte Progenitor). Les étapes de différenciations successives lors de l'hématopoïèse conduisent à la formation des cellules matures ; les cellules T (T-cell), cellules B (B-cell), Mac (macrophage), Gr (granulocyte), Plt (plaquette), E (globule rouge)

L'hématopoïèse est très dynamique. Nous nous sommes concentrés sur la branche des cellules myéloïdes de l'hématopoïèse. Eric Pietras, un ancien post-doctorant, a montré que lors de la régénération après transplantation à partir des HSC, le compartiment MPP2/3 est élargi, entraînant une augmentation de GMP conduisant à une explosion de granulocytes. Ce phénotype est transitoire pendant la régénération, lors de la transplantation des HSC (Pietras et al., 2015). Damien Reynaud, également ancien post-doctorant du laboratoire, a observé le même phénotype dans la leucémie ; mais au lieu d'être transitoire comme lors de la régénération de la moelle osseuse, cette prolifération permet une production constante des populations de MPP-GMP et de granulocytes. Cela a été observé dans l'un de nos modèles leucémiques, le modèle murin BCR-ABL (Reynaud et al., 2011) (Figure 71).

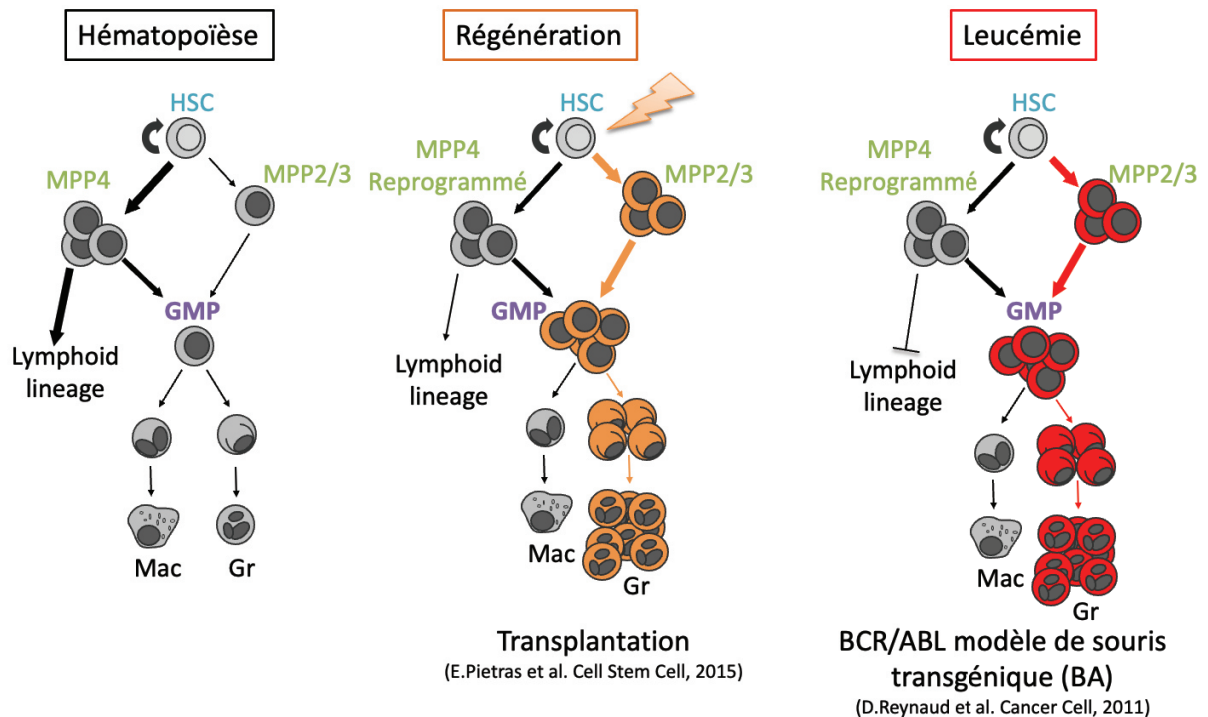


Figure 71: **Dérégulation de l'hématopoïèse pendant la régénération et la leucémie**

Les approches de microscopie ont permis de mieux comprendre le maintien et la régulation des HSC dans les niches de la moelle osseuse. La maintenance des HSC dans la moelle osseuse est assurée par leur proximité avec les mégacaryocytes, qui produisent TGF- β 1 et CXCL4, maintenant ainsi les HSC en état de quiescence. En revanche, les HSC se différencient et prolifèrent lorsqu'elles se trouvent près des artéioles associées aux cellules souches mésenchymateuses, lesquelles produisent des cytokines telles que le SCF (stem cell factor) et le G-CSF (granulocyte colony stimulating factor) (Bruns et al., 2014; Mendez-Ferrer et al., 2010; Mitroulis et al., 2020). De plus, les macrophages produisent du G-CSF, ce qui induit la prolifération et la différenciation des HSC (Figure 72).

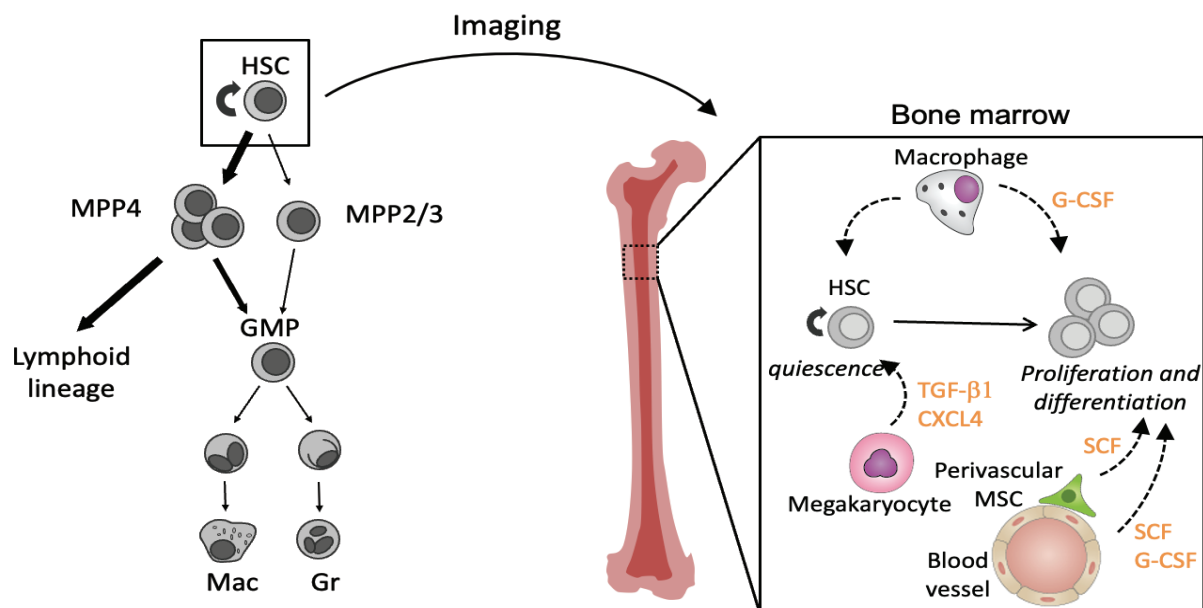


Figure 72: **Maintenance des cellules souches hématopoïétiques dans la moelle osseuse.** Les HSC sont maintenues à l'état de quiescence grâce à leur proximité avec les mégacaryocytes produisant TGF- β 1 et CXCL4. En revanche, elles se différencient et prolifèrent lorsqu'elles sont à proximité des vaisseaux sanguins et des cellules souches mésenchymateuses produisant des cytokines telles que le SCF et G-CSF. Les macrophages produisent aussi du G-CSF induisant la prolifération et la différenciation des HSC

Cependant, rien n'était connu sur le comportement spatial des progéniteurs myéloïdes dans la cavité de la moelle osseuse. C'est pourquoi nous nous sommes concentrés sur les GMP en utilisant des approches microscopiques.

1.1. Identification des clusters de GMP *in situ* par microscopie

Après section des os des pattes de souris pour exposer la moelle osseuse, Mikail Binnewies a établi un protocole de marquage d'immunofluorescence (IF), basé sur les marqueurs de surface généralement utilisés pour les techniques de cytométrie en flux (lignée négative (CD3, CD4, CD5, CD8, B220, Ter119, Mac-1 and Gr-1), CD150 négatif Sca-1 négatif, c-kit positif and FcγR positif) afin d'observer de manière spécifique les GMP sur les populations isolées (Figure 73) et dans la moelle osseuse (MO) (Figure 74).

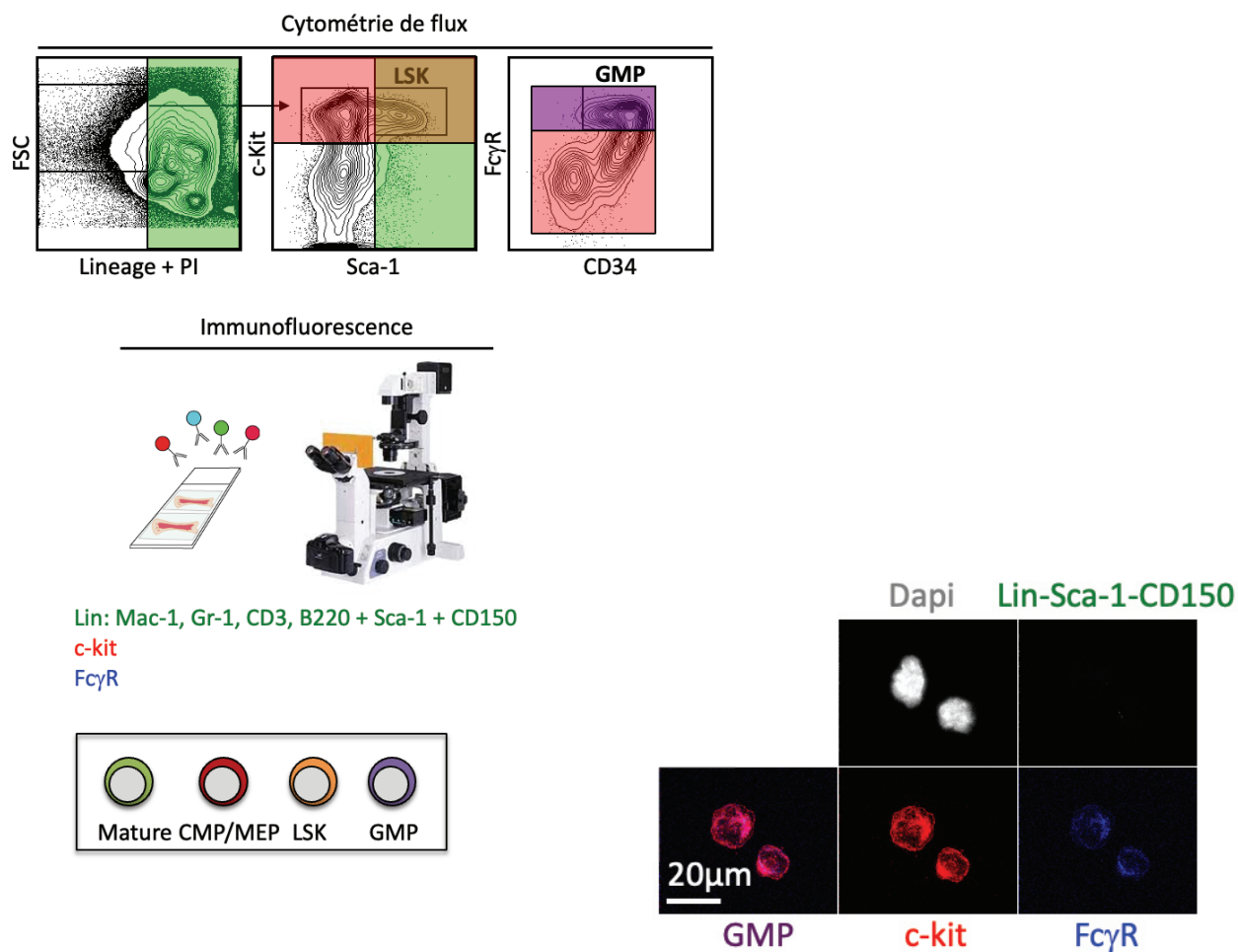


Figure 73: **Stratégie de sélection par FACS pour identifier les GMPs.** Les GMP sont positifs pour ckit et FcγR et négatif pour Lin/Sca-1/CD150. Validation de la stratégie d'identification des GMP par microscopie (à droite) sur des GMP isolés par immunofluorescence. La superposition du marquage c-kit (rouge) et FcγR (bleu) donne la couleur violette des GMP par imagerie

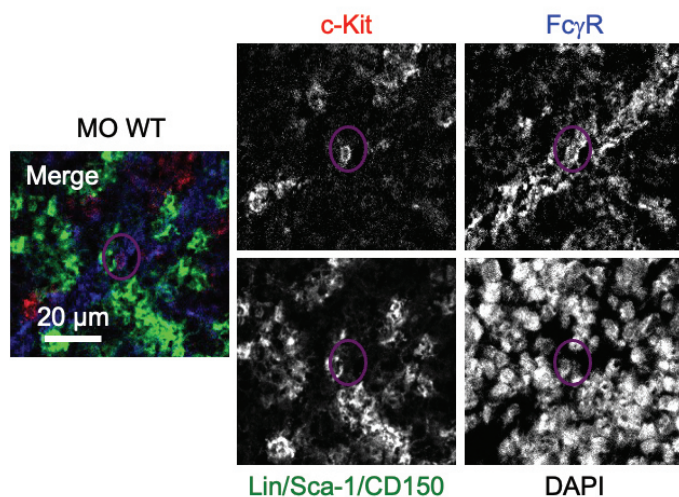


Figure 74: **Identification de GMP par immunofluorescence dans la moelle osseuse** (violet) sur des sections d'os de souris sauvage. Les GMP sont positifs pour ckit et FcγR et négatif pour Lin/Sca-1/CD150. La combinaison de c-kit (rouge) et FcγR (bleu) donne la couleur violette des GMP par microscopie

1.2. Observation de GMP formant des clusters durant la leucémie

Chez les souris sauvages, les GMPs sont dispersés dans la cavité de la moelle osseuse sans distribution particulière par rapport à l'endosteum osseux, aux régions trabéculaires ou à la moelle centrale, et sont généralement identifiés comme des cellules individuelles mêlées à d'autres populations hématopoïétiques. En revanche, dans les modèles de néoplasmes myéloprolifératifs (MPN) de souris tels que *Scl-tTA::TRE-BCR/ABL* (BA) et *junBflox/flox::MORE-cre* (jB), la plupart des GMPs sont trouvés sous forme de grands amas compacts entourés de cellules matures granulocytaires (Figure 75 et Figure 76).

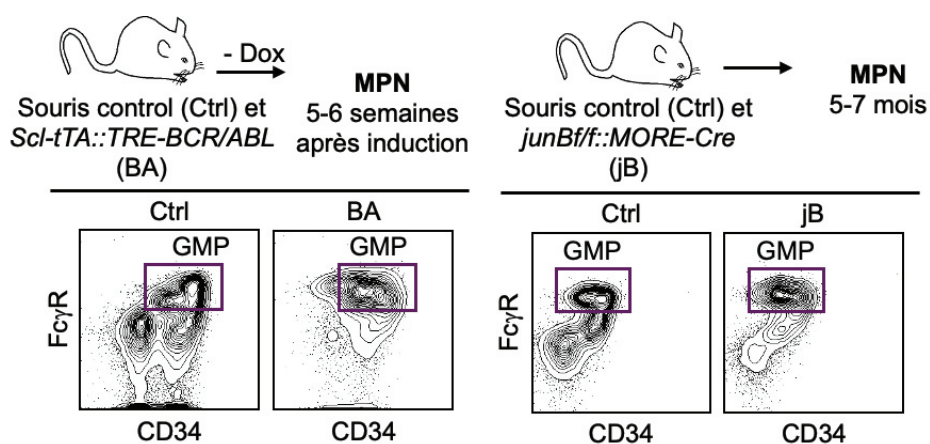


Figure 75: **Modèles génétiques de néoplasmes myéloprolifératifs**, modes d'induction et identification des population de GMP par cytométrie en flux dans ces modèles

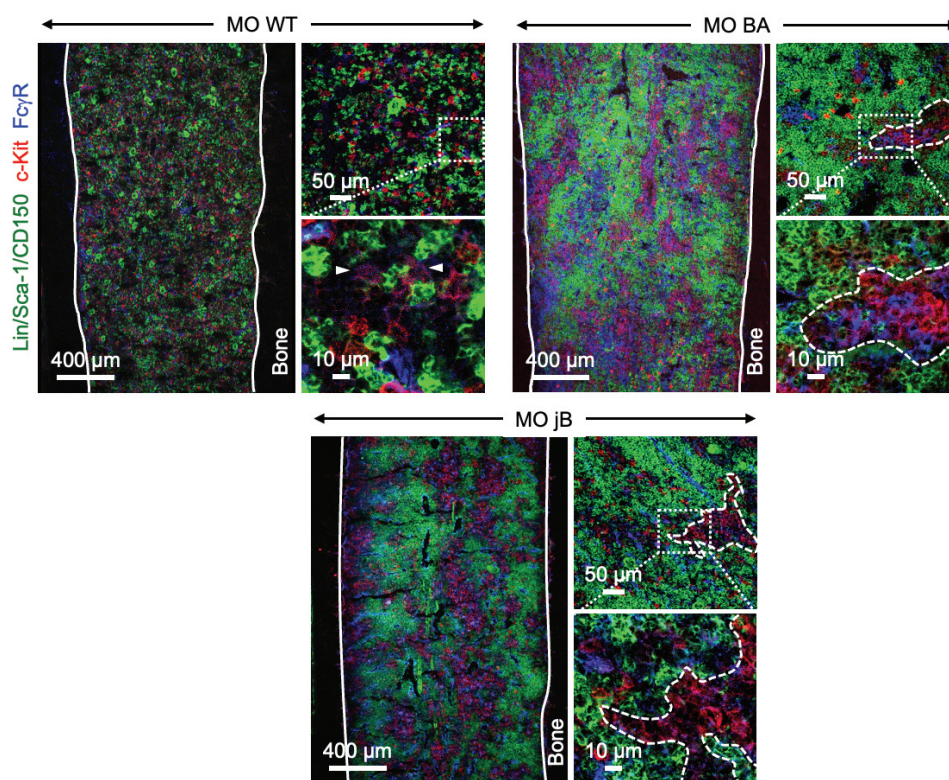


Figure 76: **Images d'immunofluorescence représentatives de GMPs** (violet) dans la moelle osseuse de souris sauvage (WT) et de souris atteintes de MPN (BA et jB). Les lignes pleines indiquent la surface osseuse, les lignes en pointillés représentent les GMPs formant des amas et les flèches indiquent les GMPs individuels.

Nous avons défini les pGMPs comme la collection de plus de 4 GMPs associés de manière lâche, qui pouvaient également être observés occasionnellement à l'état stable chez les souris de type sauvage, et les avons distingués des cGMPs par le fait qu'ils n'étaient pas étroitement entourés par des cellules matures granulocytaires (Figure 77).

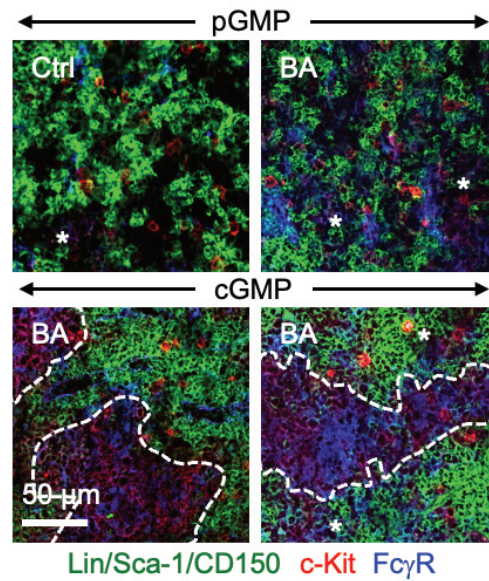


Figure 77: **Définition des pGMP et des cGMP** en fonction de leur nombre et organisation dans la moelle osseuse

Des caractéristiques similaires ont été observées dans le modèle de leucémie myéloïde aigüe (AML) dans lequel les souris receveuses développent une AML après la transplantation de cellules dérivées de LSK transduites par MLL-AF9 (MF9), avec des structures allant de pGMPs à cGMPs (Figure 78).

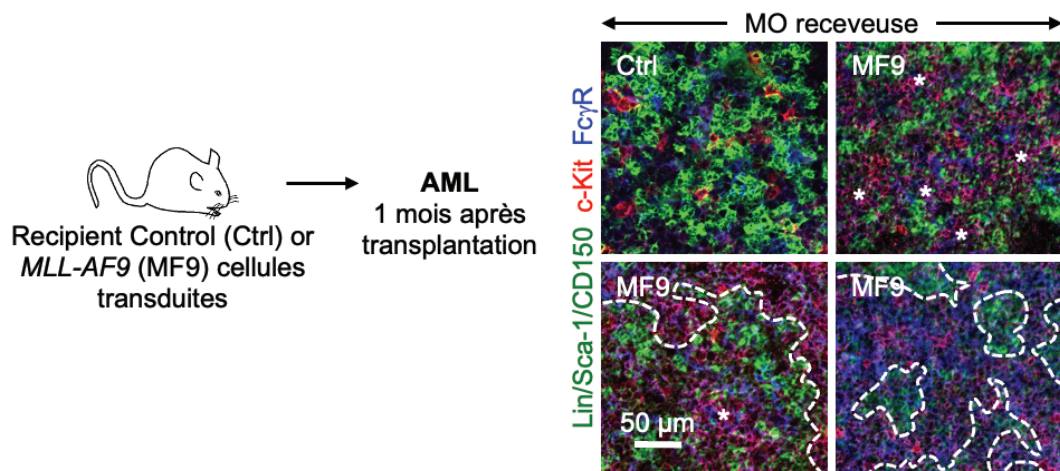


Figure 78: **Description du modèle de souris MF9** et images représentatives d'immunofluorescence des GMPs (en violet) dans la moelle osseuse de souris receveuses contrôles et malades (MF9)

En utilisant une version simplifiée de ce schéma d'immunofluorescence, nous avons étudié si la formation de cGMPs était associée à une réorganisation majeure du microenvironnement de la moelle osseuse, mais nous n'avons trouvé aucun changement évident dans le réseau de vaisseaux sanguins, le niveau d'hypoxie ou le dépôt de la matrice extracellulaire, à l'exception du collagène IV connu pour être présent dans les souris BA fibrotique (Figure 79).

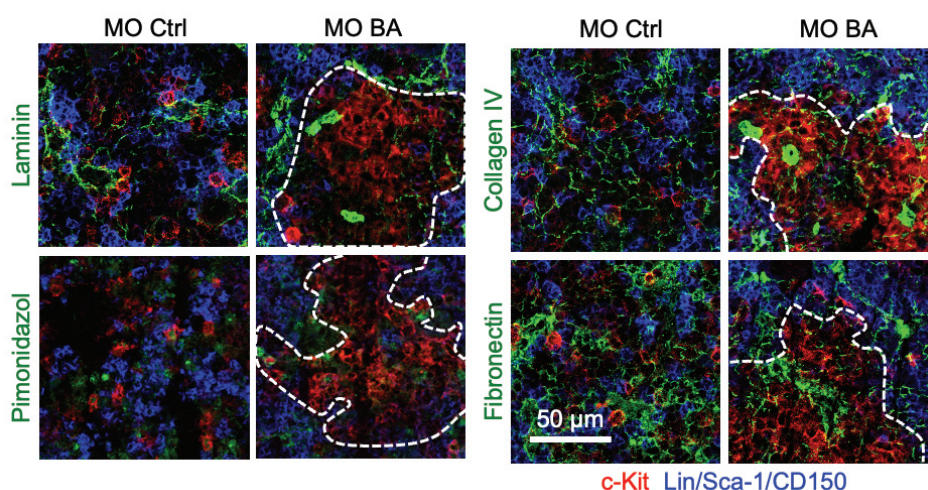


Figure 79: **Organisation des progéniteurs myéloïdes en fonction du stroma.** Immunofluorescence des progéniteurs myéloïdes (rouge) par rapport aux caractéristiques stromales indiquées (vert) dans la moelle osseuse de souris BA contrôles et malades.

Nous avons également localisé les populations matures par rapport aux cGMPs, et bien que certaines cellules lymphoïdes aient été détectées à l'intérieur et à la périphérie des cGMPs, les cellules myéloïdes n'ont été trouvées qu'étroitement autour des cGMPs (Figure 80).

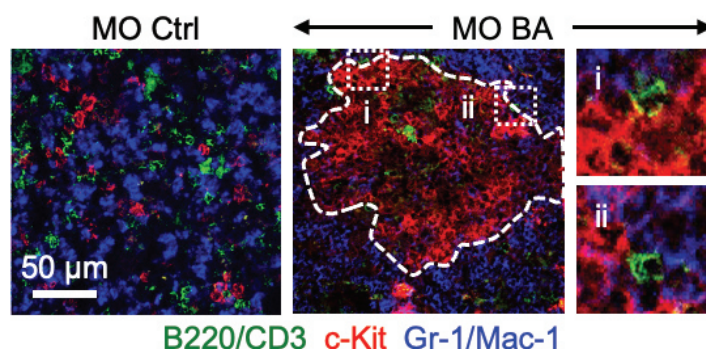


Figure 80: **Comparaison des progéniteurs myéloïdes et lymphoïdes dans la moelle osseuse.** Immunofluorescence montrant les progéniteurs myéloïdes (rouge) par rapport aux cellules lymphoïdes (vert) et myéloïdes (bleu) matures dans la MO de souris BA contrôles et malades. Les lignes orange indiquent le centre germinatif ; les pointes de flèche représentent les GMPs individuels ; les étoiles indiquent les pGMPs et les lignes en pointillés représentent les cGMPs

Ces résultats indiquent que la myélopoïèse leucémique est caractérisée par la présence de cGMPs, faisant partie d'un continuum de différenciation séparant les progéniteurs des cellules myéloïdes matures.

1.3. Les cGMPs sont une caractéristique de l'expansion myélocytaire

Pour déterminer si les cGMPs pouvaient être détectés lors de la myélopoïèse d'urgence, nous avons utilisé plusieurs modèles de régénération myéloïde ou de production active de cellules myéloïdes.

Tout d'abord, des souris sauvages ont été injectées une fois avec du 5-fluorouracile (5-FU ; 150 mg kg⁻¹). Le 5-FU est utilisé en chimiothérapie et induit la mort des cellules en prolifération. Le traitement des souris avec cet agent nous a donc permis de suivre la régénération des cellules immunitaires au fil du temps. Après traitement au 5-FU, les cellules myélocyaires décroissent drastiquement puis réapparaissent deux semaines après traitement au 5-FU. Les analyses de cytométrie en flux ont montré des résultats similaires mais une cinétique plus rapide dans la moelle osseuse puisque les cellules matures granulocytaires ainsi que les GMP diminuent après le traitement au 5-FU et sont à nouveau produit massivement dix jours après traitement. Enfin, la production de ces dernières coïncide avec la production de cellules souches et progénitrices avec un biais de production de cellules myéloïdes (HSC et MPP2/3 résultats non présentés) reflétée par une augmentation du nombre de cellules immatures Lin-c-Kit+Sca-1+ (LSK) dès le jour 10 (Figure 81).

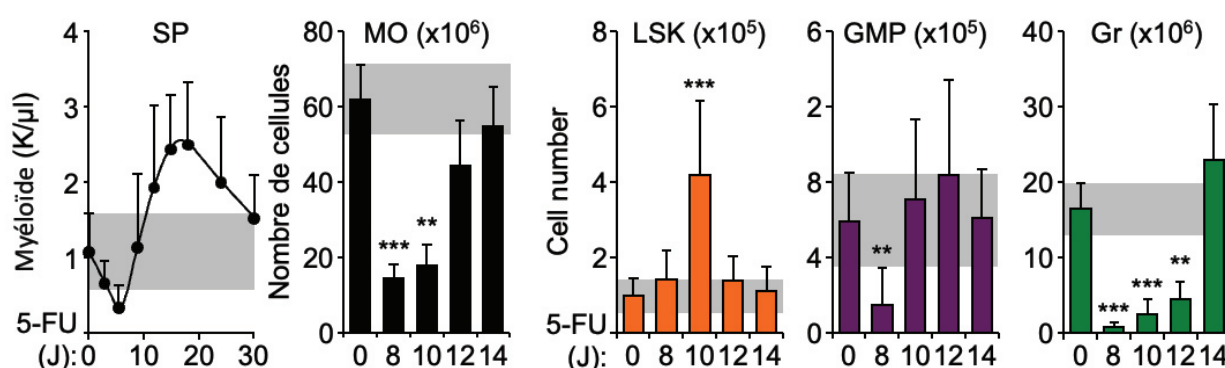


Figure 81: **Suivi des populations hématopoïétiques dans le sang périphérique (SP) et la moelle osseuse durant la régénération** aux jours indiqués après le traitement au 5-FU dans les souris sauvages par FACS. J, Jour; Gr, granulocytes

En utilisant la technique de l'immunofluorescence sur la moelle osseuse traitée au 5-FU, nous avons montré la présence rare de GMPs au jour 8, suivie de l'apparition de pGMPs au jour 8,5, qui ont rapidement augmenté en taille jusqu'au jour 10 où les premières cGMPs ont été observées. Au jour 12, nous n'avons trouvé que des cGMPs, particulièrement le long de l'endosteum osseux, qui avaient ensuite complètement disparu au jour 14 lors de la restauration des granulocytes (Figure 82).

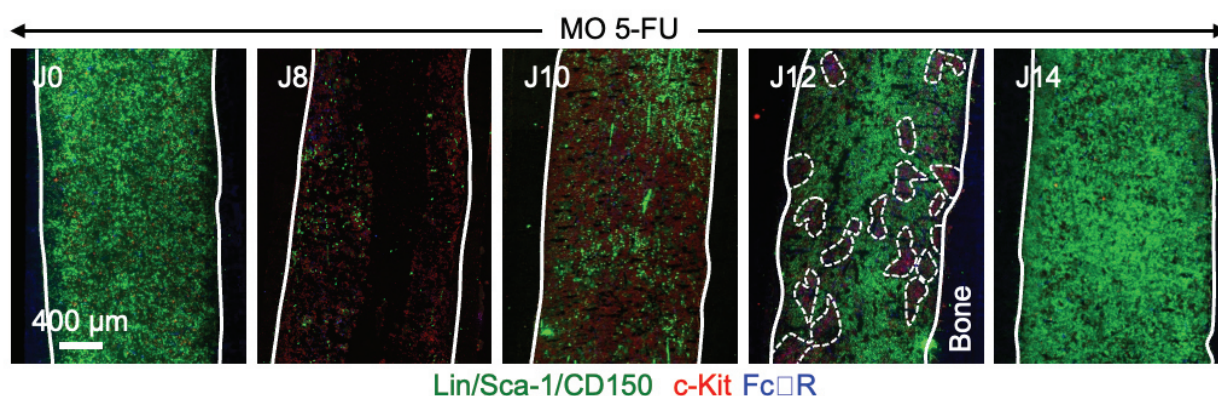


Figure 82: **GMP dans la moelle osseuse après traitement au 5-FU.** Représentation d'immunofluorescence montrant les GMPs (violet) dans la moelle osseuse de souris traitées au 5-FU aux jours indiqués après le traitement. À noter que des cGMPs ont été observés dans tous les os examinés (c'est-à-dire, fémur, tibia, humérus et sternum) au jour 12 après le traitement au 5-FU

De manière surprenante, nous avons observé une formation transitoire similaire de cGMPs chez des souris de type sauvage injectées une fois avec un anticorps Ly-6G (0,1 mg par souris) pour éliminer spécifiquement les granulocytes, ou quotidiennement avec du G-CSF (5μg par souris) pour augmenter la production de granulocytes (Figure 83). Cette formation transitoire de cGMPs lors du pic de régénération myéloïde a aussi été observé après une transplantation de HSC dans des souris sauvages précédemment irradiées. Ces résultats montrent que la formation des cGMPs est un phénomène commun retrouvé dans les situations de régénération de moelle osseuse.

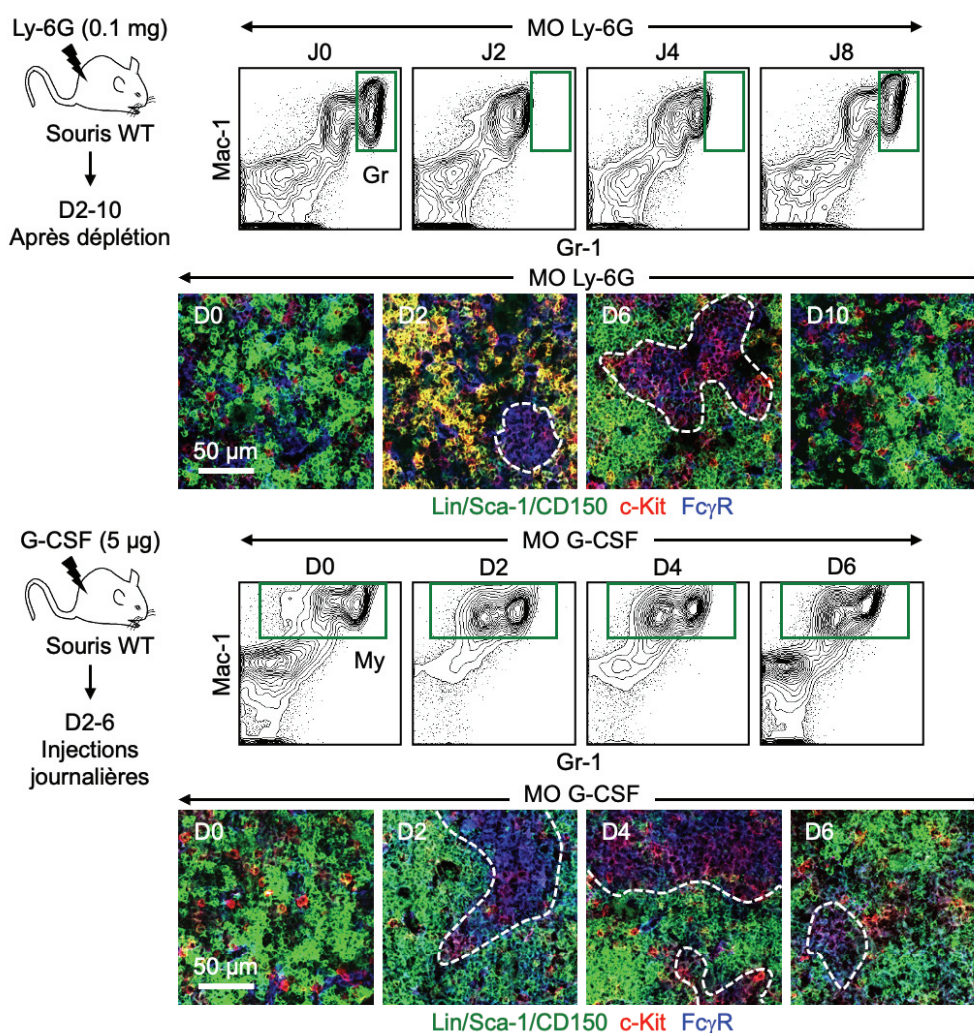


Figure 83: **Schéma expérimental, stratégie de sélection des GMP par FACS et immunofluorescence des GMP (violet) dans la moelle osseuse après traitement des souris sauvages avec Ly-6G et G-CSF aux jours indiqués**

De plus, nous avons démontré que les cGMPs étaient principalement clonales et composées de GMPs dérivés de HSC individuelles subissant une myélopoïèse régénératrice ou leucémique (résultats non présentés).

Dans l'ensemble, ces résultats indiquent que la formation transitoire de cGMPs est une caractéristique essentielle de la myélopoïèse d'urgence.

1.4. cGMPs sont des foyers de différenciation myélocytaire

Pour comprendre les mécanismes de formation des cGMPs, nous avons mené des analyses détaillées du cycle cellulaire en injectant du BrdU ou de l'EdU dans des souris sauvages traitées au 5-FU. Nous avons observé que l'incorporation de BrdU dans les cellules LSK a culminé au jour 8 puis est progressivement revenue à des niveaux stables au jour 12.

Dans les GMPs, l'incorporation de BrdU a d'abord augmenté au jour 8, au début de la formation des pGMPs, puis est tombée en dessous des niveaux physiologiques entre les jours 10 et 12 lorsque les pGMPs se sont transformés en cGMPs, avant de revenir à des niveaux physiologiques au jour 14 lorsque les cGMPs avaient disparu (Figure 84). Des résultats similaires ont été observés par microscopie confirmant la cinétique de différenciation des GMP (résultats non présentés).

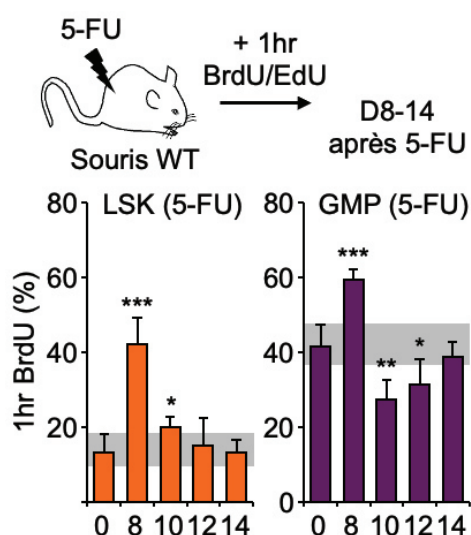


Figure 84: **Cinétique de prolifération des GMP et LSK après traitement au 5-FU.** Prolifération chez les souris sauvages traitées au 5-FU montrant le schéma expérimental et l'incorporation de BrdU/EdU dans les cellules LSK et les GMPs aux jours indiqués

Des analyses clonogéniques monocellulaires utilisant de la méthylcellulose des GMPs isolés de souris de type sauvage et traités au 5-FU ont confirmé un changement dans le potentiel de différenciation associé à la formation des cGMPs. En effet, nous avons observé une efficacité de culture accrue et des colonies immatures de granulocytes/macrophages aux jours 8 à 10, suivis par une restauration de la fréquence faible des granulocytes/macrophages et une perte significative de colonies de macrophages aux jours 12 à 14 (Figure 85).

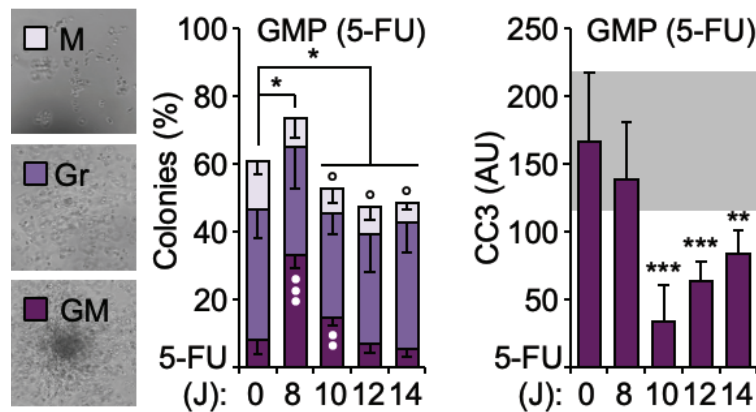


Figure 85: **Analyses monocellulaires clonogéniques des GMPs isolés de souris sauvages traitées au 5-FU** utilisant la méthylcellulose. Les résultats sont exprimés en pourcentage pour chaque type de colonie (les astérisques indiquent la signification par rapport à l'efficacité de la culture au jour 0 ; les cercles pleins par rapport aux colonies de granulocytes/macrophages ; les cercles ouverts par rapport aux colonies de macrophages). Les photos de colonies montrent comment sont définies les colonies (GM, granulocytes/macrophages ; M, macrophages).

Dans l'ensemble, ces résultats révèlent des changements complexes dans le comportement cellulaire des GMPs associés à la formation de clusters, avec une prolifération accrue et une immaturité dans les pGMPs en expansion qui forment les cGMPs, suivis par un blocage net de la prolifération et une restauration du potentiel de différenciation dans les cGMPs qui se divisent pour produire des granulocytes matures. De plus, les cGMPs ont la caractéristique d'être des foyers de différenciation qui semblent être conservés lors de la myélopoïèse leucémique.

1.5. Re-programmation moléculaire des cGMPs

Pour mieux comprendre le mécanisme moléculaire contrôlant la formation des cGMPs, nous avons étudié des pools de 100 GMPs isolés de souris sauvages traitées au 5-FU en utilisant un ensemble d'arrays ciblés par PCR quantitative (qRT-PCR) avec la méthode de Fluidigm. Les analyses des composantes principales et d'incorporation stochastique de voisinage t-distribué (tSNE) des 59 gènes les plus robustement exprimés ont révélé deux groupes distincts, avec des échantillons du jour 8 et la plupart des échantillons du jour 10 (groupe I) clairement séparés des échantillons du jour 0 et des jours 12 à 14 (groupe II) (Figure 86).

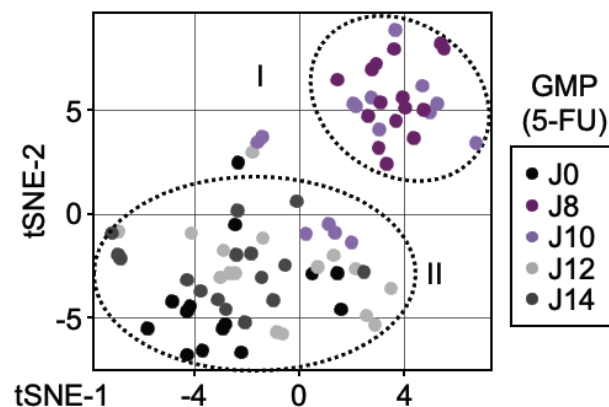


Figure 86: **Analyses tSNE des données d'expression génique de Fluidigm** à partir de GMP isolés de souris sauvages traitées par 5-FU aux jours indiqués (n=2; 10 à 16 pools de 100 cellules par condition)

L'examen des gènes individuels a mis en évidence une signature de cycle cellulaire activé et d'immaturité moléculaire élevée dans les pGMPs en expansion, ce qui se traduit par une augmentation de l'expression des gènes *Ccnd1*, *Ccne1* et *Hoxa9* (groupe I), à l'inverse des cGMPs en différenciation montrant une augmentation de l'expression d'*Irf8*, *Csf1r* et *Il6ra* (groupe II) (Figure 87).

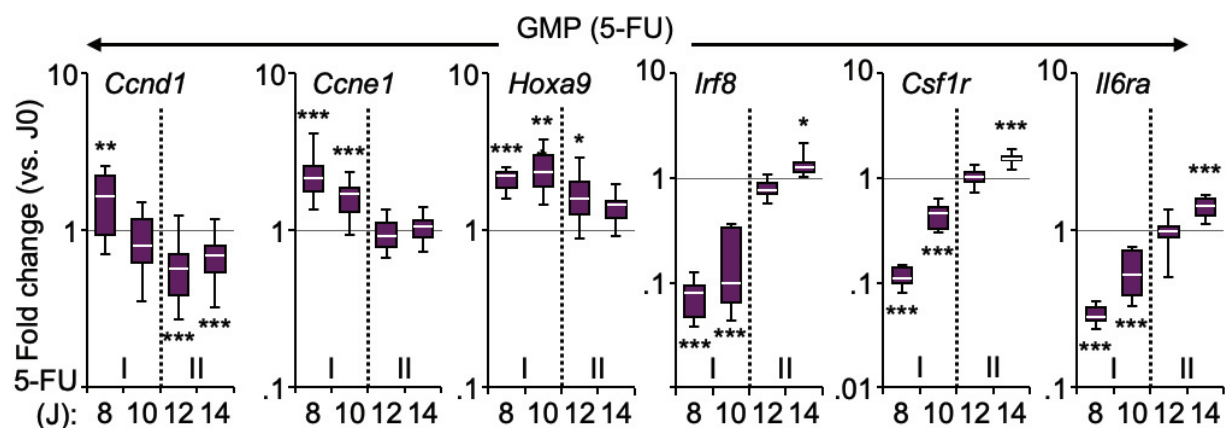


Figure 87: **Sélection de gènes à partir des analyses Fluidigm.** Les résultats sont exprimés en fold change par rapport au niveau d'expression des gènes dans les GMPs au jour 0 et présentés sous forme de boîtes à moustaches (ligne : médiane ; boîte : vingt-cinquième et soixante-quinzième percentiles ; moustache : dixième et quatre-vingt-dixième percentiles)

Afin de valider les résultats obtenus nous avons suivi l'expression de M-CSFR (Csf1r) dans les GMP de la moelle osseuse après traitement au 5-FU d'une souris exprimant un rapporteur Csf1r-Gfp (Sasmono et al., 2003). Les résultats ont confirmé les résultats d'expression obtenus par Fluidigm avec une diminution de l'expression de M-CSFR dans les GMP aux jours 8 et 10 et une augmentation aux jours 12 et 14 par rapport au jour 0 (Figure 88).

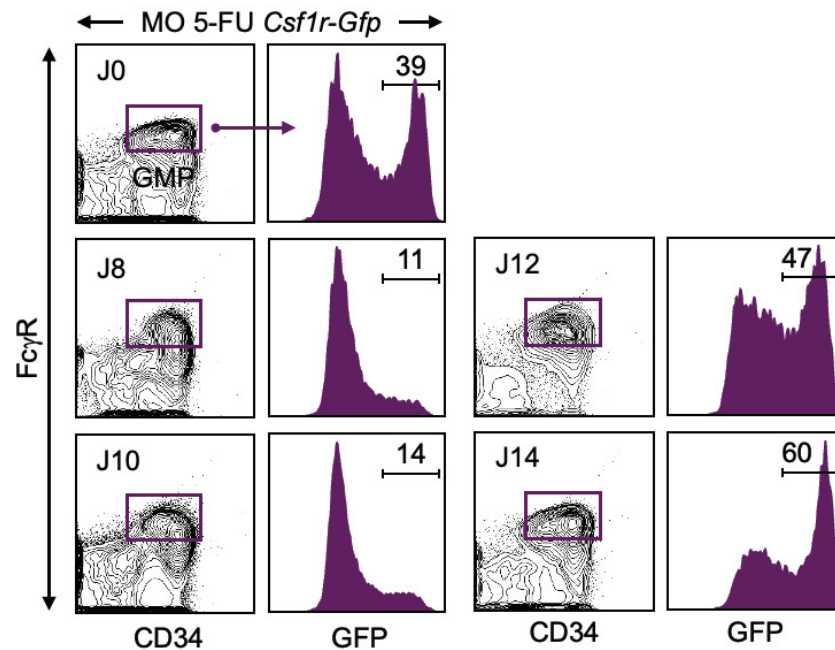


Figure 88: **Résultats d'analyses d'expression de M-CSFR** par FACS dans les GMP de moelle osseuse de souris reporter Csf1r-Gfp traitées par 5-FU aux jours indiqués après le traitement

Des investigations similaires avec des GMPs leucémiques ont révélé une signature moléculaire des pGMPs en expansion dans les GMPs des souris BA et jB, avec une expression accrue de Ccne1 et des niveaux diminués de Irf8, Csf1r et Il6ra (Figure 89).

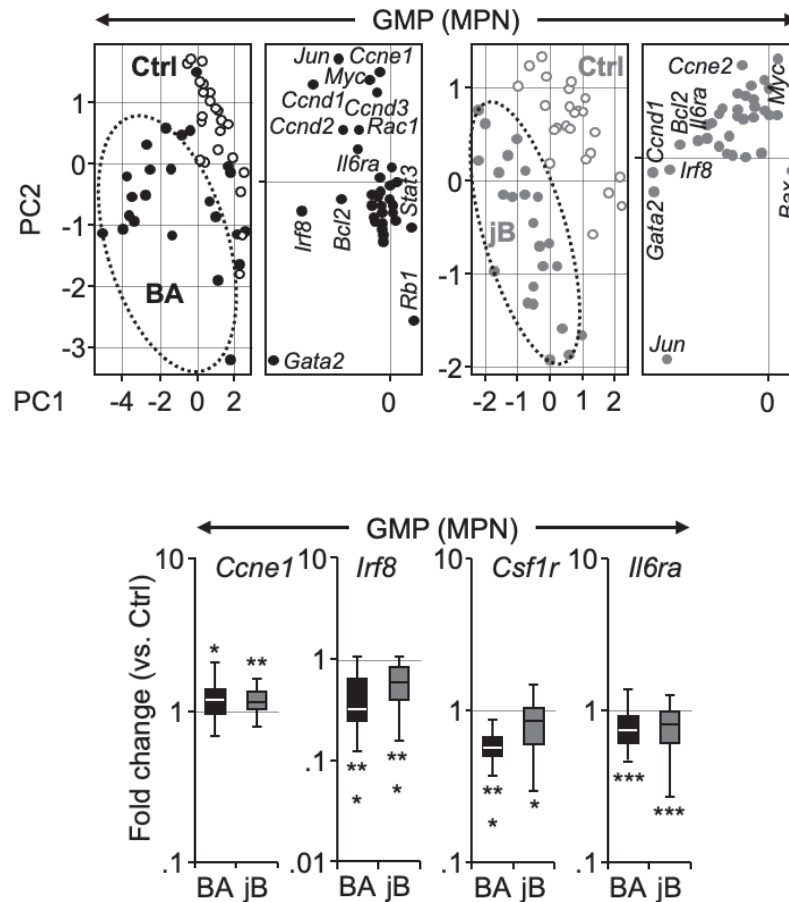


Figure 89: **Analyses tSNE et de gènes sélectionnés à partir des données d'expression génique** par Fluidigm des GMP isolées de souris BA, jB et des souris témoins r appariées selon l'âge (n=4; 22 à 28 pools de 100 cellules par condition)

Pour étudier les changements transcriptionnels globaux, nous avons également réalisé un séquençage d'ARN à cellule unique sur des GMPs isolés de souris sauvages traitées au 5-FU, et de souris BA et témoins appariés par âge. L'analyse des composantes principales et le regroupement hiérarchique de tous les GMPs individuels ont également montré deux principaux groupes (Figure 90). Remarquablement, les GMPs du jour 0 et du contrôle ont montré une expression élevée des gènes du groupe II définis précédemment et qui reflétaient des GMPs à l'état stable (SS), tandis que les GMPs traitées au 5-FU du jour 8 et les GMPs BA se caractérisent par l'expression des gènes du groupe I et coïncident avec des GMPs auto-renouvelants (SR). L'allocation à chaque groupe de tous les GMPs individuels à travers la cinétique du 5-FU et dans les souris BA a montré la présence de 8,5 à 13,5% de GMPs auto-renouvelants à l'état stable, et la persistance d'environ 15% de GMPs à l'état stable au jour 8 et au pic des pGMPs auto-renouvelants (Figure 90).

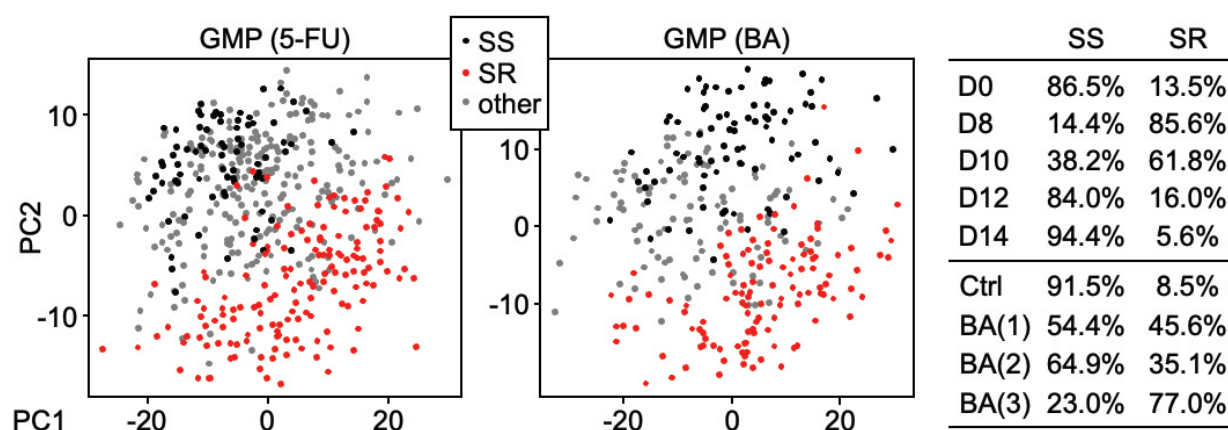


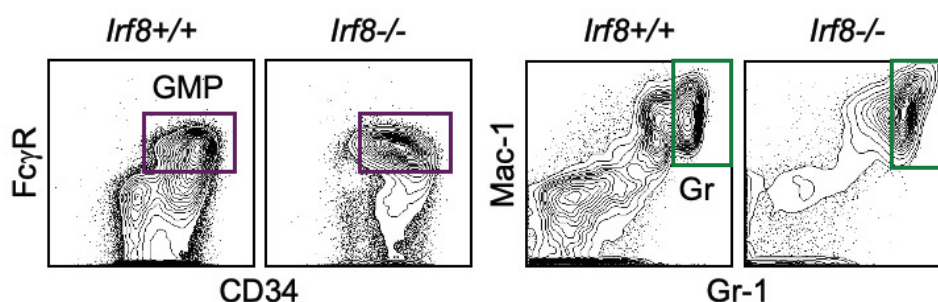
Figure 90: **Analyses des composantes principales (PC) des données de séquençage ARN à cellule unique** provenant de GMP isolées de souris sauvages traitées à l'aide de 5-FU (476 cellules uniques) et de souris BA (306 cellules uniques). A droite est représentée la fréquence des GMP à l'état stable (ssGMP) et des GMP auto-renouvelants (srGMP) chez les souris sauvages traitées à l'aide de 5-FU, ainsi que chez les souris témoins et les souris BA.

Tous ces résultats révèlent une reprogrammation moléculaire considérable pendant la formation des cGMPs, caractérisée par une activation du cycle cellulaire et la suppression des voies de maturation dans les pGMPs en expansion, suivie par un blocage du cycle cellulaire et la réactivation des voies de maturation dans les cGMPs en différenciation. Ils indiquent également que les GMPs leucémiques sont moléculairement prédisposés à la formation de cGMPs. De plus, ils démontrent la coexistence de GMPs à l'état stable et auto-renouvelants distincts dans des contextes normaux et leucémiques, dans des proportions qui reflètent l'état d'activation de la myélopoïèse d'urgence.

1.6. Réseau d'auto-renouvellement des GMPs

Afin de continuer à valider et comprendre les mécanismes biologiques liés à la caractérisation des GMPs lors de la formation de cluster durant la régénération et la leucémie, nous avons examiné la fonction du facteur de transcription clé de la lignée myéloïde, Irf8 (Tamura et al., 2015). Les souris Irf8^{-/-} sont immunodéficientes et développent une néoplasie myéloproliférative autour de 20 semaines d'âge (Holtzschke et al., 1996). Ces souris ont une augmentation de GMP dans la moelle osseuse et tout comme pour les souris BA et jB, nous avons observé une formation constitutive des cGMPs dans la MO des souris Irf8^{-/-} primaires ou transplantées (Figure 91), démontrant ainsi que la diminution de l'expression de Irf8 est suffisante pour entraîner la formation des cGMPs.

A



B

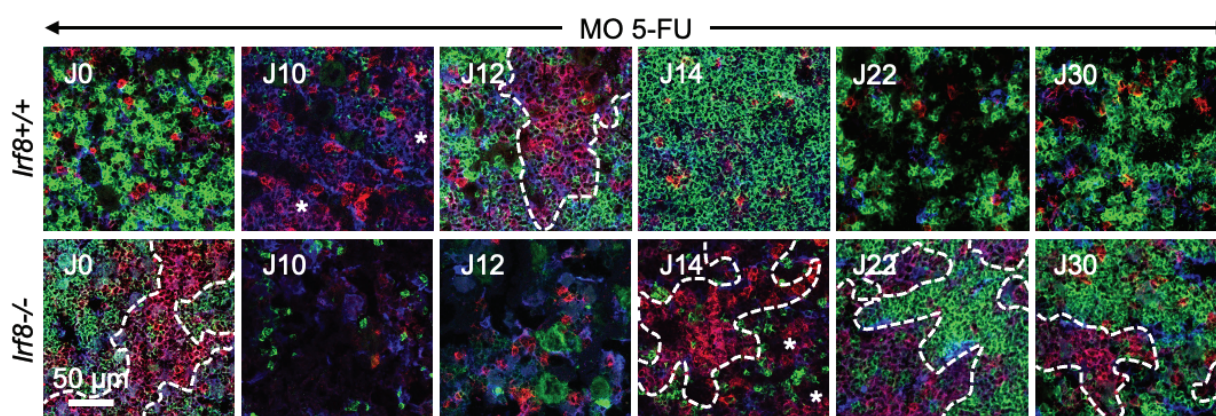


Figure 91: **Analyse des GMP dans les souris transgéniques *Lrf8*^{-/-} après traitement au 5-FU.** A. Analyse par cytométrie en flux de la fréquence des GMP et des granulocytes dans la moelle osseuse des souris *Lrf8*^{+/+} et *Lrf8*^{-/-}. B. Visualisation par immunofluorescence des GMP (violet) dans la moelle osseuse de souris *Lrf8*^{+/+} et *Lrf8*^{-/-} traitées au 5-FU aux jours indiqués

Nous avons également observé un retard dans la formation des cGMPs chez les souris *Lrf8*^{-/-} primaires et transplantées traitées au 5-FU, ce qui indique que la restauration de l'expression de *Lrf8* est essentielle pour la différenciation des cGMPs, probablement en augmentant l'expression de gènes tels que *Csf1r*, une cible directe de *Lrf8* (Scheller et al., 1999). Notamment, *Lrf8* et *Ctnnb1* (codant la β -caténine) font partie d'un réseau régulateur antagoniste dans la leucémie myéloïde chronique (Scheller et al., 2013), et la signalisation activée de la β -caténine confère des caractéristiques aberrantes d'auto-renouvellement aux GMPs leucémiques dans la leucémie myéloïde chronique et la leucémie myéloïde aïgue (Jamieson et al., 2004; Wang et al., 2010). Notamment, nous avons observé des niveaux accrus de β -caténine nucléaire dans les GMPs en régénération du jour 8, et dans les GMPs des souris BA et jB (Figure 92).

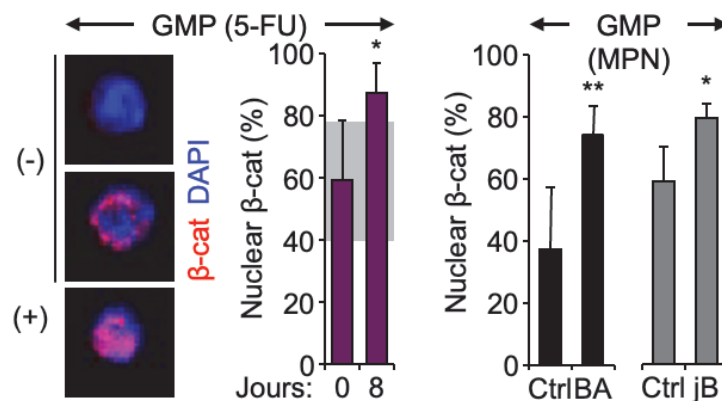


Figure 92: **Expression nucléaire de la β -caténine par immunofluorescence** avec une coloration négative (-) et positive (+) représentative dans les GMP isolés provenant de souris sauvages traitées au 5-FU au jour 8 ainsi que de souris BA, jB et de leurs témoins respectifs appariés en âge

Cependant, la baisse de l'expression de *Irf8* n'a pas directement entraîné d'expression de β -caténine, car ni les GMPs ni les HSCs ou MPPs *Irf8*^{-/-} n'ont montré d'augmentation de la β -caténine nucléaire (Figure 93).

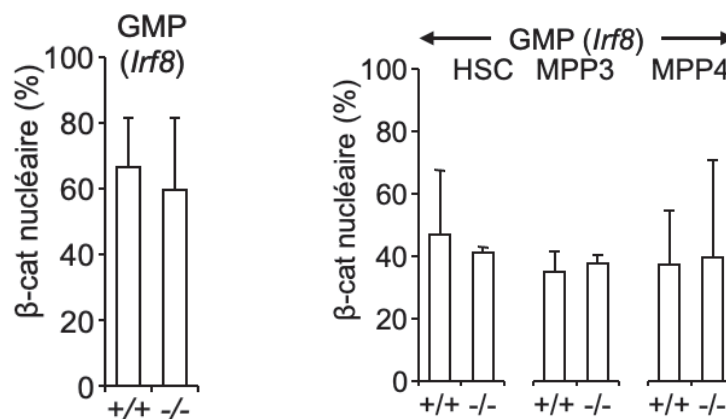


Figure 93: **Fréquence de l'expression nucléaire de β -caténine par immunofluorescence** dans les GMP, HSC, MPP3 et MPP4 isolés de moelle osseuse de souris *Irf8*^{+/+} et *Irf8*^{-/-}

En revanche, les GMPs des souris présentant une activation (GOF) (*Ctnnb1* Flox(Ex3)), (Brault et al., 2001) ou une perte de fonction (LOF) (*Ctnnb1*flox/flox), (Harada et al., 1999) de *Ctnnb1* avaient respectivement une expression diminuée et augmentée de *Irf8*, conduisant à

la présence de pGMPs à l'état stable chez les souris *Ctnnb1* GOF, et à des niveaux inchangés à l'état stable (Figure 94) mais une formation retardée des cGMPs après un traitement au 5-FU chez les souris *Ctnnb1* LOF (Figure 95).

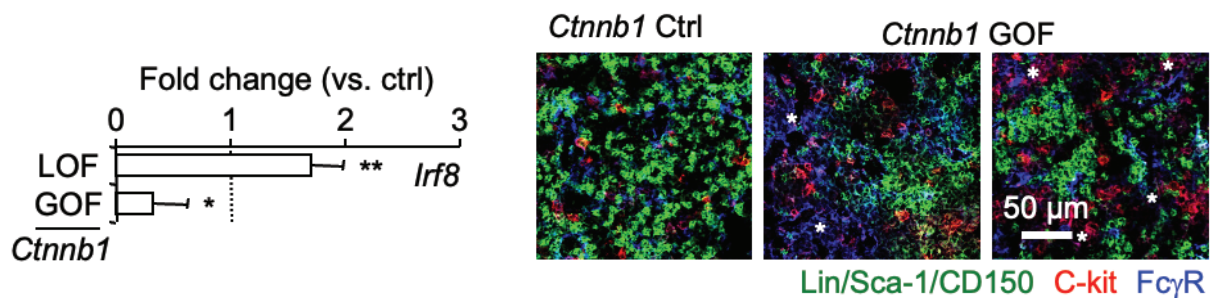


Figure 94: **Expression d'*Lrf8* par qPCR dans les GMP provenant de souris GOF et LOF de *Ctnnb1*** (ligne en pointillés correspond au niveau de contrôle). A droite, observation des GMP dans la moelle osseuse par immunofluorescence des GMP (violet) de souris témoins et GOF de *Ctnnb1*

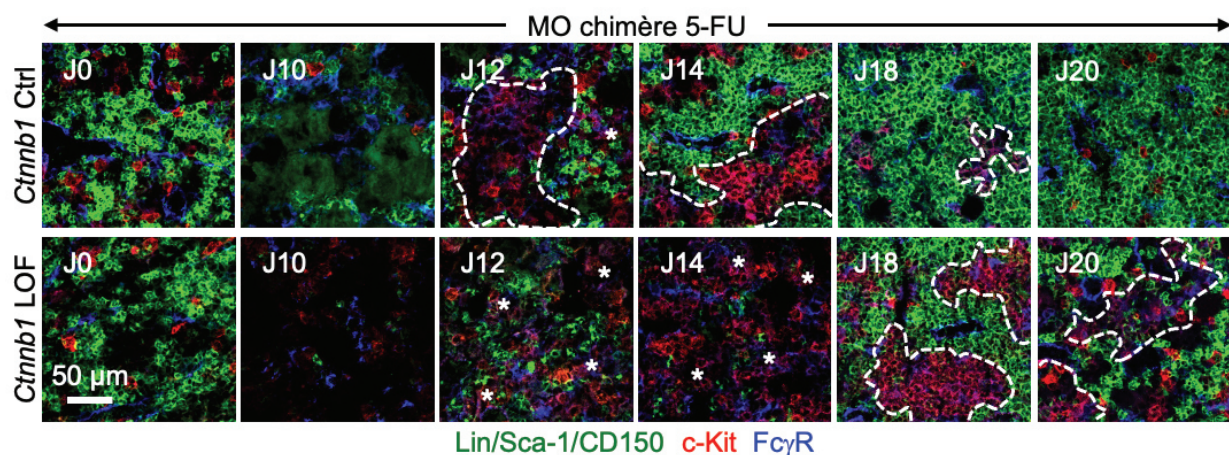


Figure 95: **GMP dans les souris transgéniques LOF pour *Ctnnb1* après traitement au 5-FU**. Immunofluorescence représentative des GMP (violet) dans la MO de souris témoins et LOF pour *Ctnnb1* traitées au 5-FU aux jours indiquées

Dans l'ensemble, ces résultats placent *Lrf8* et la β -caténine au centre d'un réseau inductible de progéniteurs d'auto-renouvellement contrôlant la formation des cGMPs, la β -caténine supprimant directement l'expression de *Lrf8* et *Lrf8* renforçant finalement l'expression de la β -caténine dans les contextes de MPN (Figure 96).

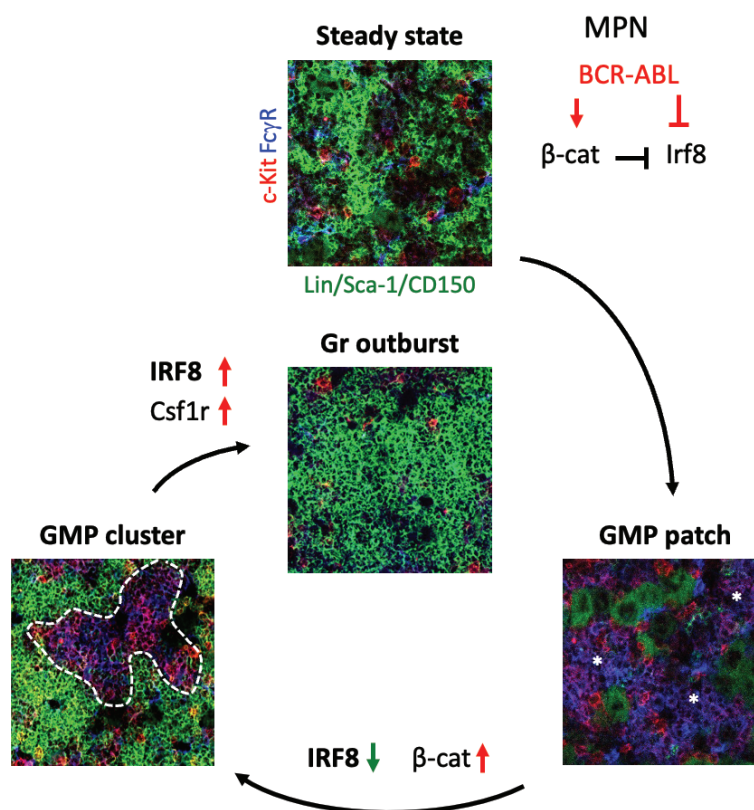


Figure 96: **Modèle du réseau moléculaire contrôlant l'auto-renouvellement des pGMPs et la différenciation des cGMPs.** Le rouge indique l'activation ; le vert représente la suppression. Sur toutes les images, les étoiles indiquent les pGMPs et les lignes en pointillés représentent les cGMPs

1.7. Les signaux de la niche de la MO contrôlent la formation des cGMPs.

Pour identifier les facteurs environnementaux impliqués dans la formation des cGMPs, nous avons réalisé des analyses ELISA sur le sérum de la MO de souris sauvages traitées au 5-FU. Nous avons notamment trouvé des niveaux significativement accrus de cytokines connues pour stimuler la prolifération des HSC et déclencher la différenciation des cellules myéloïdes, telles que SCF, G-CSF et IL-1, avant l'expansion des pGMPs (jours 5-8), et des facteurs importants pour restaurer la quiescence des HSC, tels que TGFβ1 et CXCL4 (également connu sous le nom de PF4), au moment de la formation des cGMPs (jours 10-12) (Schepers et al., 2013). En revanche, nous n'avons observé aucun changement dans la chimiokine de migration vers la MO CXCL12 (également connue sous le nom de SDF1α), et une diminution plutôt qu'une augmentation signalée (Zhao et al., 2014) de la production de FGF1 (Figure 97).

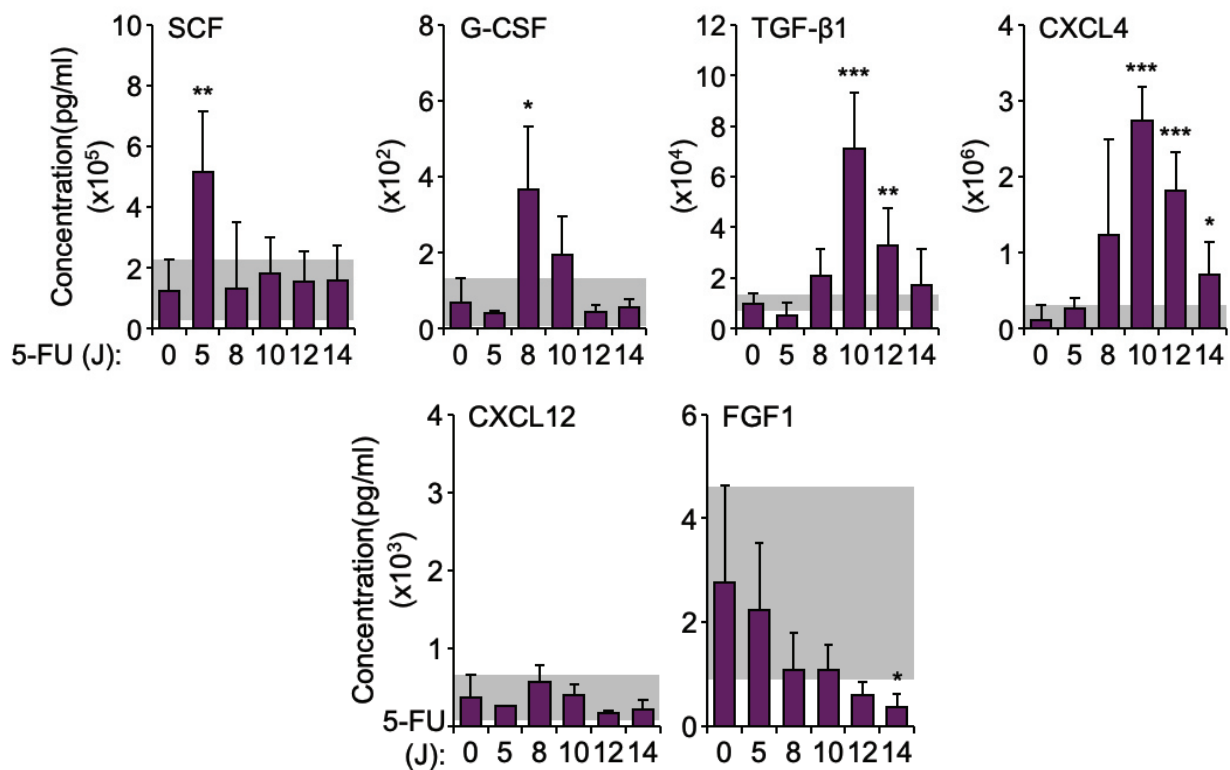


Figure 97: **Mesure des cytokines par ELISA dans le liquide interstitiel de moelle osseuse** de souris sauvages traitées au 5-FU aux jours indiqués.

De manière intéressante, le G-CSF et l'IL-1 sont tous deux produits par les cellules endothéliales endommagée dans des conditions de stress (Cain et al., 2011; Pietras et al., 2016). Nous avons donc analysé les capillaires par immunofluorescence et avons confirmé des dommages vasculaires notables après le traitement au 5-FU, avec des lacunes majeures entre les cellules endothéliales laminine+ dysmorphiques entraînant une fuite vasculaire dans le microenvironnement stromal, surtout aux jours 8-10 lorsque les pGMPs se développent (résultats non présentés).

Les cytokines TGFβ1 et CXCL4 produites en fin de régénération ont été décrites comme étant produites par les mégacaryocytes, des cellules essentielles à la maintenance de la dormance des HSC (Bruns et al., 2014; Nakamura-Ishizu et al., 2015). De manière très claire, les résultats d'immunofluorescence ont montré une sur-abondance de mégacaryocytes CD150+ grands et matures en étroite association avec les cGMPs dans chaque contexte régénératif testé, y compris les traitements au 5-FU, G-CSF et Ly-6G (résultats non présentés).

Pour aborder le rôle des mégacaryocytes dans la sécrétion de signaux renforçant la quiescence, nous avons utilisé une approche basée sur la toxine diphtérique publiée précédemment (Buch et al., 2005; Tiedt et al., 2007) pour dépléter les mégacaryocytes chez les souris *Cxcl4-cre::iDtr* traitées au 5-FU. CXCL4 est indispensable pour la maturation des mégacaryocytes, lorsque les souris *Cxcl4-cre::iDtr* sont traitées avec de la toxine diphtérique, il y a déplétion par le CRE des cellules exprimant CXCL4 entraînant la déplétion des mégacaryocytes. De manière remarquable, lorsque les souris étaient préalablement traitées avec du 5-FU, puis traitées tous les jours depuis le jour huit au jour quatorze après traitement au 5-FU, cela a entraîné une formation persistante de cGMPs en comparaison avec les souris contrôles (Figure 98).

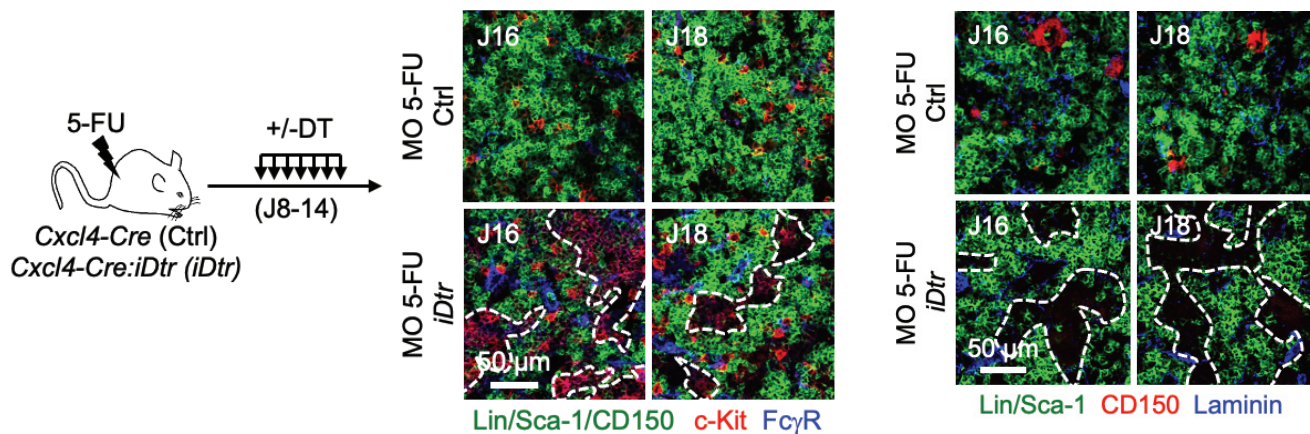


Figure 98: **Etude des GMP et mégacaryocytes dans la moelle osseuse dans les souris *Cxcl4-cre::iDtr* traitées au 5-FU.** Schéma expérimental *Cxcl4-cre::iDtr* traitées au 5-FU puis traitées tous les jours, entre les jours 8 et 14 après traitement au 5-FU. Immunofluorescence représentant les GMPs (violet c-kit) et les mégacaryocytes (en rouge CD150) dans la MO de souris contrôles (Ctrl) et *Cxcl4-cre::iDtr* (iDtr) traitées au 5-FU et avec de la toxine diphtérique (DT) permettant la déplétion des mégacaryocytes dans les souris iDtr

Enfin les cytokines TGF- β 1 et CXCL4 était diminué dans les souris dépourvues de mégacaryocytes corrélant avec la diminution du maintien des HSC en état de dormance (Bruns et al., 2014) (Figure 99).

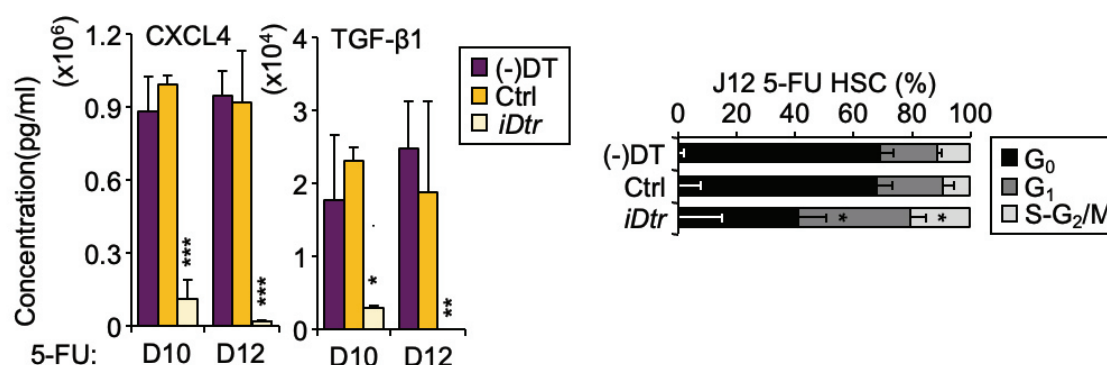


Figure 99: **Etude des cytokines et du cycle cellulaire dans les souris *Cxcl4-cre::iDtr* traitées au 5-FU.** A gauche, mesures de cytokines par ELISA dans le liquide interstitiel de la MO 10 et 12 jours après traitement au 5-FU des souris control (Ctrl), non traitées avec de la DT ((-)DT et *Cxcl4-cre::iDtr* (iDtr). A droite, distribution du cycle cellulaire des HSC 12 jours après traitement au 5-FU par cytométrie en flux

Ces résultats démontrent que de nombreux signaux du microenvironnement de la moelle osseuse, distincts et régulés dans le temps, sont importants pour différents aspects de la formation des cGMP. Cela inclut la production précoce de SCF et d'IL-1, qui activent les HSC pour produire des MPP2/MPP3 et initier la myélopoïèse d'urgence, la libération de G-CSF, qui dicte quand les pGMP auto-renouvelables sont formés, probablement en déclenchant le réseau d'auto-renouvellement des progéniteurs *Irf8* et β -caténine, et la production tardive de TGF β 1 et de CXCL4 par les mégacaryocytes entourant les cGMP, qui rétablissent la quiescence des HSC et limitent la durée de la réponse régénérative.

1.8. Formation anormale de cGMP dans la leucémie

Pour comprendre pourquoi la formation des cGMP est activée de manière constitutive dans la leucémie, nous avons effectué une analyse de cytokines par ELISA sur le liquide interstitiel de la moelle osseuse provenant de souris BA et jB. Remarquablement, nous avons constaté une diminution cohérente des cytokines favorisant la quiescence dans les deux modèles de MPN, avec des niveaux indétectables de TGF β 1 et de CXCL4 chez les souris BA, et une production significativement réduite de TGF β 1 chez les souris jB (Figure 100).

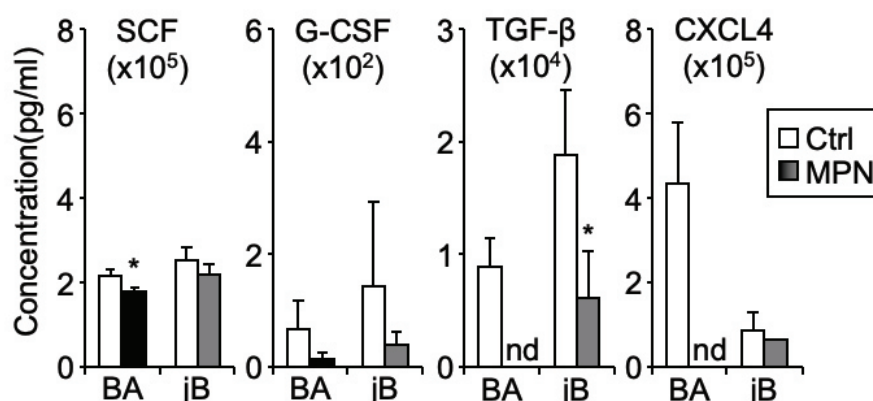


Figure 100: **Mesures de cytokines par ELISA dans les fluides de la MO dans les souris transgéniques leucémiques BCR/ABL et JunB**

La coloration en immunofluorescence a révélé une diminution du nombre de mégacaryocytes CD150+ à proximité des cGMP dans les deux modèles de MPN, allant d'une quasi-absence chez les souris BA à des cas rares chez les souris jB (Figure 101).

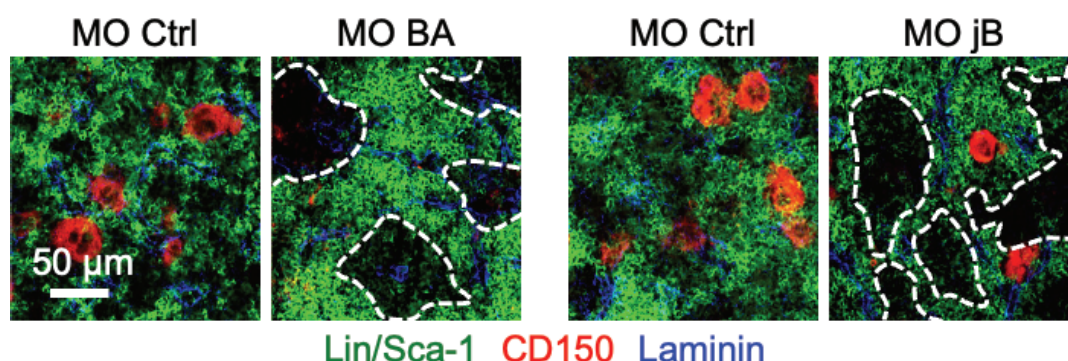


Figure 101: **Visualisation des mégacaryocytes dans les souris transgéniques BCR/ABL et JunB.** Immunofluorescence des mégacaryocytes (rouge) dans la moelle osseuse dans les souris transgéniques BCR/ABL et JunB en comparaison avec leurs contrôles respectifs

Nous avons aussi confirmé l'expression réduite de Cxcl4 chez les mégacaryocytes des souris BA (résultats non présentés) coïncidant avec l'absence des mégacaryocytes et l'absence de Cxcl4 dans le liquide interstitiel de la MO des souris BA

De plus, l'immunofluorescence des vaisseaux sanguins laminine+ a révélé un endothélium constamment endommagé avec une association de forte fuite vasculaire dans les deux modèles de MPN, BA et jB (résultats non présentés). Ces résultats coïncident avec l'augmentation de G-CSF précédemment observée par Elisa dans le liquide interstitiel de ces souris entraînant une constante activation des HSC.

Nous avons également observé la persistance de très grands cGMP associés à une surproduction constante de granulocytes chez les souris BA traitées par 5-FU par comparaison aux souris sauvages traitées au 5-FU (Figure 102).

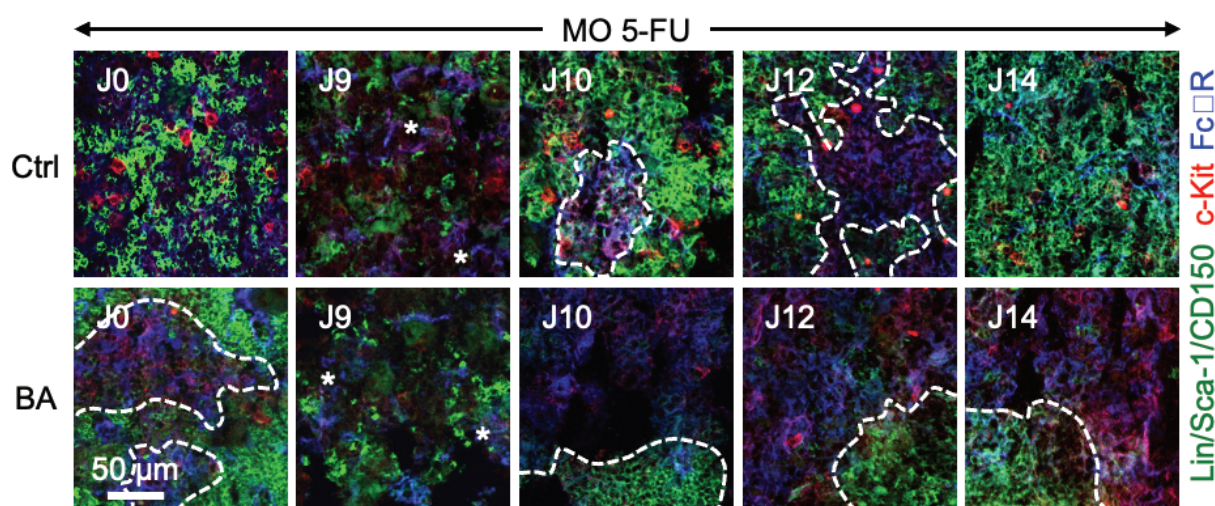


Figure 102: **Observation des GMP dans les souris transgéniques BA traitées au 5-FU.** Immunofluorescence de la moelle osseuse montrant les GMP (violet) dans les souris sauvages ou les souris transgéniques BA traitées au 5-FU

Ces résultats indiquent que les cellules souches leucémiques dérivées des HSC produisent continuellement des cGMP comme conséquence directe de niveaux élevés de cytokines activatrices, telles que l'IL-1, produites par le microenvironnement de la MO leucémique en situation d'inflammation. Cela entraîne une surproduction de MPP2 et MPP3, qui sont engagés dans la formation des pGMP probablement en raison de l'activation constitutive du réseau d'auto-renouvellement des progéniteurs Irf8 et β -caténine par les oncogènes en cause, plutôt que par des cytokines myéloïdes extrinsèques. Plus important encore, ce processus d'activation ne s'arrête jamais car des cytokines essentielles favorisant la quiescence, telles que le TGF β 1 et le CXCL4, font défaut en raison de la perte ou de la production insuffisante de mégacaryocytes leucémiques. Dans l'ensemble, ces résultats démontrent que le microenvironnement de la MO leucémique est à la fois activé de manière constitutive et dépourvu de mécanismes de rétroaction importants, ce qui conduit à une formation constante de cGMP et à une production de granulocytes.

CONCLUSIONS ET DISCUSSION

Les travaux présentés dans cette thèse survolent 10 ans de recherche. Une partie de mes travaux a été réalisée à l'UCSF, dans un environnement académique tandis que l'autre étude a été faite Genentech dans un contexte industriel, lié au développement de molécules thérapeutiques.

Les études sur les anticorps bispécifiques NKG2D et la formation de clusters de progéniteurs myéloïdes fournissent des perspectives sur des aspects distincts, mais potentiellement interconnectés, de la modulation immunitaire et de l'hématopoïèse. Alors que la première se concentre sur l'amélioration de l'immunité antitumorale par des anticorps bispécifiques, la seconde explore la dynamique des clusters de progéniteurs myéloïdes dans des conditions de myélopoïèse d'urgence et leucémique. Cette discussion vise à explorer les intersections potentielles entre ces deux domaines de recherche et leurs implications pour les stratégies thérapeutiques.

Dans cette première étude, nous avons identifié NKG2D comme une cible de récepteur co-stimulateur en raison de son association avec un pronostic amélioré suite au traitement par atezolizumab (anti-PD-L1) chez les patientes atteintes de cancer du sein triple négatif (TNBC) et de sa forte expression sur les cellules T CD8+ dans les échantillons de cancer du sein humain.

Nous avons exploré l'efficacité des anticorps bispécifiques ciblant le récepteur de co-stimulation NKG2D pour améliorer l'immunité antitumorale des cellules NK et des lymphocytes T CD8+. Les anticorps bispécifiques NKG2D ont été conçus, produits et testés pour leur capacité à activer ces cellules immunitaires et à augmenter leur production de cytokines et leur cytotoxicité contre les cellules tumorales.

Les expériences *in vitro* ont montré que HER2-CRB augmente significativement l'activation des cellules NK et des lymphocytes T CD8+ en combinaison avec HER2-TDB, ainsi que leur capacité à tuer les cellules cancéreuses de sein positives pour HER2. Les études *in vivo* utilisant des modèles murins ont confirmé ces résultats, démontrant une meilleure maîtrise de la croissance tumorale sans effets secondaires notables.

En somme, les NKG2D-CRB engagent les cellules NK et T, conduisant à une activité antitumorale accrue dans les modèles de cancer du sein et ont un potentiel d'applicabilité large dans d'autres indications tumorales; d'autre part, ces anticorps peuvent être associés avec une large gamme d'immunothérapies.

La seconde étude explore la formation de clusters de progéniteurs myéloïdes granulocyte/macrophage dans des conditions de myélopoïèse d'urgence et leucémique. En

conditions normales, les GMP sont dispersés dans la moelle osseuse. Cependant, lors de processus régénératifs, ces GMP forment des clusters qui se différencient localement en granulocytes. Cette formation de clusters est régulée par un réseau de signaux de niche de la moelle osseuse, incluant SCF, IL-1 β , G-CSF, TGF- β , et CXCL4, ainsi que par l'activation d'un réseau de renouvellement des progéniteurs Lrf8/ β -catenin.

Dans le contexte de la leucémie, les clusters de GMP sont continuellement produits en raison de l'activation persistante du réseau de renouvellement et de l'absence de cytokines de terminaison qui restaurent normalement la quiescence des cellules souches. Cette production constante de clusters de GMP contribue à la myélopoïèse pathologique observée dans la leucémie, mettant en évidence une cible potentielle pour des interventions thérapeutiques.

Les analyses moléculaires ont révélé que les GMP en conditions de myélopoïèse d'urgence et leucémique expriment des profils géniques distincts, avec une activation notable des voies de signalisation impliquées dans l'auto-renouvellement et la différenciation. Les expériences *in vivo* ont montré que la manipulation de ces voies peut influencer la formation de clusters de GMP et leur différenciation.

En conclusion, cette étude met en lumière l'importance des clusters de GMP dans la régulation de la myélopoïèse d'urgence et leucémique, et propose des cibles moléculaires potentielles.

Le système immunitaire joue un rôle crucial à la fois dans la suppression des tumeurs et la régulation de l'hématopoïèse. De nombreuses publications étudient les effets des cellules immunitaires dans les tumeurs solides mais peu font le lien entre le site de la tumeur et les organes qui les produisent. En ce qui concerne les cellules myéloïdes chez l'humain adulte, la moelle osseuse est le tissu qui les produit. Dans la deuxième partie de cette thèse, j'ai décrit la formation des clusters de GMP dans la moelle osseuse chez la souris lors de situations de régénération ou de leucémie. Or, lorsque j'étais dans le laboratoire d'Emmanuelle Passegué, la publication du Dr Casbon et ses auteurs a décrit de manière intéressante un biais de production de neutrophiles dans les souris transgéniques atteintes de cancer du sein (PyMT) (Casbon et al., 2015). Les auteurs décrivent l'action du G-CSF produit par les cellules tumorales du site tumoral vers la moelle osseuse, entraînant la sur-production de neutrophiles qui inhibent la fonction des cellules T. De plus, une étude récente a confirmé ce biais de production de cellules myéloïdes dans la moelle osseuse dans un modèle murin de cancer du sein. En effet, les auteurs ont démontré que la présence d'une tumeur solide change le microenvironnement de la moelle osseuse, entraînant une modification de la régulation des cellules souches hématopoïétiques provoquant une myélopoïèse accrue (Gerber-Ferder et al., 2023). Enfin, une review récente du laboratoire d'Emmanuelle Passegué relate ces effets dans le contexte du cancer du sein mais aussi dans d'autres contextes de maladies inflammatoires (Swann et al., 2024).

Connaissant les travaux du Dr Casbon, lorsque j'étais dans le laboratoire d'Emmanuelle Passegué, nous étions curieux de comprendre les raisons de cette sur-production de neutrophiles dans les souris transgéniques PyMT développant un cancer du sein. J'ai donc disséqué des fémurs provenant de ces mêmes souris et j'ai confirmé la présence de clusters de GMP (Figure non montrée).

Ces résultats renforcent le remaniement de la moelle osseuse entraînant une régulation anormale des cellules souches hématopoïétiques. Et cela a d'autant plus de sens dans cette thèse puisqu'une étude a montré que l'IL1 β induit l'expression de l'IL17 par les cellules T $\gamma\delta$. Cela entraîne une expansion systémique et une polarisation des neutrophiles dépendante du G-CSF inhibant les cellules T CD8 cytotoxiques chez des souris porteuses de tumeurs mammaires (Coffelt et al., 2015). NKG2D est exprimé sur les cellules T CD8 et T $\gamma\delta$. Sachant cela, il serait intéressant d'étudier ce mécanisme lors de l'utilisation des HER2-CRB. L'activation des cellules T $\gamma\delta$ pourrait en effet contribuer au remaniement anormal de la moelle osseuse, en entraînant la sur-production de neutrophiles, inhibant les cellules T CD8 et donc avoir l'effet inverse de ce que nous essayons d'accomplir.

Mieux comprendre les effets des tumeurs solides sur la régulation des cellules souches hématopoïétiques, avant et après traitements anticancéreux tels que les anticorps bispécifiques, est crucial. Des efforts importants sont entrepris par de nombreuses compagnies pharmaceutiques pour développer ce type de molécules, sans en comprendre les effets en dehors du site tumoral. Or ces molécules entraînent des effets secondaires extrêmement toxiques, comme le syndrome de libération des cytokines. En effet, l'activation des cellules T par les anticorps bispécifiques entraîne la production de cytokines telles que TNF- α et l'INF- γ , engendrant l'activation des macrophages et des neutrophiles producteurs d'IL-6, la principale cytokine connue pour engendrer ce type toxicité (Leclercq-Cohen et al., 2023; Li et al., 2019). Comprendre les mécanismes menant à la production de ces cellules pourrait aider à mieux contrôler les phénomènes de résistance ainsi que les effets secondaires dans le but d'accroître l'efficacité de ces molécules chez les patients.

Je travaille actuellement à l'IHB chez Roche, où notre mission consiste à développer des modèles d'organoïdes humains dans le but d'utiliser des modèles plus prédictifs pour tester de nouvelles molécules. Depuis mai 2023, j'ai rejoint le laboratoire de Lauriane Cabon, où nous évoluons à l'interface entre l'IHB et Roche/Genentech. Notre objectif est d'accompagner nos collègues dans le développement de nouvelles molécules en intégrant ces modèles plus complexes, afin de mieux comprendre les mécanismes biologiques liés à l'efficacité, à la résistance et à la toxicité des traitements. Travailler dans cet environnement est une réelle opportunité pour moi, car cela me permet de contribuer au développement de modèles innovants grâce à l'expertise en bioingénierie de l'IHB et à ma connaissance de la biologie de la moelle osseuse.

C'est dans cette optique que je souhaite proposer le développement d'un organoïde de moelle osseuse, que nous pourrions ensuite exposer à des co-cultures de tumoroïdes ou d'organoïdes sains. Grâce à notre accès à la banque d'échantillons de l'IHB, nous serions en mesure de développer des co-cultures de tumoroïdes de cancer du sein positifs pour HER2 ou des organoïdes sains avec des PBMC ou des cellules T, afin de tester l'effet de HER2-TDB. Les anticorps bispécifiques, ayant montré des problèmes de résistance, pourraient être testés sur ces modèles 3D in vitro pour évaluer s'ils sont capables de récapituler les mécanismes de résistance et mieux prédire l'efficacité de nouveaux traitements.

L'IHB dispose de nombreux outils pour analyser l'efficacité des molécules dans ces systèmes de co-culture, que nous pourrions appliquer à ces nouveaux modèles. Par exemple, nous pourrions utiliser le FACS pour les cellules immunitaires, l'Elisa pour l'analyse des cytokines, ainsi que la microscopie pour suivre la présence de Caspase 3/7 dans les organoïdes (Harter et al., 2024). De plus, des modèles de co-culture plus complexes pourraient être développés, notamment en incluant des CAF (Cancer-Associated Fibroblasts), responsables de mécanismes de résistance, afin d'augmenter la prédictibilité de ce type de modèle.

Plusieurs études ont déjà décrit des modèles d'organoïdes de moelle osseuse, présentant des niveaux de complexité variables, tous utilisant des MSC et des cellules endothéliales pour créer une niche favorable au développement physiologique des cellules souches hématopoïétiques. L'un de ces modèles consistait en une simple co-culture de cellules souches et progénitrices hématopoïétiques (CD34+), ainsi que des MSC et cellules endothéliales, mais le nombre de cellules hématopoïétiques vivantes dans ce modèle était faible, nécessitant une amélioration (Giger et al., 2022). Un modèle plus complexe, issu de cellules iPSC, est particulièrement intéressant : les auteurs ont montré une production continue de cellules souches hématopoïétiques pendant plus de deux semaines (Frenz-Wiessner et al., 2024). Enfin, un organoïde de moelle osseuse développé sur puce a démontré la capacité à produire toutes les cellules hématopoïétiques, ce qui pourrait nous inspirer pour développer un modèle plus robuste en collaboration avec le groupe de microfluidique (Chou et al., 2020). Ce modèle inclurait la vasculature directement avec les cellules souches, reflétant leur contact naturel avec les vaisseaux sanguins entourés de MSC pour assurer leur maintien.

Pour aller plus loin, nous pourrions étudier les interactions à distance entre les tumeurs et la moelle osseuse en connectant les co-cultures de tumoroïdes ou d'organoïdes avec des cellules T et l'organoïde de moelle osseuse. Cela me permettrait de développer une ligne de recherche pour les années à venir à l'IHB, tout en contribuant de manière significative au développement de nouvelles molécules chez Roche. En effet, mieux comprendre les effets des traitements anti-cancéreux sur des modèles in vitro complexes aidera à mieux anticiper leurs effets sur les patients.

L'interaction entre la moelle osseuse et les tumeurs est encore mal comprise et n'est pas prise en compte dans le développement de molécules. Une meilleure compréhension des mécanismes d'interaction entre les traitements et la moelle osseuse pourrait aider à développer des molécules plus efficaces et moins toxiques. Par exemple, en bloquant ou en régulant la production de cellules myéloïdes au niveau des cellules souches ou des progéniteurs, nous pourrions éviter certains mécanismes de résistance observés lors des traitements des tumeurs solides. De plus, ces cellules myéloïdes contribuent à la progression des tumeurs et il serait envisageable de les cibler en amont, lors de leur production, pour stabiliser les tumeurs et limiter leur dissémination.

Grâce à cette ligne de recherche et à l'obtention de mon doctorat, je pourrai encadrer des étudiants en master et en thèse pour m'aider à mener à bien ce projet. Mon objectif est de publier nos travaux de recherche et de partager nos données et modèles avec les équipes de Roche dès que possible. Je pense que ce type d'innovation permettra une meilleure prédiction, le développement de traitements plus efficaces, et aura un impact direct sur les traitements futurs.

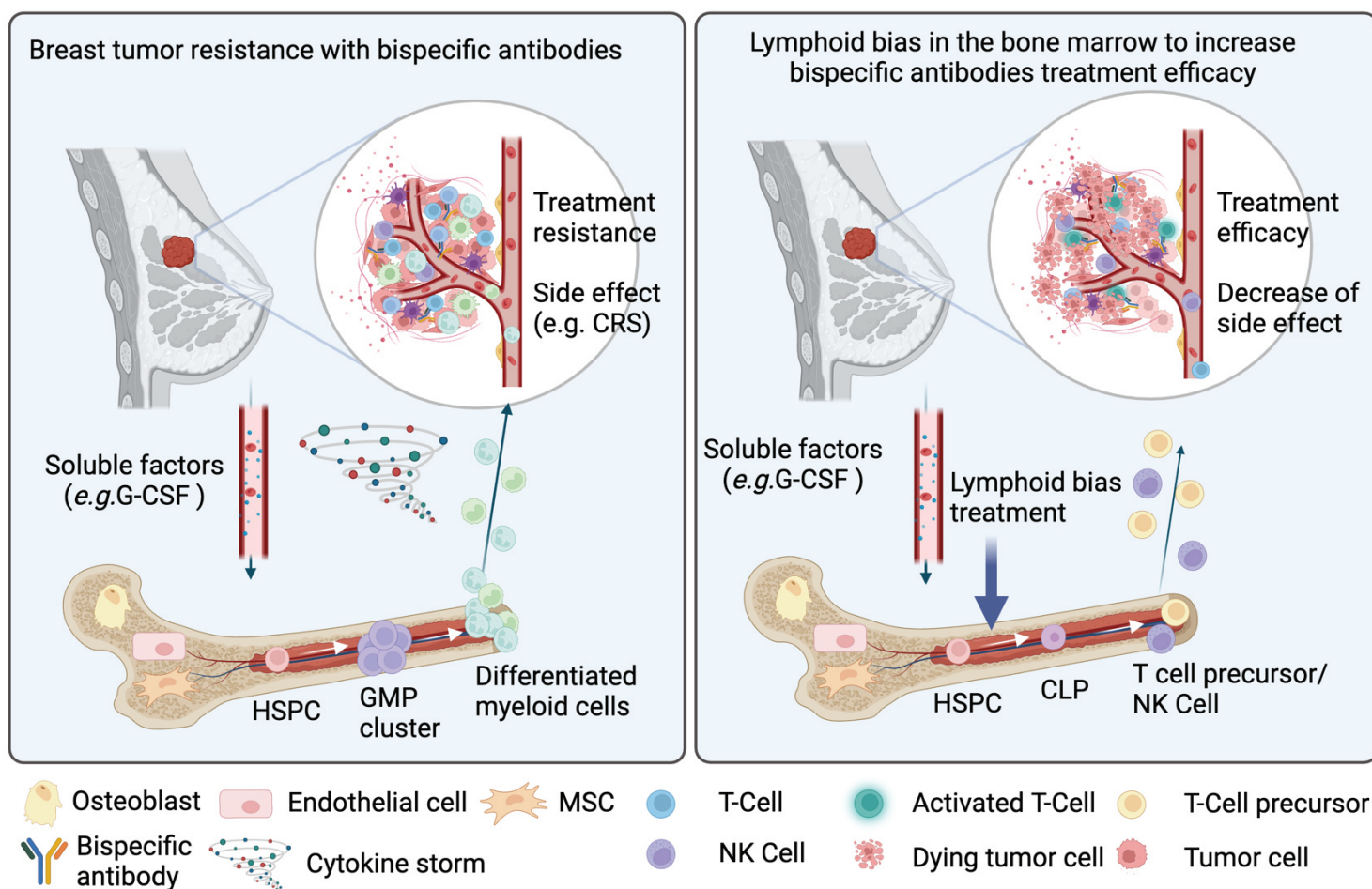


Figure 103 : **Dialogue entre la moelle osseuse et le cancer du sein.** Sur le schéma de gauche, la tumeur mammaire libère dans la circulation des facteurs solubles, tels que le G-CSF, qui modifie le microenvironnement de la moelle osseuse. Cela influence la différenciation des cellules souches hématopoïétiques (HSC), entraînant une orientation vers la production de cellules myéloïdes. Ces cellules, une fois dans la circulation sanguine, migrent vers la tumeur, renforçant la résistance aux traitements par anticorps bispécifiques et exacerbant les effets secondaires

Le schéma de droite propose l'hypothèse qu'en orientant la différenciation des HSC vers une prédominance lymphocytaire, on pourrait augmenter le nombre de précurseurs des cellules T et des cellules NK. Cela pourrait réduire certains mécanismes de résistance et les effets indésirables liés aux cellules myéloïdes, tout en améliorant l'efficacité des traitements par anticorps bispécifiques. Enfin, de façon plus générale, comprendre les interactions entre les tumeurs solides et la moelle osseuse permettrait de mieux cibler et anticiper les effets secondaires potentiels liés à ces traitements (inspiré de (Swann et al., 2024))

MATERIALS AND METHODS

All of the materials and methods can be found in the annexes 1 and 2 but I am describing the protocols that I find the most relevant to understand the results of the thesis.

First part

Flow cytometric analysis

Human DTCs from Discovery Life Sciences were thawed as indicated by the manufacturer. Cells were stained with fixable viability dye eFluor780 (eBioscience, 65-0865-14) to exclude dead cells for 30 min at 4°C. To avoid non-specific binding to Fc receptors, cells were incubated for 10 min at 4°C with human FcR blocking reagent (Miltenyi Biotec, 130-059-901). Cells were then stained as indicated using fluorescently-labeled antibodies (Table S1). For intracellular staining, the FoxP3 buffer kit (eBioscience, 00-5123-43) was used according to manufacture's protocol. HER2-CRB binding was detected with an anti-human Fc-A488 antibody (BioLegend, 409,322). NKG2D ligand expression was detected using human NKG2D-Fc and detected with antihuman Fc-A488 antibody (BioLegend, 409,322). MICA/B was detected using an anti-MICA/B antibody. All antibody reagents for flow cytometry can be found in Table S1. Primary NK cells and BT474 target cells were preloaded with 2 μ M Cell Trace Violet (CTV) and 10 μ M 5-(and- 6)-(((4-chloromethyl)benzoyl)amino)tetramethylrhodamine (CMTMR), respectively. NK cells and BT474 target cells were conjugated by short centrifugation at a 1:1 ratio at 2×10^6 cells/ml in the presence of HER2-CRB at 1 or 10 μ g/ml. After 10 min co-culture, cells were fixed with 3% paraformaldehyde. Conjugate formation was evaluated by flow cytometry using the BD LSR Fortessa X20. Fo5 tumors were harvested and processed as previously described. Cells were resuspended in FACS buffer and counted using ViCell WX (Beckman Coulter). For degranulation and intracellular cytokine analysis, 3×10^6 tumor cells were incubated for 5 h at 37°C in complete media supplemented with CD107a/b-Alexa647 (BioLegend 121,610 and 108,512), Golgi Plug (BD Pharmingen 555,029), GolgiStop, (BD Pharmingen 55,474) and PMA-ionomycin cocktail (BioLegend 423,304). Cells were surface and intracellularly stained as described above and antibodies are listed in Table S1. Samples were analyzed using Symphony Flow Cytometers (BD Biosciences) and data analyzed using FlowJo Software (Tree Star).

In vitro cytotoxicity assays

HCC2218 cells were co-cultured with NK92-6F5 cells in the presence of BsAbs. Tumor cells were enumerated by HER2 + gated cell counts after acquisition of a defined volume of single-cell suspension by flow cytometry. Primary NK cells were stimulated with IL-15 at 10 ng/ml (Peprotech, 200-15) overnight at 37°C at 5% CO₂ prior to use. BT474-nucLight RFP cells were seeded one day before the experiment in a clear bottom black well microplate (Corning, 3603) and CD8+ T or aforementioned stimulated NK cells were added in the presence of molecules as indicated. For MICA-ECD competition experiments, BT474-nucLight RFP cells were co-cultured with purified normal donor CD8+ T cells at an E:T ratio of 1:1 (10,000:10,000 cells). No TDB or 10 ng/ml of HER2.2C4-TDB with 0, 0.6 or 6.0 nM HER2-

CRBs were added to co-cultures. Plates were placed in Incucyte S3 instrument (Essen Bioscience) at 37°C at 5% CO₂ and were scanned every 4 h for 7d.

Second part

Flow cytometry

BM stem and progenitor populations were analyzed and/or isolated as previously described (Pietras et al., 2015). In brief, BM cells were obtained by either crushing leg, arm and pelvic bones or just flushing leg bones in Hanks' Buffered Saline Solution (HBSS) containing 2% heat-inactivated FBS (Sigma-Aldrich). HBSS/2% FBS was used for all incubation and wash steps. Erythrocytes and contaminating bone material were removed by ACK lysis followed by centrifugation on a Ficoll gradient (Histopaque 1119, Sigma-Aldrich) for crushed bones. For cell analyses, unfractionated BM cells were incubated with purified, unconjugated-lineage antibodies (CD3 from Biolegend, and CD4, CD5, CD8, B220, Ter119, Mac-1 and Gr-1 from eBioscience) followed by goat anti-rat-PE-Cy5 (Invitrogen, A10691) and subsequently blocked with purified rat IgG (Sigma-Aldrich, I8015-10MG). Cells were then stained with c-Kit-APC-eFluor780 (eBioscience, 47-1171-82), Sca-1-PB (BioLegend, 108120), CD48-A647 (BioLegend, 103416), CD150-PE (BioLegend, 115904) and either CD34-FITC (eBioscience, 11-0341-85) together with FcγR-PerCP-eFluor710 (eBioscience, 46-0161-82) for combined stem/progenitor staining or only ESAM-FITC (Biolegend, 136205) for detailed analyses of HSC and MPP2/3 after 5-FU treatment. For Csf1r-Gfp mice, CD34-FITC was replaced by CD34-Bio (Biolegend, 119304) followed by staining with SA-PeCy7 (eBioscience, 25-4317-82). For GMP sorting, BM cells were first pre-enriched for c-Kit⁺ cells using c-Kit microbeads (Miltenyi Biotec, 130-091-224) and MACS Separation LS Columns (Miltenyi Biotec, 130-042-401), and stained as described with Lin/PE-Cy5, c-Kit-APC-eFluor780, Sca-1-PB, CD34-FITC and FcγR-PerCP-eFluor710. For mature cell analyses, unfractionated BM cells were stained with Mac-1-PE-Cy7 (eBioscience, 25-0112-82), Gr-1-PB (eBioscience, 57-5931-82), B220-APC-Cy7 (eBioscience, 47-0452-82) and CD19-PE (eBioscience, 12-0193-82). Peripheral blood cells

Immunofluorescence on tissue sections

Mouse femurs or spleens were snap frozen in OCT (Tissue-Tek) and kept at -80°C until sectioning. Frozen samples were cryosectioned (7µm) using a Cryostat equipped with the Cryojane tape transfer system and tungsten blades (Leica Microsystems). Sections were dried for 2–4 hours at RT and then frozen at -80°C until stained. Prior staining, sections were fixed with 100% acetone for 10 min at -20°C, dried for 5 min at RT and blocked for 1 hour 30 min at RT with 10% goat-serum (Gibco) in PBS. For regular GMP staining, sections were incubated first with rat anti-mouse c-Kit (Biolegend, 135102) primary antibody O/N at 4°C in PBS/10% goat-serum, followed with a goat anti-rat-Cy3 (Jackson ImmunoResearch, 112-165-167) secondary antibody for 1 hour at RT in PBS/10% goat-serum and washed 3x for 5 min with PBS at RT. These wash steps were also performed between each staining

steps. Sections were then blocked with 20 µg/ml Rat IgG (Sigma-Aldrich, I8015-10MG) for 10 min at RT in PBS, and finally stained with A488-conjugated lineage markers (B220 from Invitrogen, and Mac-1, Gr-1 and CD3 from Biolegend), Sca-1-A488 (Biolegend, 108116), CD150-A488 (Biolegend, 115916) and FcγR-A647 (UCSF Hybridoma Core Facility) for 1 hour 30 min at RT in PBS/10% goat-serum. For GMP staining of the MLL-AF9 transplantation model, the eBioscience mouse hematopoietic lineage biotin panel (88-7774), Sca-1-bio (eBioscience, 13-5981-1630), and CD150-bio (Biolegend, 115908) were used instead of A488-conjugated antibodies followed by staining with a SA-e450 (eBioscience, 48-4317) antibody. For laminin and GMP co-staining, FcγR was omitted and rabbit anti-mouse laminin (Sigma-Aldrich, L9393) followed by staining with a goat anti-rabbit-A647 secondary antibody was used instead. For the other GMP co-staining, A647-conjugated lineage antibodies (Biolegend, B220, Mac-1, Gr-1 and CD3), Sca-1-A647 (Biolegend, 108118) and CD150-A647 (Biolegend, 115918) were used instead of A488-conjugated antibodies, and FcγR was omitted. For laminin and ECM protein co-detection, rabbit anti-cells was also used in ImageJ to quantify DG-microsphere mean intensity fluorescence (MFI) outside of blood vessels. mouse laminin, Collagen IV (Abcam, ab6586) and fibronectin (Abcam, ab23750) were used followed by staining with a donkey anti-rabbit-A488 (Sigma-Aldrich, A-21206) secondary antibody. For clonality analyses, either CD45.2-FITC (Biolegend, 109816) or A488-conjugated anti-GFP (Aves labs, GFP-1020) were used. For laminin and DG-microsphere co-staining, sections were just stained with rabbit anti-mouse laminin followed by goat anti-rabbit-A647. For proliferation analyses, either pH3-FITC (Cell Signaling, 9708S) or Click-iT® EdU Alexa Fluor® 488 Imaging Kit (ThermoFisher Scientific, C10337) were used according to the manufacturer's instructions. For myeloid/lymphoid cells and GMP co-staining, FcγR, CD150 and Sca-1 were omitted and B220-A488 (Invitrogen, RM2620), CD3-A488 (Biolegend, 100210), Gr-1-A647 (Biolegend, 108418) and Mac-1-A647 (Biolegend, 101218) were used instead. For megakaryocytes and GMP co-staining, FcγR was omitted and rat anti-mouse CD150 (Biolegend, 115902) followed by staining with a goat anti-rat-Cy3 secondary antibody was used instead. For cleaved caspase 3 (CC3) and GMP co-staining, FcγR was omitted and sections were fixed for 10 min with 4% PFA at RT then washed 3x for 5 min at RT in PBS/0.1% triton X100. Sections were first incubated with a rabbit anti-CC3 (Cell Signaling, 9661-S) antibody followed by a goat anti-rabbit-A647 (Thermo Fisher Scientific, A-21245) secondary antibody, and then stained as usual for c-Kit and A488-conjugated lineage. For pimonidazol staining, frozen sections were fixed with 4% PFA for 10 min at RT and stained with FITC-conjugated anti-pimonidazole (Hypoxypore, HP2-100Kit) according to the manufacturer's instructions. After staining, all sections were counterstained with 1 µg/ml DAPI in PBS for 10 min at RT, mounted with fluoromount (Southern Biotech, 0100-01) and imaged on a SP5 upright or SP8 inverted confocal microscopes (Leica) with a 20x objective. Images were processed using Volocity software (Perkin Elmer v.6.2) and analyzed with ImageJ. The analyze particle function and a threshold mask covering laminin+.

REFERENCES

- Abken, H. (2021). Building on Synthetic Immunology and T Cell Engineering: A Brief Journey Through the History of Chimeric Antigen Receptors. *Hum Gene Ther*, 32(19-20), 1011-1028. <https://doi.org/10.1089/hum.2021.165>
- Aggarwal, D., Russo, S., Naik, P., Bhatia, S., & Spector, D. L. (2023). Establishment and Culture of Patient-Derived Breast Organoids. *J Vis Exp*(192). <https://doi.org/10.3791/64889>
- Beatson, G. T. (1896). On the Treatment of Inoperable Cases of Carcinoma of the Mamma: Suggestions for a New Method of Treatment, with Illustrative Cases. *Trans Med Chir Soc Edinb*, 15, 153-179. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29584099>
- Biswas, S. K., Banerjee, S., Baker, G. W., Kuo, C. Y., & Chowdhury, I. (2022). The Mammary Gland: Basic Structure and Molecular Signaling during Development. *Int J Mol Sci*, 23(7). <https://doi.org/10.3390/ijms23073883>
- Boyages, J. (2017). Radiation therapy and early breast cancer: current controversies. *Med J Aust*, 207(5), 216-222. <https://doi.org/10.5694/mja16.01020>
- Boyer, J. Z., Phillips, G. D. L., Nitta, H., Garsha, K., Admire, B., Kraft, R., Dennis, E., Vela, E., & Towne, P. (2021). Activity of trastuzumab emtansine (T-DM1) in 3D cell culture. *Breast Cancer Res Treat*, 188(1), 65-75. <https://doi.org/10.1007/s10549-021-06272-x>
- Brault, V., Moore, R., Kutsch, S., Ishibashi, M., Rowitch, D. H., McMahon, A. P., Sommer, L., Boussadia, O., & Kemler, R. (2001). Inactivation of the beta-catenin gene by Wnt1-Cre-mediated deletion results in dramatic brain malformation and failure of craniofacial development. *Development*, 128(8), 1253-1264. <https://doi.org/10.1242/dev.128.8.1253>
- Bray, F., Ferlay, J., Laversanne, M., Brewster, D. H., Gombe Mbalawa, C., Kohler, B., Pineros, M., Steliarova-Foucher, E., Swaminathan, R., Antoni, S., Soerjomataram, I., & Forman, D. (2015). Cancer Incidence in Five Continents: Inclusion criteria, highlights from Volume X and the global status of cancer registration. *Int J Cancer*, 137(9), 2060-2071. <https://doi.org/10.1002/ijc.29670>
- Brennan, P. J., Kumagai, T., Berezov, A., Murali, R., & Greene, M. I. (2000). HER2/neu: mechanisms of dimerization/oligomerization. *Oncogene*, 19(53), 6093-6101. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1203967>
- Bruns, I., Lucas, D., Pinho, S., Ahmed, J., Lambert, M. P., Kunisaki, Y., Scheiermann, C., Schiff, L., Poncz, M., Bergman, A., & Frenette, P. S. (2014). Megakaryocytes regulate hematopoietic stem cell quiescence through CXCL4 secretion. *Nat Med*, 20(11), 1315-1320. <https://doi.org/10.1038/nm.3707>
- Buch, T., Heppner, F. L., Tertilt, C., Heinen, T. J., Kremer, M., Wunderlich, F. T., Jung, S., & Waisman, A. (2005). A Cre-inducible diphtheria toxin receptor mediates cell lineage ablation after toxin administration. *Nat Methods*, 2(6), 419-426. <https://doi.org/10.1038/nmeth762>
- Butterfield, L. H., & Najjar, Y. G. (2024). Immunotherapy combination approaches: mechanisms, biomarkers and clinical observations. *Nat Rev Immunol*, 24(6), 399-416. <https://doi.org/10.1038/s41577-023-00973-8>

- Cain, D. W., Snowden, P. B., Sempowski, G. D., & Kelsoe, G. (2011). Inflammation triggers emergency granulopoiesis through a density-dependent feedback mechanism. *PLoS One*, 6(5), e19957. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019957>
- Campbell, J. L., Klueva, N. Y., Zheng, H. G., Nieto-Sotelo, J., Ho, T. D., & Nguyen, H. T. (2001). Cloning of new members of heat shock protein HSP101 gene family in wheat (*Triticum aestivum* (L.) Moench) inducible by heat, dehydration, and ABA(1). *Biochim Biophys Acta*, 1517(2), 270-277. [https://doi.org/10.1016/s0167-4781\(00\)00292-x](https://doi.org/10.1016/s0167-4781(00)00292-x)
- Casbon, A. J., Reynaud, D., Park, C., Khuc, E., Gan, D. D., Schepers, K., Passegue, E., & Werb, Z. (2015). Invasive breast cancer reprograms early myeloid differentiation in the bone marrow to generate immunosuppressive neutrophils. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 112(6), E566-575. <https://doi.org/10.1073/pnas.1424927112>
- Chan, C. J., Smyth, M. J., & Martinet, L. (2014). Molecular mechanisms of natural killer cell activation in response to cellular stress. *Cell Death Differ*, 21(1), 5-14. <https://doi.org/10.1038/cdd.2013.26>
- Chan, J. K., Hamilton, C. A., Cheung, M. K., Karimi, M., Baker, J., Gall, J. M., Schulz, S., Thorne, S. H., Teng, N. N., Contag, C. H., Lum, L. G., & Negrin, R. S. (2006). Enhanced killing of primary ovarian cancer by retargeting autologous cytokine-induced killer cells with bispecific antibodies: a preclinical study. *Clin Cancer Res*, 12(6), 1859-1867. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-05-2019>
- Chan, W. K., Kang, S., Youssef, Y., Glankler, E. N., Barrett, E. R., Carter, A. M., Ahmed, E. H., Prasad, A., Chen, L., Zhang, J., Benson, D. M., Jr., Caligiuri, M. A., & Yu, J. (2018). A CS1-NKG2D Bispecific Antibody Collectively Activates Cytolytic Immune Cells against Multiple Myeloma. *Cancer Immunol Res*, 6(7), 776-787. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-17-0649>
- Cheang, M. C., Martin, M., Nielsen, T. O., Prat, A., Voduc, D., Rodriguez-Lescure, A., Ruiz, A., Chia, S., Shepherd, L., Ruiz-Borrego, M., Calvo, L., Alba, E., Carrasco, E., Caballero, R., Tu, D., Pritchard, K. I., Levine, M. N., Bramwell, V. H., Parker, J., . . . Carey, L. A. (2015). Defining breast cancer intrinsic subtypes by quantitative receptor expression. *Oncologist*, 20(5), 474-482. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.2014-0372>
- Chen, L., & Flies, D. B. (2013). Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition. *Nat Rev Immunol*, 13(4), 227-242. <https://doi.org/10.1038/nri3405>
- Cheng, Y. J., Nie, X. Y., Ji, C. C., Lin, X. X., Liu, L. J., Chen, X. M., Yao, H., & Wu, S. H. (2017). Long-Term Cardiovascular Risk After Radiotherapy in Women With Breast Cancer. *J Am Heart Assoc*, 6(5). <https://doi.org/10.1161/JAHA.117.005633>
- Cho, H. M., Rosenblatt, J. D., Tolba, K., Shin, S. J., Shin, D. S., Calfa, C., Zhang, Y., & Shin, S. U. (2010). Delivery of NKG2D ligand using an anti-HER2 antibody-NKG2D ligand fusion protein results in an enhanced innate and adaptive antitumor response. *Cancer Res*, 70(24), 10121-10130. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-1047>
- Cho, H. S., Mason, K., Ramyar, K. X., Stanley, A. M., Gabelli, S. B., Denney, D. W., Jr., & Leahy, D. J. (2003). Structure of the extracellular region of HER2 alone and in complex with the Herceptin Fab. *Nature*, 421(6924), 756-760. <https://doi.org/10.1038/nature01392>
- Chou, D. B., Frimantas, V., Milton, Y., David, R., Pop-Damkov, P., Ferguson, D., MacDonald, A., Vargel Bolukbasi, O., Joyce, C. E., Moreira Teixeira, L. S., Rech, A., Jiang, A., Calamari, E., Jalili-Firoozinezhad, S., Furlong, B. A., O'Sullivan, L. R., Ng, C. F., Choe, Y., Marquez, S., . . . Ingber, D. E. (2020). On-chip recapitulation of clinical bone marrow toxicities and patient-specific pathophysiology. *Nat Biomed Eng*, 4(4), 394-406. <https://doi.org/10.1038/s41551-019-0495-z>
- Clevers, H. (2016). Modeling Development and Disease with Organoids. *Cell*, 165(7), 1586-1597. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.05.082>

- Cocco, E., Javier Carmona, F., Razavi, P., Won, H. H., Cai, Y., Rossi, V., Chan, C., Cownie, J., Soong, J., Toska, E., Shifman, S. G., Sarotto, I., Savas, P., Wick, M. J., Papadopoulos, K. P., Moriarty, A., Cutler, R. E., Jr., Avogadri-Connors, F., Lalani, A. S., . . . Scaltriti, M. (2018). Neratinib is effective in breast tumors bearing both amplification and mutation of ERBB2 (HER2). *Sci Signal*, 11(551). <https://doi.org/10.1126/scisignal.aat9773>
- Coffelt, S. B., Kersten, K., Doornebal, C. W., Weiden, J., Vrijland, K., Hau, C. S., Verstegen, N. J. M., Ciampricotti, M., Hawinkels, L., Jonkers, J., & de Visser, K. E. (2015). IL-17-producing gammadelta T cells and neutrophils conspire to promote breast cancer metastasis. *Nature*, 522(7556), 345-348. <https://doi.org/10.1038/nature14282>
- Collins, D. M., Conlon, N. T., Kannan, S., Verma, C. S., Eli, L. D., Lalani, A. S., & Crown, J. (2019). Preclinical Characteristics of the Irreversible Pan-HER Kinase Inhibitor Neratinib Compared with Lapatinib: Implications for the Treatment of HER2-Positive and HER2-Mutated Breast Cancer. *Cancers (Basel)*, 11(6). <https://doi.org/10.3390/cancers11060737>
- Cortes, J., Kim, S. B., Chung, W. P., Im, S. A., Park, Y. H., Hegg, R., Kim, M. H., Tseng, L. M., Petry, V., Chung, C. F., Iwata, H., Hamilton, E., Curigliano, G., Xu, B., Huang, C. S., Kim, J. H., Chiu, J. W. Y., Pedrini, J. L., Lee, C., . . . Investigators, D. E.-B. T. (2022). Trastuzumab Deruxtecan versus Trastuzumab Emtansine for Breast Cancer. *N Engl J Med*, 386(12), 1143-1154. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2115022>
- Danaei, G., Vander Hoorn, S., Lopez, A. D., Murray, C. J., Ezzati, M., & Comparative Risk Assessment collaborating, g. (2005). Causes of cancer in the world: comparative risk assessment of nine behavioural and environmental risk factors. *Lancet*, 366(9499), 1784-1793. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)67725-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)67725-2)
- Ding, H., Buzzard, G. W., Huang, S., Sehorn, M. G., Marcus, R. K., & Wei, Y. (2021). MICA-G129R: A bifunctional fusion protein increases PRLR-positive breast cancer cell death in co-culture with natural killer cells. *PLoS One*, 16(6), e0252662. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0252662>
- Dranoff, G. (2004). Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy. *Nat Rev Cancer*, 4(1), 11-22. <https://doi.org/10.1038/nrc1252>
- Drost, J., & Clevers, H. (2018). Organoids in cancer research. *Nat Rev Cancer*, 18(7), 407-418. <https://doi.org/10.1038/s41568-018-0007-6>
- Duro-Sanchez, S., Alonso, M. R., & Arribas, J. (2023). Immunotherapies against HER2-Positive Breast Cancer. *Cancers (Basel)*, 15(4). <https://doi.org/10.3390/cancers15041069>
- Eiger, D., Ponde, N. F., & de Azambuja, E. (2019). Pertuzumab in HER2-positive early breast cancer: current use and perspectives. *Future Oncol*, 15(16), 1823-1843. <https://doi.org/10.2217/fon-2018-0896>
- Finkle, D., Quan, Z. R., Asghari, V., Kloss, J., Ghaboosi, N., Mai, E., Wong, W. L., Hollingshead, P., Schwall, R., Koeppen, H., & Erickson, S. (2004). HER2-targeted therapy reduces incidence and progression of midlife mammary tumors in female murine mammary tumor virus huHER2-transgenic mice. *Clin Cancer Res*, 10(7), 2499-2511. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.ccr-03-0448>
- Fisher, B., Anderson, S., Bryant, J., Margolese, R. G., Deutsch, M., Fisher, E. R., Jeong, J. H., & Wolmark, N. (2002). Twenty-year follow-up of a randomized trial comparing total mastectomy, lumpectomy, and lumpectomy plus irradiation for the treatment of invasive breast cancer. *N Engl J Med*, 347(16), 1233-1241. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa022152>
- Flanagan, M. L., Khawli, L. A., Hu, P., & Epstein, A. L. (2006). H60/TNT-3 fusion protein activates NK cells in vitro and improves immunotherapeutic outcome in murine syngeneic tumor models. *J Immunother*, 29(3), 274-283. <https://doi.org/10.1097/01.cji.0000199194.90222.1a>

- Frenz-Wiessner, S., Fairley, S. D., Buser, M., Goek, I., Salewskij, K., Jonsson, G., Illig, D., Zu Putlitz, B., Petersheim, D., Li, Y., Chen, P. H., Kalauz, M., Conca, R., Sterr, M., Geuder, J., Mizoguchi, Y., Megens, R. T. A., Linder, M. I., Kotlarz, D., . . . Klein, C. (2024). Generation of complex bone marrow organoids from human induced pluripotent stem cells. *Nat Methods*, 21(5), 868-881. <https://doi.org/10.1038/s41592-024-02172-2>
- Fu, Q., Chen, N., Ge, C., Li, R., Li, Z., Zeng, B., Li, C., Wang, Y., Xue, Y., Song, X., Li, H., & Li, G. (2019). Prognostic value of tumor-infiltrating lymphocytes in melanoma: a systematic review and meta-analysis. *Oncoimmunology*, 8(7), 1593806. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2019.1593806>
- Ganesh, K., Wu, C., O'Rourke, K. P., Szeglin, B. C., Zheng, Y., Sauve, C. G., Adileh, M., Wasserman, I., Marco, M. R., Kim, A. S., Shady, M., Sanchez-Vega, F., Karthaus, W. R., Won, H. H., Choi, S. H., Pelossof, R., Barlas, A., Ntiamoah, P., Pappou, E., . . . Smith, J. J. (2019). A rectal cancer organoid platform to study individual responses to chemoradiation. *Nat Med*, 25(10), 1607-1614. <https://doi.org/10.1038/s41591-019-0584-2>
- Gerber-Ferder, Y., Cosgrove, J., Duperray-Susini, A., Missolo-Koussou, Y., Dubois, M., Stepaniuk, K., Pereira-Abrantes, M., Sedlik, C., Lameiras, S., Baulande, S., Bendriss-Vermare, N., Guernonprez, P., Passaro, D., Perie, L., Piaggio, E., & Helft, J. (2023). Breast cancer remotely imposes a myeloid bias on haematopoietic stem cells by reprogramming the bone marrow niche. *Nat Cell Biol*, 25(12), 1736-1745. <https://doi.org/10.1038/s41556-023-01291-w>
- Germain, C., Campigna, E., Salhi, I., Morisseau, S., Navarro-Teulon, I., Mach, J. P., Pelegrin, A., & Robert, B. (2008). Redirecting NK cells mediated tumor cell lysis by a new recombinant bifunctional protein. *Protein Eng Des Sel*, 21(11), 665-672. <https://doi.org/10.1093/protein/gzn047>
- Germain, R. N. (2002). T-cell development and the CD4-CD8 lineage decision. *Nat Rev Immunol*, 2(5), 309-322. <https://doi.org/10.1038/nri798>
- Giger, S., Hofer, M., Miljkovic-Licina, M., Hoehnel, S., Brandenberg, N., Guiet, R., Ehrbar, M., Kleiner, E., Gegenschatz-Schmid, K., Matthes, T., & Lutolf, M. P. (2022). Microarrayed human bone marrow organoids for modeling blood stem cell dynamics. *APL Bioeng*, 6(3), 036101. <https://doi.org/10.1063/5.0092860>
- Gilfillan, S., Ho, E. L., Cella, M., Yokoyama, W. M., & Colonna, M. (2002). NKG2D recruits two distinct adapters to trigger NK cell activation and costimulation. *Nat Immunol*, 3(12), 1150-1155. <https://doi.org/10.1038/ni857>
- Guy, C. T., Webster, M. A., Schaller, M., Parsons, T. J., Cardiff, R. D., & Muller, W. J. (1992). Expression of the neu protooncogene in the mammary epithelium of transgenic mice induces metastatic disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89(22), 10578-10582. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.22.10578>
- Han, Y., Sun, F., Zhang, X., Wang, T., Jiang, J., Cai, J., Gao, Q., Hezam, K., Liu, Y., Xie, J., Wang, M., & Zhang, J. (2019). CD24 targeting bi-specific antibody that simultaneously stimulates NKG2D enhances the efficacy of cancer immunotherapy. *J Cancer Res Clin Oncol*, 145(5), 1179-1190. <https://doi.org/10.1007/s00432-019-02865-8>
- Harada, N., Tamai, Y., Ishikawa, T., Sauer, B., Takaku, K., Oshima, M., & Taketo, M. M. (1999). Intestinal polyposis in mice with a dominant stable mutation of the beta-catenin gene. *EMBO J*, 18(21), 5931-5942. <https://doi.org/10.1093/emboj/18.21.5931>
- Harbeck, N., Penault-Llorca, F., Cortes, J., Gnant, M., Houssami, N., Poortmans, P., Ruddy, K., Tsang, J., & Cardoso, F. (2019). Breast cancer. *Nat Rev Dis Primers*, 5(1), 66. <https://doi.org/10.1038/s41572-019-0111-2>
- Harter, M. F., Recaladin, T., Gerard, R., Avignon, B., Bollen, Y., Esposito, C., Guja-Jarosz, K., Kromer, K., Filip, A., Aubert, J., Schneider, A., Bacac, M., Bscheider, M., Stokar-Regenscheit, N., Piscuoglio, S., Beumer, J., & Gjorevski, N. (2024). Analysis of off-tumour toxicities of T-cell-engaging bispecific antibodies via donor-matched intestinal

- organoids and tumouroids. *Nat Biomed Eng*, 8(4), 345-360. <https://doi.org/10.1038/s41551-023-01156-5>
- He, M. Y., Rancoule, C., Rehailia-Blanchard, A., Espenel, S., Trone, J. C., Bernichon, E., Guillaume, E., Vallard, A., & Magne, N. (2018). Radiotherapy in triple-negative breast cancer: Current situation and upcoming strategies. *Crit Rev Oncol Hematol*, 131, 96-101. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2018.09.004>
- Herault, A., Binnewies, M., Leong, S., Calero-Nieto, F. J., Zhang, S. Y., Kang, Y. A., Wang, X., Pietras, E. M., Chu, S. H., Barry-Holson, K., Armstrong, S., Gottgens, B., & Passegue, E. (2017). Myeloid progenitor cluster formation drives emergency and leukaemic myelopoiesis. *Nature*, 544(7648), 53-58. <https://doi.org/10.1038/nature21693>
- Herault, A., Mak, J., de la Cruz-Chuh, J., Dillon, M. A., Ellerman, D., Go, M., Cosino, E., Clark, R., Carson, E., Yeung, S., Pichery, M., Gador, M., Chiang, E. Y., Wu, J., Liang, Y., Modrusan, Z., Gampa, G., Sudhamsu, J., Kemball, C. C., . . . Walsh, K. B. (2024). NKG2D-bispecific enhances NK and CD8+ T cell antitumor immunity. *Cancer Immunol Immunother*, 73(10), 209. <https://doi.org/10.1007/s00262-024-03795-2>
- Hinner, M. J., Aiba, R. S. B., Jaquin, T. J., Berger, S., Durr, M. C., Schlosser, C., Allersdorfer, A., Wiedenmann, A., Matschiner, G., Schuler, J., Moebius, U., Rothe, C., Matis, L., & Olwill, S. A. (2019). Tumor-Localized Costimulatory T-Cell Engagement by the 4-1BB/HER2 Bispecific Antibody-Anticalin Fusion PRS-343. *Clin Cancer Res*, 25(19), 5878-5889. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-18-3654>
- Holtschke, T., Lohler, J., Kanno, Y., Fehr, T., Giese, N., Rosenbauer, F., Lou, J., Knobloch, K. P., Gabriele, L., Waring, J. F., Bachmann, M. F., Zinkernagel, R. M., Morse, H. C., 3rd, Ozato, K., & Horak, I. (1996). Immunodeficiency and chronic myelogenous leukemia-like syndrome in mice with a targeted mutation of the ICSBP gene. *Cell*, 87(2), 307-317. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81348-3](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81348-3)
- Hudis, C. A. (2007). Trastuzumab--mechanism of action and use in clinical practice. *N Engl J Med*, 357(1), 39-51. <https://doi.org/10.1056/NEJMra043186>
- Huen, M. S., Sy, S. M., & Chen, J. (2010). BRCA1 and its toolbox for the maintenance of genome integrity. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 11(2), 138-148. <https://doi.org/10.1038/nrm2831>
- Imamura, Y., Mukohara, T., Shimono, Y., Funakoshi, Y., Chayahara, N., Toyoda, M., Kiyota, N., Takao, S., Kono, S., Nakatsura, T., & Minami, H. (2015). Comparison of 2D- and 3D-culture models as drug-testing platforms in breast cancer. *Oncol Rep*, 33(4), 1837-1843. <https://doi.org/10.3892/or.2015.3767>
- Jamieson, C. H., Ailles, L. E., Dylla, S. J., Muijtjens, M., Jones, C., Zehnder, J. L., Gotlib, J., Li, K., Manz, M. G., Keating, A., Sawyers, C. L., & Weissman, I. L. (2004). Granulocyte-macrophage progenitors as candidate leukemic stem cells in blast-crisis CML. *N Engl J Med*, 351(7), 657-667. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa040258>
- Jamieson, P. R., Dekkers, J. F., Rios, A. C., Fu, N. Y., Lindeman, G. J., & Visvader, J. E. (2017). Derivation of a robust mouse mammary organoid system for studying tissue dynamics. *Development*, 144(6), 1065-1071. <https://doi.org/10.1242/dev.145045>
- Jarde, T., Lloyd-Lewis, B., Thomas, M., Kendrick, H., Melchor, L., Bougaret, L., Watson, P. D., Ewan, K., Smalley, M. J., & Dale, T. C. (2016). Wnt and Neuregulin1/ErbB signalling extends 3D culture of hormone responsive mammary organoids. *Nat Commun*, 7, 13207. <https://doi.org/10.1038/ncomms13207>
- Jen, E. Y., Xu, Q., Schetter, A., Przepiorka, D., Shen, Y. L., Roscoe, D., Sridhara, R., Deisseroth, A., Philip, R., Farrell, A. T., & Pazdur, R. (2019). FDA Approval: Blinatumomab for Patients with B-cell Precursor Acute Lymphoblastic Leukemia in Morphologic Remission with Minimal Residual Disease. *Clin Cancer Res*, 25(2), 473-477. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-18-2337>
- Junttila, T. T., Li, J., Johnston, J., Hristopoulos, M., Clark, R., Ellerman, D., Wang, B. E., Li, Y., Mathieu, M., Li, G., Young, J., Luis, E., Lewis Phillips, G., Stefanich, E., Spiess, C.,

- Polson, A., Irving, B., Scheer, J. M., Junttila, M. R., . . . Ebens, A. (2014). Antitumor efficacy of a bispecific antibody that targets HER2 and activates T cells. *Cancer Res*, 74(19), 5561-5571. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-13-3622-T>
- Kellner, C., Hallack, D., Glorius, P., Staudinger, M., Mohseni Nodehi, S., de Weers, M., van de Winkel, J. G., Parren, P. W., Stauch, M., Valerius, T., Repp, R., Humpe, A., Gramatzki, M., & Peipp, M. (2012). Fusion proteins between ligands for NKG2D and CD20-directed single-chain variable fragments sensitize lymphoma cells for natural killer cell-mediated lysis and enhance antibody-dependent cellular cytotoxicity. *Leukemia*, 26(4), 830-834. <https://doi.org/10.1038/leu.2011.288>
- Kellner, C., Lutz, S., Oberg, H. H., Wesch, D., Otte, A., Diemer, K. J., Wilcken, H., Bauerschlag, D., Gluer, C. C., Wichmann, C., Kabelitz, D., Leusen, J. H. W., Klausz, K., Humpe, A., Gramatzki, M., & Peipp, M. (2022). Tumor cell lysis and synergistically enhanced antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity by NKG2D engagement with a bispecific immunoligand targeting the HER2 antigen. *Biol Chem*, 403(5-6), 545-556. <https://doi.org/10.1515/hsz-2021-0229>
- Kuchenbaecker, K. B., Hopper, J. L., Barnes, D. R., Phillips, K. A., Mooij, T. M., Roos-Blom, M. J., Jervis, S., van Leeuwen, F. E., Milne, R. L., Andrieu, N., Goldgar, D. E., Terry, M. B., Rookus, M. A., Easton, D. F., Antoniou, A. C., Brca, Consortium, B. C., McGuffog, L., Evans, D. G., . . . Olsson, H. (2017). Risks of Breast, Ovarian, and Contralateral Breast Cancer for BRCA1 and BRCA2 Mutation Carriers. *JAMA*, 317(23), 2402-2416. <https://doi.org/10.1001/jama.2017.7112>
- Lanier, L. L. (2015). NKG2D Receptor and Its Ligands in Host Defense. *Cancer Immunol Res*, 3(6), 575-582. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-15-0098>
- Leclercq-Cohen, G., Steinhoff, N., Alberti Servera, L., Nassiri, S., Danilin, S., Piccione, E., Yanguéz, E., Husser, T., Herter, S., Schmeing, S., Gerber, P., Schwalie, P., Sam, J., Briner, S., Jenni, S., Bianchi, R., Biehl, M., Cremasco, F., Apostolopoulou, K., . . . Bacac, M. (2023). Dissecting the Mechanisms Underlying the Cytokine Release Syndrome (CRS) Mediated by T-Cell Bispecific Antibodies. *Clin Cancer Res*, 29(21), 4449-4463. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-22-3667>
- Lee-Chang, C., & Lesniak, M. S. (2023). Next-generation antigen-presenting cell immune therapeutics for gliomas. *J Clin Invest*, 133(3). <https://doi.org/10.1172/JCI163449>
- Lewis Phillips, G. D., Li, G., Dugger, D. L., Crocker, L. M., Parsons, K. L., Mai, E., Blattler, W. A., Lambert, J. M., Chari, R. V., Lutz, R. J., Wong, W. L., Jacobson, F. S., Koeppen, H., Schwall, R. H., Kenkare-Mitra, S. R., Spencer, S. D., & Sliwkowski, M. X. (2008). Targeting HER2-positive breast cancer with trastuzumab-DM1, an antibody-cytotoxic drug conjugate. *Cancer Res*, 68(22), 9280-9290. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-1776>
- Li, J., Piskol, R., Ybarra, R., Chen, Y. J., Li, J., Slaga, D., Hristopoulos, M., Clark, R., Modrusan, Z., Totpal, K., Junttila, M. R., & Junttila, T. T. (2019). CD3 bispecific antibody-induced cytokine release is dispensable for cytotoxic T cell activity. *Sci Transl Med*, 11(508). <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aax8861>
- Li, J., Ybarra, R., Mak, J., Herault, A., De Almeida, P., Arrazate, A., Ziai, J., Totpal, K., Junttila, M. R., Walsh, K. B., & Junttila, T. T. (2018). IFNgamma-induced Chemokines Are Required for CXCR3-mediated T-Cell Recruitment and Antitumor Efficacy of Anti-HER2/CD3 Bispecific Antibody. *Clin Cancer Res*, 24(24), 6447-6458. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-18-1139>
- Li, M. L., Aggeler, J., Farson, D. A., Hatier, C., Hassell, J., & Bissell, M. J. (1987). Influence of a reconstituted basement membrane and its components on casein gene expression and secretion in mouse mammary epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 84(1), 136-140. <https://doi.org/10.1073/pnas.84.1.136>
- Linnemann, J. R., Miura, H., Meixner, L. K., Irmeler, M., Kloos, U. J., Hirschi, B., Bartsch, H. S., Sass, S., Beckers, J., Theis, F. J., Gabka, C., Sotlar, K., & Scheel, C. H. (2015).

- Quantification of regenerative potential in primary human mammary epithelial cells. *Development*, 142(18), 3239-3251. <https://doi.org/10.1242/dev.123554>
- Lum, L. G., & Sen, M. (2001). Activated T-cell and bispecific antibody immunotherapy for high-risk breast cancer. Bench to bedside. *Acta Haematol*, 105(3), 130-136. <https://doi.org/10.1159/000046554>
- Magre, L., Verstegen, M. M. A., Buschow, S., van der Laan, L. J. W., Peppelenbosch, M., & Desai, J. (2023). Emerging organoid-immune co-culture models for cancer research: from oncoimmunology to personalized immunotherapies. *J Immunother Cancer*, 11(5). <https://doi.org/10.1136/jitc-2022-006290>
- Mei, Z., Liu, Y., Liu, C., Cui, A., Liang, Z., Wang, G., Peng, H., Cui, L., & Li, C. (2014). Tumour-infiltrating inflammation and prognosis in colorectal cancer: systematic review and meta-analysis. *Br J Cancer*, 110(6), 1595-1605. <https://doi.org/10.1038/bjc.2014.46>
- Mendez-Ferrer, S., Michurina, T. V., Ferraro, F., Mazloom, A. R., Macarthur, B. D., Lira, S. A., Scadden, D. T., Ma'ayan, A., Enikolopov, G. N., & Frenette, P. S. (2010). Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche. *Nature*, 466(7308), 829-834. <https://doi.org/10.1038/nature09262>
- Middelburg, J., Kemper, K., Engelberts, P., Labrijn, A. F., Schuurman, J., & van Hall, T. (2021). Overcoming Challenges for CD3-Bispecific Antibody Therapy in Solid Tumors. *Cancers (Basel)*, 13(2). <https://doi.org/10.3390/cancers13020287>
- Mitroulis, I., Kalafati, L., Bornhauser, M., Hajishengallis, G., & Chavakis, T. (2020). Regulation of the Bone Marrow Niche by Inflammation. *Front Immunol*, 11, 1540. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01540>
- Mohan, S. C., Lee, T. Y., Giuliano, A. E., & Cui, X. (2021). Current Status of Breast Organoid Models. *Front Bioeng Biotechnol*, 9, 745943. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.745943>
- Molina, M. A., Codony-Servat, J., Albanell, J., Rojo, F., Arribas, J., & Baselga, J. (2001). Trastuzumab (herceptin), a humanized anti-Her2 receptor monoclonal antibody, inhibits basal and activated Her2 ectodomain cleavage in breast cancer cells. *Cancer Res*, 61(12), 4744-4749. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11406546>
- Nakamura-Ishizu, A., Takubo, K., Kobayashi, H., Suzuki-Inoue, K., & Suda, T. (2015). CLEC-2 in megakaryocytes is critical for maintenance of hematopoietic stem cells in the bone marrow. *J Exp Med*, 212(12), 2133-2146. <https://doi.org/10.1084/jem.20150057>
- Nikolaev, M., Mitrofanova, O., Broguiere, N., Geraldo, S., Dutta, D., Tabata, Y., Elci, B., Brandenberg, N., Kolotuev, I., Gjorevski, N., Clevers, H., & Lutolf, M. P. (2020). Homeostatic mini-intestines through scaffold-guided organoid morphogenesis. *Nature*, 585(7826), 574-578. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2724-8>
- Notarbartolo, S., & Abrignani, S. (2022). Human T lymphocytes at tumor sites. *Semin Immunopathol*, 44(6), 883-901. <https://doi.org/10.1007/s00281-022-00970-4>
- O'Shaughnessy, J., Gradishar, W., O'Regan, R., & Gadi, V. (2023). Risk of Recurrence in Patients With HER2+ Early-Stage Breast Cancer: Literature Analysis of Patient and Disease Characteristics. *Clin Breast Cancer*, 23(4), 350-362. <https://doi.org/10.1016/j.clbc.2023.03.007>
- Oh, D. Y., & Bang, Y. J. (2020). HER2-targeted therapies - a role beyond breast cancer. *Nat Rev Clin Oncol*, 17(1), 33-48. <https://doi.org/10.1038/s41571-019-0268-3>
- Pal, B., Chen, Y., Vaillant, F., Capaldo, B. D., Joyce, R., Song, X., Bryant, V. L., Penington, J. S., Di Stefano, L., Tubau Ribera, N., Wilcox, S., Mann, G. B., kConFab, Papenfuss, A. T., Lindeman, G. J., Smyth, G. K., & Visvader, J. E. (2021). A single-cell RNA expression atlas of normal, preneoplastic and tumorigenic states in the human breast. *EMBO J*, 40(11), e107333. <https://doi.org/10.15252/emboj.2020107333>
- Perou, C. M., Sorlie, T., Eisen, M. B., van de Rijn, M., Jeffrey, S. S., Rees, C. A., Pollack, J. R., Ross, D. T., Johnsen, H., Akslen, L. A., Fluge, O., Pergamenschikov, A., Williams, C., Zhu, S. X., Lonning, P. E., Borresen-Dale, A. L., Brown, P. O., & Botstein, D. (2000).

- Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*, 406(6797), 747-752. <https://doi.org/10.1038/35021093>
- Pietras, E. M., Mirantes-Barbeito, C., Fong, S., Loeffler, D., Kovtonyuk, L. V., Zhang, S., Lakshminarasimhan, R., Chin, C. P., Techner, J. M., Will, B., Nerlov, C., Steidl, U., Manz, M. G., Schroeder, T., & Passegue, E. (2016). Chronic interleukin-1 exposure drives haematopoietic stem cells towards precocious myeloid differentiation at the expense of self-renewal. *Nat Cell Biol*, 18(6), 607-618. <https://doi.org/10.1038/ncb3346>
- Pietras, E. M., Reynaud, D., Kang, Y. A., Carlin, D., Calero-Nieto, F. J., Leavitt, A. D., Stuart, J. M., Gottgens, B., & Passegue, E. (2015). Functionally Distinct Subsets of Lineage-Biased Multipotent Progenitors Control Blood Production in Normal and Regenerative Conditions. *Cell Stem Cell*, 17(1), 35-46. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2015.05.003>
- Purdy, A. K., & Campbell, K. S. (2009). SHP-2 expression negatively regulates NK cell function. *J Immunol*, 183(11), 7234-7243. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0900088>
- Quatrini, L., Molfetta, R., Zitti, B., Peruzzi, G., Fionda, C., Capuano, C., Galandrini, R., Cippitelli, M., Santoni, A., & Paolini, R. (2015). Ubiquitin-dependent endocytosis of NKG2D-DAP10 receptor complexes activates signaling and functions in human NK cells. *Sci Signal*, 8(400), ra108. <https://doi.org/10.1126/scisignal.aab2724>
- Rathore, A. S., Kumar, S., Konwar, R., Srivastava, A. N., Makker, A., & Goel, M. M. (2013). Presence of CD3+ tumor infiltrating lymphocytes is significantly associated with good prognosis in infiltrating ductal carcinoma of breast. *Indian J Cancer*, 50(3), 239-244. <https://doi.org/10.4103/0019-509X.118744>
- Ravirala, D., Mistretta, B., Gunaratne, P. H., Pei, G., Zhao, Z., & Zhang, X. (2021). Co-delivery of novel bispecific and trispecific engagers by an amplicon vector augments the therapeutic effect of an HSV-based oncolytic virotherapy. *J Immunother Cancer*, 9(7). <https://doi.org/10.1136/jitc-2021-002454>
- Raynaud, A., Desrumeaux, K., Vidard, L., Termine, E., Baty, D., Chames, P., Vigne, E., & Kerfelec, B. (2020). Anti-NKG2D single domain-based antibodies for the modulation of anti-tumor immune response. *Oncoimmunology*, 10(1), 1854529. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2020.1854529>
- Reynaud, D., Pietras, E., Barry-Holson, K., Mir, A., Binnewies, M., Jeanne, M., Sala-Torra, O., Radich, J. P., & Passegue, E. (2011). IL-6 controls leukemic multipotent progenitor cell fate and contributes to chronic myelogenous leukemia development. *Cancer Cell*, 20(5), 661-673. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2011.10.012>
- Ribas, A., & Wolchok, J. D. (2018). Cancer immunotherapy using checkpoint blockade. *Science*, 359(6382), 1350-1355. <https://doi.org/10.1126/science.aar4060>
- Robert, N. J. (1997). Clinical efficacy of tamoxifen. *Oncology (Williston Park)*, 11(2 Suppl 1), 15-20. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9065922>
- Rothe, A., Jachimowicz, R. D., Borchmann, S., Madlener, M., Kessler, J., Reiners, K. S., Sauer, M., Hansen, H. P., Ullrich, R. T., Chatterjee, S., Borchmann, P., Yazaki, P., Koslowsky, T. C., Engert, A., Heukamp, L. C., Hallek, M., & von Strandmann, E. P. (2014). The bispecific immunoligand ULBP2-aCEA redirects natural killer cells to tumor cells and reveals potent anti-tumor activity against colon carcinoma. *Int J Cancer*, 134(12), 2829-2840. <https://doi.org/10.1002/ijc.28609>
- Sachs, N., de Ligt, J., Kopper, O., Gogola, E., Bounova, G., Weeber, F., Balgobind, A. V., Wind, K., Gracanin, A., Begthel, H., Korving, J., van Boxtel, R., Duarte, A. A., Lelieveld, D., van Hoeck, A., Ernst, R. F., Blokzijl, F., Nijman, I. J., Hoogstraat, M., . . . Clevers, H. (2018). A Living Biobank of Breast Cancer Organoids Captures Disease Heterogeneity. *Cell*, 172(1-2), 373-386 e310. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.11.010>
- Salgado, R., Denkert, C., Demaria, S., Sirtaine, N., Klauschen, F., Pruneri, G., Wienert, S., Van den Eynden, G., Baehner, F. L., Penault-Llorca, F., Perez, E. A., Thompson, E. A., Symmans, W. F., Richardson, A. L., Brock, J., Criscitiello, C., Bailey, H., Ignatiadis, M., Floris, G., . . . International, T. W. G. (2015). The evaluation of tumor-infiltrating

- lymphocytes (TILs) in breast cancer: recommendations by an International TILs Working Group 2014. *Ann Oncol*, 26(2), 259-271. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdu450>
- Sasmono, R. T., Oceandy, D., Pollard, J. W., Tong, W., Pavli, P., Wainwright, B. J., Ostrowski, M. C., Himes, S. R., & Hume, D. A. (2003). A macrophage colony-stimulating factor receptor-green fluorescent protein transgene is expressed throughout the mononuclear phagocyte system of the mouse. *Blood*, 101(3), 1155-1163. <https://doi.org/10.1182/blood-2002-02-0569>
- Sasse, S., Brockelmann, P. J., Momotow, J., Plutschow, A., Huttmann, A., Basara, N., Koenecke, C., Martin, S., Bentz, M., Grosse-Thie, C., Thorspecken, S., de Wit, M., Kobe, C., Dietlein, M., Tresckow, B. V., Fuchs, M., Borchmann, P., & Engert, A. (2022). AFM13 in patients with relapsed or refractory classical Hodgkin lymphoma: final results of an open-label, randomized, multicenter phase II trial. *Leuk Lymphoma*, 63(8), 1871-1878. <https://doi.org/10.1080/10428194.2022.2095623>
- Scheller, M., Foerster, J., Heyworth, C. M., Waring, J. F., Lohler, J., Gilmore, G. L., Shadduck, R. K., Dexter, T. M., & Horak, I. (1999). Altered development and cytokine responses of myeloid progenitors in the absence of transcription factor, interferon consensus sequence binding protein. *Blood*, 94(11), 3764-3771. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10572090>
- Scheller, M., Schonheit, J., Zimmermann, K., Leser, U., Rosenbauer, F., & Leutz, A. (2013). Cross talk between Wnt/beta-catenin and Irf8 in leukemia progression and drug resistance. *J Exp Med*, 210(11), 2239-2256. <https://doi.org/10.1084/jem.20130706>
- Schepers, K., Pietras, E. M., Reynaud, D., Flach, J., Binnewies, M., Garg, T., Wagers, A. J., Hsiao, E. C., & Passegue, E. (2013). Myeloproliferative neoplasia remodels the endosteal bone marrow niche into a self-reinforcing leukemic niche. *Cell Stem Cell*, 13(3), 285-299. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2013.06.009>
- Scheuer, W., Friess, T., Bartscher, H., Bossenmaier, B., Endl, J., & Hasmann, M. (2009). Strongly enhanced antitumor activity of trastuzumab and pertuzumab combination treatment on HER2-positive human xenograft tumor models. *Cancer Res*, 69(24), 9330-9336. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-4597>
- Schutgens, F., & Clevers, H. (2020). Human Organoids: Tools for Understanding Biology and Treating Diseases. *Annu Rev Pathol*, 15, 211-234. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathmechdis-012419-032611>
- Sener, S. F. (2020). Advances in axillary surgery for breast cancer 2019. *J Surg Oncol*, 121(1), 20-24. <https://doi.org/10.1002/jso.25591>
- Seung, E., Xing, Z., Wu, L., Rao, E., Cortez-Retamozo, V., Ospina, B., Chen, L., Beil, C., Song, Z., Zhang, B., Levit, M., Deng, G., Hebert, A., Kirby, P., Li, A., Poulton, E. J., Vicente, R., Garrigou, A., Piepenhagen, P., . . . Nabel, G. J. (2022). A trispecific antibody targeting HER2 and T cells inhibits breast cancer growth via CD4 cells. *Nature*, 603(7900), 328-334. <https://doi.org/10.1038/s41586-022-04439-0>
- Shamir, E. R., & Ewald, A. J. (2014). Three-dimensional organotypic culture: experimental models of mammalian biology and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 15(10), 647-664. <https://doi.org/10.1038/nrm3873>
- Sharma, P., Siddiqui, B. A., Anandhan, S., Yadav, S. S., Subudhi, S. K., Gao, J., Goswami, S., & Allison, J. P. (2021). The Next Decade of Immune Checkpoint Therapy. *Cancer Discov*, 11(4), 838-857. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-20-1680>
- Shin, B., & Rothenberg, E. V. (2023). Multi-modular structure of the gene regulatory network for specification and commitment of murine T cells. *Front Immunol*, 14, 1108368. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1108368>
- Shiovitz, S., & Korde, L. A. (2015). Genetics of breast cancer: a topic in evolution. *Ann Oncol*, 26(7), 1291-1299. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdv022>

- Slamon, D. J., Leyland-Jones, B., Shak, S., Fuchs, H., Paton, V., Bajamonde, A., Fleming, T., Eiermann, W., Wolter, J., Pegram, M., Baselga, J., & Norton, L. (2001). Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J Med*, 344(11), 783-792. <https://doi.org/10.1056/NEJM200103153441101>
- Sorlie, T., Perou, C. M., Tibshirani, R., Aas, T., Geisler, S., Johnsen, H., Hastie, T., Eisen, M. B., van de Rijn, M., Jeffrey, S. S., Thorsen, T., Quist, H., Matese, J. C., Brown, P. O., Botstein, D., Lonning, P. E., & Borresen-Dale, A. L. (2001). Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(19), 10869-10874. <https://doi.org/10.1073/pnas.191367098>
- Srivastava, V., Huycke, T. R., Phong, K. T., & Gartner, Z. J. (2020). Organoid models for mammary gland dynamics and breast cancer. *Curr Opin Cell Biol*, 66, 51-58. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2020.05.003>
- Stamova, S., Cartellieri, M., Feldmann, A., Bippes, C. C., Bartsch, H., Wehner, R., Schmitz, M., von Bonin, M., Bornhauser, M., Ehninger, G., Rieber, E. P., & Bachmann, M. (2011). Simultaneous engagement of the activatory receptors NKG2D and CD3 for retargeting of effector cells to CD33-positive malignant cells. *Leukemia*, 25(6), 1053-1056. <https://doi.org/10.1038/leu.2011.42>
- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2021). Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin*, 71(3), 209-249. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>
- Swain, S. M., Shastry, M., & Hamilton, E. (2023). Targeting HER2-positive breast cancer: advances and future directions. *Nat Rev Drug Discov*, 22(2), 101-126. <https://doi.org/10.1038/s41573-022-00579-0>
- Swann, J. W., Olson, O. C., & Passegue, E. (2024). Made to order: emergency myelopoiesis and demand-adapted innate immune cell production. *Nat Rev Immunol*, 24(8), 596-613. <https://doi.org/10.1038/s41577-024-00998-7>
- Tamura, T., Kurotaki, D., & Koizumi, S. (2015). Regulation of myelopoiesis by the transcription factor IRF8. *Int J Hematol*, 101(4), 342-351. <https://doi.org/10.1007/s12185-015-1761-9>
- Tan, G., Spillane, K. M., & Maher, J. (2023). The Role and Regulation of the NKG2D/NKG2D Ligand System in Cancer. *Biology (Basel)*, 12(8). <https://doi.org/10.3390/biology12081079>
- Taneja, P., Frazier, D. P., Kendig, R. D., Maglic, D., Sugiyama, T., Kai, F., Taneja, N. K., & Inoue, K. (2009). MMTV mouse models and the diagnostic values of MMTV-like sequences in human breast cancer. *Expert Rev Mol Diagn*, 9(5), 423-440. <https://doi.org/10.1586/erm.09.31>
- Tanner, M., Kapanen, A. I., Junttila, T., Raheem, O., Grenman, S., Elo, J., Elenius, K., & Isola, J. (2004). Characterization of a novel cell line established from a patient with Herceptin-resistant breast cancer. *Mol Cancer Ther*, 3(12), 1585-1592. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15634652>
- Taylor, A., Brady, A. F., Frayling, I. M., Hanson, H., Tischkowitz, M., Turnbull, C., Side, L., & Group, U. K. C. G. (2018). Consensus for genes to be included on cancer panel tests offered by UK genetics services: guidelines of the UK Cancer Genetics Group. *J Med Genet*, 55(6), 372-377. <https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2017-105188>
- Tiedt, R., Schomber, T., Hao-Shen, H., & Skoda, R. C. (2007). Pf4-Cre transgenic mice allow the generation of lineage-restricted gene knockouts for studying megakaryocyte and platelet function in vivo. *Blood*, 109(4), 1503-1506. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-04-020362>

- Tilsed, C. M., Fisher, S. A., Nowak, A. K., Lake, R. A., & Lesterhuis, W. J. (2022). Cancer chemotherapy: insights into cellular and tumor microenvironmental mechanisms of action. *Front Oncol*, 12, 960317. <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.960317>
- Toker, A., & Ohashi, P. S. (2019). Expression of costimulatory and inhibitory receptors in FoxP3(+) regulatory T cells within the tumor microenvironment: Implications for combination immunotherapy approaches. *Adv Cancer Res*, 144, 193-261. <https://doi.org/10.1016/bs.acr.2019.05.001>
- Upshaw, J. L., Arneson, L. N., Schoon, R. A., Dick, C. J., Billadeau, D. D., & Leibson, P. J. (2006). NKG2D-mediated signaling requires a DAP10-bound Grb2-Vav1 intermediate and phosphatidylinositol-3-kinase in human natural killer cells. *Nat Immunol*, 7(5), 524-532. <https://doi.org/10.1038/ni1325>
- Vivier, E., Nunes, J. A., & Vely, F. (2004). Natural killer cell signaling pathways. *Science*, 306(5701), 1517-1519. <https://doi.org/10.1126/science.1103478>
- von Strandmann, E. P., Hansen, H. P., Reiners, K. S., Schnell, R., Borchmann, P., Merkert, S., Simhadri, V. R., Draube, A., Reiser, M., Purr, I., Hallek, M., & Engert, A. (2006). A novel bispecific protein (ULBP2-BB4) targeting the NKG2D receptor on natural killer (NK) cells and CD138 activates NK cells and has potent antitumor activity against human multiple myeloma in vitro and in vivo. *Blood*, 107(5), 1955-1962. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-05-2177>
- Vyas, M., Schneider, A. C., Shatnyeva, O., Reiners, K. S., Tawadros, S., Kloess, S., Kohl, U., Hallek, M., Hansen, H. P., & Pogge von Strandmann, E. (2016). Mono- and dual-targeting triplebodies activate natural killer cells and have anti-tumor activity in vitro and in vivo against chronic lymphocytic leukemia. *Oncoimmunology*, 5(9), e1211220. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2016.1211220>
- Waibl Polania, J., Lerner, E. C., Wilkinson, D. S., Hoyt-Miggelbrink, A., & Fecci, P. E. (2021). Pushing Past the Blockade: Advancements in T Cell-Based Cancer Immunotherapies. *Front Immunol*, 12, 777073. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.777073>
- Wang, T., Sun, F., Wang, Y., Jiang, J., Pan, M., Yuan, M., Zhang, H., Du, X., Hezam, K., Song, K., Wang, M., & Zhang, J. (2018). NKG2D Immunoligand rG7S-MICA Enhances NK Cell-mediated Immunosurveillance in Colorectal Carcinoma. *J Immunother*, 41(3), 109-117. <https://doi.org/10.1097/CJI.0000000000000215>
- Wang, Y., Krivtsov, A. V., Sinha, A. U., North, T. E., Goessling, W., Feng, Z., Zon, L. I., & Armstrong, S. A. (2010). The Wnt/beta-catenin pathway is required for the development of leukemia stem cells in AML. *Science*, 327(5973), 1650-1653. <https://doi.org/10.1126/science.1186624>
- Wang, Y., Li, H., Xu, W., Pan, M., Qiao, C., Cai, J., Xu, J., Wang, M., & Zhang, J. (2020). BCMA-targeting Bispecific Antibody That Simultaneously Stimulates NKG2D-enhanced Efficacy Against Multiple Myeloma. *J Immunother*, 43(6), 175-188. <https://doi.org/10.1097/CJI.0000000000000320>
- Yao, Y., Xu, X., Yang, L., Zhu, J., Wan, J., Shen, L., Xia, F., Fu, G., Deng, Y., Pan, M., Guo, Q., Gao, X., Li, Y., Rao, X., Zhou, Y., Liang, L., Wang, Y., Zhang, J., Zhang, H., . . . Hua, G. (2020). Patient-Derived Organoids Predict Chemoradiation Responses of Locally Advanced Rectal Cancer. *Cell Stem Cell*, 26(1), 17-26 e16. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2019.10.010>
- Yarden, Y., & Sliwkowski, M. X. (2001). Untangling the ErbB signalling network. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2(2), 127-137. <https://doi.org/10.1038/35052073>
- Yusa, S., Catina, T. L., & Campbell, K. S. (2002). SHP-1- and phosphotyrosine-independent inhibitory signaling by a killer cell Ig-like receptor cytoplasmic domain in human NK cells. *J Immunol*, 168(10), 5047-5057. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.168.10.5047>
- Zhang, C., Zhang, J., Niu, J., Zhang, J., & Tian, Z. (2008). Interleukin-15 improves cytotoxicity of natural killer cells via up-regulating NKG2D and cytotoxic effector molecule

- expression as well as STAT1 and ERK1/2 phosphorylation. *Cytokine*, 42(1), 128-136. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2008.01.003>
- Zhang, L., Adileh, M., Martin, M. L., Klingler, S., White, J., Ma, X., Howe, L. R., Brown, A. M., & Kolesnick, R. (2017). Establishing estrogen-responsive mouse mammary organoids from single Lgr5(+) cells. *Cell Signal*, 29, 41-51. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2016.08.001>
- Zhang, X., Claerhout, S., Prat, A., Dobrolecki, L. E., Petrovic, I., Lai, Q., Landis, M. D., Wiechmann, L., Schiff, R., Giuliano, M., Wong, H., Fuqua, S. W., Contreras, A., Gutierrez, C., Huang, J., Mao, S., Pavlick, A. C., Froehlich, A. M., Wu, M. F., . . . Lewis, M. T. (2013). A renewable tissue resource of phenotypically stable, biologically and ethnically diverse, patient-derived human breast cancer xenograft models. *Cancer Res*, 73(15), 4885-4897. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-4081>
- Zhao, M., Perry, J. M., Marshall, H., Venkatraman, A., Qian, P., He, X. C., Ahamed, J., & Li, L. (2014). Megakaryocytes maintain homeostatic quiescence and promote post-injury regeneration of hematopoietic stem cells. *Nat Med*, 20(11), 1321-1326. <https://doi.org/10.1038/nm.3706>
- Zhao, Q., Pang, J., Yan, F., Jiang, Y., Cui, D., Liu, J., Jing, L., Li, Y., Liu, Z., Tao, L., Zhao, X., & Diao, A. (2021). Production of a novel bispecific protein ULBP1xCD19-scFv targeting the NKG2D receptor and CD19 to promote the activation of NK cells. *Protein Expr Purif*, 178, 105783. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2020.105783>
- Zhao, Z., Chen, X., Dowbaj, A. M., Sljukic, A., Bratlie, K., Lin, L., Fong, E. L. S., Balachander, G. M., Chen, Z., Soragni, A., Huch, M., Zeng, Y. A., Wang, Q., & Yu, H. (2022). Organoids. *Nat Rev Methods Primers*, 2. <https://doi.org/10.1038/s43586-022-00174-y>
- Zou, Y., Luo, W., Guo, J., Luo, Q., Deng, M., Lu, Z., Fang, Y., & Zhang, C. C. (2018). NK cell-mediated anti-leukemia cytotoxicity is enhanced using a NKG2D ligand MICA and anti-CD20 scfv chimeric protein. *Eur J Immunol*, 48(10), 1750-1763. <https://doi.org/10.1002/eji.201847550>

Aurélie Hérault

Régulation ciblée des cellules myéloïdes dans la moelle osseuse et activation accrue des lymphocytes T dans les tumeurs mammaires pour une amélioration des traitements anticancéreux

Résumé

Cette étude identifie NKG2D comme cible thérapeutique pour le cancer du sein, grâce à son expression sur les lymphocytes CD8+ tumoraux. Nous avons développé des anticorps bispécifiques HER2-CRB, ciblant HER2 et activant NKG2D. Ces anticorps induisent la production de cytokines et augmentent la cytotoxicité des cellules NK et CD8+, montrant leur efficacité en combinaison avec des TDB dans des modèles murins, offrant un potentiel en immunothérapie combinée.

Malgré l'augmentation de l'activité des cellules T, nous observons cependant de nombreux mécanismes de résistance impliquant les cellules myélocytaires. En utilisant l'imagerie, nous avons observé que, pendant la régénération, les progéniteurs granulocyte/macrophage (GMP) se regroupent en clusters distincts dans la moelle osseuse. La libération de signaux de la niche (SCF, IL-1 β , G-CSF, TGF β , CXCL4) et l'activation de réseaux de renouvellement favorisent cette formation. En leucémie, ces clusters sont constamment générés.

Mots clés : NKG2D, cellules T, GMP, clusters

Abstract

This study identifies NKG2D as a therapeutic target for breast cancer, due to its expression on tumor-infiltrating CD8+ lymphocytes. We developed bispecific antibodies, HER2-CRB, targeting HER2 and activating NKG2D. These antibodies induce cytokine production and enhance the cytotoxicity of NK and CD8+ cells, demonstrating their effectiveness in combination with TDBs in mouse models, offering potential for combined immunotherapy.

Despite the increased T cell activity, we observe numerous resistance mechanisms involving myelocytic cells. Using imaging, we observed that during regeneration, granulocyte/macrophage progenitors (GMPs) cluster into distinct groups within the bone marrow. The release of niche signals (SCF, IL-1 β , G-CSF, TGF β , CXCL4) and the activation of renewal networks promote this clustering. In leukemia, these clusters are continuously generated.

Keywords : NKG2D, T cells, GMP, clusters