Directour de

Avis de Soutenance

Madame Anne-Charlotte LE FLOCH

Biologie-Santé - Spécialité Oncologie

Soutiendra publiquement ses travaux de thèse intitulés

Immunomodulation des lymphocytes Vy9Vδ2 dans les leucémies aigües

dirigés par Monsieur Daniel OLIVE et Monsieur Norbert VEY

Thèse soutenue le *lundi 18 décembre 2023* à 14h00 Lieu: 232 Boulevard de Sainte-Marguerite 13009 Marseille Salle : IPC de conférence IPC2

Composition du jury proposé

M. Daniel OLIVE	Aix-Marseille Université	thèse
M. Norbert VEY	Aix-Marseille Université	Co-directeur de thèse
M. Christian RECHER	Université de Toulouse III Paul Sabatier	Examinateur
Mme Marie- Christine BENE	Service d'Hématologie Biologique, CHU de Nantes, Université de Nantes	Rapporteure
M. Emmanuel SCOTET	Centre de Recherche en Cancérologie et Immunologie Intégrée Nantes-Angers, Université de Nantes	Rapporteur

Mots-

Lymphocytes T Vy9Vδ2, Leucémies aigües myéloïdes, Leucémies aigües

lymphoblastiques, Immunotherapie autologue, Molécules BTN3A et BTN2A, Anticorps clés:

monoclonal

Résumé:

Chez l'adulte, les leucémies aigües (LA) myéloïde (LAM) ou lymphoblastique (LAL) représentent respectivement 80% et 20% des LA et sont associées à un mauvais pronostic avec une survie globale d'environ 30 à 40%. Les immunothérapies qui sont approuvées dans les LA concernent l'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques (HSCT) et plus récemment, les CAR-T cells ou les anticorps bispécifiques dans les LAL. La plupart des stratégies d'immunothérapie en développement reposent sur la modulation d'effecteurs cytotoxiques, comme les lymphocytes T (LT) cytotoxiques TCD8+ ou les cellules NK, qui montrent pour le moment des résultats limités. Une meilleure connaissance du microenvironnement immunitaire dans la LAM et dans la LAL, a permis de montrer qu'elles sont toutes deux la cible des LT $\gamma\delta$ (T $\gamma\delta$). Les T $\gamma\delta$ combinent des caractéristiques adaptatives et innées. Des analyses transcriptomiques de plusieurs milliers d'échantillons tumoraux ont montré qu'une infiltration plus importante en Τγδ avait la meilleure valeur pronostique. Les Τ γδ représentent 1 à 10 % des lymphocytes T (LT) périphériques et sont composés majoritairement de Vy9Vδ2, dont l'activation repose sur la reconnaissance de phosphoantigènes et fait aussi intervenir

les molécules BTN3A, cibles d'un ACm (AC monoclonal) agoniste (ICT01), actuellement évalué dans un essai de phase 1/2. Néanmoins, le mécanisme d'activation précis des Vγ9Vδ2 reste inconnu, tout autant que les déterminants qui modulent leurs fonctions, notamment dans les LA. Par ailleurs, la majorité des données pronostiques portant sur les Τγδ concernent la période post-HSCT et la plupart des essais concernent la modulation de Τγδ allogéniques. Dans les LA, le rôle des Τγδ au diagnostic et les possibilités d'immunothérapie autologue ont donc été sous-évaluées. Mon travail de thèse s'est focalisé sur 3 axes : 1-Rôle pronostique et fonctions des Vy9Vδ2 au diagnostic Nous avons pu analyser l'impact pronostique des altérations des Tyδ, en utilisant les données issues de 4 cohortes de LAM nouvellement diagnostiquées (ND) analysées dans le laboratoire (n= 198). Nous avons mis en évidence un impact délétère de fréquences faibles en Vy9Vδ2 sur la survie, ces dernières étaient associées à des altérations phénotypiques des Vγ9Vδ2 et à une baisse du niveau d'expression de BTN3A à la surface des blastes. Nous avons également pu analyser l'impact pronostique des altérations des $Ty\delta$, en utilisant les données d'une cohorte de 28 patients atteints de LAL ND. En comparant les patients qui vont rester en rémission complète (RC) à ceux qui vont rechuter (REL), des analyses non supervisées ont révélé des altérations communes entre les T CD8+ et les Τ γδ des patients REL. Nous avons également démontré que la signature immunophénotypique des Τγδ était la plus discriminante entre les deux groupes, et plus particulièrement celle des Vy9Vδ2. Qu'il s'agisse de Vy9Vδ2 issus de patients LAM ou LAL, nous sommes parvenus à les expandre et à les faire dégranuler quel que soit le groupe pronostique. 2-Rôle des molécules BNT2A et BTN3A dans les LA Nous avons analysé la contribution respective de la molécule BTN2A ainsi que celle de BTN3A dans la cytotoxicité de blastes myéloïdes et lymphoïdes, issus de lignées et de cellules primaires. Dans le cadre d'une collaboration avec Imcheck Therapeutics, nous avons également analysé l'activité in vitro et in vivo d'un nouvel ACm anti-BTN2A1 agoniste, le 107G3B5. 3- Pharmacomodulation des Vy9Vδ2 dans les LA Plusieurs drogues ont été étudiées pour leurs capacités à moduler les fonctions des Vy9Vδ2 dans les LA. Mon projet a notamment porté sur les effets d'une combinaison venetoclax-azacitidine et ICT01, qui a permis d'augmenter la cytotoxicité de Vγ9Vδ2 contre des blastes de LAM. A la fois dans la LAL comme dans la LAM, nous avons pu montrer que les Vy9Vδ2 avaient un impact pronostique important et qu'il était possible de les immunomoduler dans le cadre d'une stratégie autologue.

Résumé

Chez l'adulte, les leucémies aigües (LA) myéloïde (LAM) ou lymphoblastique (LAL) représentent respectivement 80% et 20% des LA et sont associées à un mauvais pronostic avec une survie globale d'environ 30 à 40%. Les immunothérapies qui sont approuvées dans les LA concernent l'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques (HSCT) et plus récemment, les CAR-T cells ou les anticorps bispécifiques dans les LAL. La plupart des stratégies d'immunothérapie en développement reposent sur la modulation d'effecteurs cytotoxiques, comme les lymphocytes T (LT) cytotoxiques TCD8 $^+$ ou les cellules NK, qui montrent pour le moment des résultats limités. Une meilleure connaissance du microenvironnement immunitaire dans la LAM et dans la LAL, a permis de montrer qu'elles sont toutes deux la cible des LT $\gamma\delta$ ($T\gamma\delta$).

Les Τγδ combinent des caractéristiques adaptatives et innées. Des analyses transcriptomiques de plusieurs milliers d'échantillons tumoraux ont montré qu'une infiltration plus importante en Τγδ avait la meilleure valeur pronostique. Les T γδ représentent 1 à 10 % des lymphocytes T (LT) périphériques et sont composés majoritairement de Vγ9Vδ2, dont l'activation repose sur la reconnaissance de phosphoantigènes et fait aussi intervenir les molécules BTN3A, cibles d'un ACm (AC monoclonal) agoniste (ICT01), actuellement évalué dans un essai de phase 1/2. Néanmoins, le mécanisme d'activation précis des Vγ9Vδ2 reste inconnu, tout autant que les déterminants qui modulent leurs fonctions, notamment dans les LA. Par ailleurs, la majorité des données pronostiques portant sur les Τγδ concernent la période post-HSCT et la plupart des essais concernent la modulation de Τγδ allogéniques.

Dans les LA, le rôle des $T\gamma\delta$ au diagnostic et les possibilités d'immunothérapie autologue ont donc été sous-évaluées.

Mon travail de thèse s'est focalisé sur 3 axes :

1-Rôle pronostique et fonctions des Vγ9Vδ2 au diagnostic

Nous avons pu analyser l'impact pronostique des altérations des Tyδ, en utilisant les données issues de 4 cohortes de LAM nouvellement diagnostiquées (ND) analysées dans le laboratoire (n=

198). Nous avons mis en évidence un impact délétère de fréquences faibles en $V\gamma9V\delta2$ sur la survie, ces dernières étaient associées à des altérations phénotypiques des $V\gamma9V\delta2$ et à une baisse du niveau d'expression de BTN3A à la surface des blastes.

Nous avons également pu analyser l'impact pronostique des altérations des $T\gamma\delta$, en utilisant les données d'une cohorte de 28 patients atteints de LAL ND. En comparant les patients qui vont rester en rémission complète (RC) à ceux qui vont rechuter (REL), des analyses non supervisées ont révélé des altérations communes entre les T CD8+ et les T $\gamma\delta$ des patients REL. Nous avons également démontré que la signature immunophénotypique des $T\gamma\delta$ était la plus discriminante entre les deux groupes, et plus particulièrement celle des $V\gamma9V\delta2$.

Qu'il s'agisse de $V\gamma9V\delta2$ issus de patients LAM ou LAL, nous sommes parvenus à les expandre et à les faire dégranuler quel que soit le groupe pronostique.

2-Rôle des molécules BNT2A et BTN3A dans les LA

Nous avons analysé la contribution respective de la molécule BTN2A ainsi que celle de BTN3A dans la cytotoxicité de blastes myéloïdes et lymphoïdes, issus de lignées et de cellules primaires. Dans le cadre d'une collaboration avec Imcheck Therapeutics, nous avons également analysé l'activité *in vitro* et *in vivo* d'un nouvel ACm anti-BTN2A1 agoniste, le 107G3B5.

3- Pharmacomodulation des Vγ9Vδ2 dans les LA

Plusieurs drogues ont été étudiées pour leurs capacités à moduler les fonctions des $V\gamma9V\delta2$ dans les LA. Mon projet a notamment porté sur les effets d'une combinaison venetoclax-azacitidine et ICT01, qui a permis d'augmenter la cytotoxicité de $V\gamma9V\delta2$ contre des blastes de LAM.

A la fois dans la LAL comme dans la LAM, nous avons pu montrer que les $V\gamma9V\delta2$ avaient un impact pronostique important et qu'il était possible de les immunomoduler dans le cadre d'une stratégie autologue.

Keywords : Lymphocytes T Vγ9Vδ2; Leucémies aigües myéloïdes; Leucémies aigües lymphoblastiques; Immunotherapie autologue; Molécules BTN3A et BTN2A; Anticorps monoclonal.

Abstract

In adults, acute myeloid leukaemia (AML) and acute lymphoblastic leukaemia (ALL) account for 80% and 20% of acute leukemias (AL), respectively, and are associated with a poor prognosis, with a 5-year overall survival of approximately 30-40%. Approved immunotherapies for AL include haematopoietic stem cell transplantation (HSCT) and, more recently, CAR-T cells or bispecific antibodies for ALL patients. Most immunotherapeutic strategies in development rely on modulation of cytotoxic effectors, such as $\alpha\beta$ T cells or NK cells, with limited results to date. Recent findings have led to a better understanding of the immune microenvironment in ALL and in AML, and show that both are targeted by $\gamma\delta$ T cells ($T\gamma\delta$).

 $\gamma\delta$ T cells combine adaptive and innate properties. Transcriptome analyses of human tumors reveal that high $\gamma\delta$ T infiltration has the best prognostic value in comparison to other immune. $\gamma\delta$ T cells represent 1-10% of peripheral T cells and are predominantly composed of V γ 9V δ 2 T cells, which are the major subtype of blood $\gamma\delta$ T cells and are activated by non-peptidic phosphorylated metabolites, called phosphoantigens (pAgs), produced by transformed or infected cells, but V γ 9V δ 2 T cell activation also involves BTN3A molecules, targets of an agonist mAb (monoclonal antibody) called ICT01, currently evaluated in a phase 1/2 trial. However, the precise mechanism of V γ 9V δ 2 activation remains unknown, as do the determinants that modulate their functions, particularly in AL. Furthermore, the majority of prognostic data on $\gamma\delta$ T cells relate to the post-transplant period, and most studies involve allogeneic $\gamma\delta$ T cell modulation, often after HSCT.

In AL, the role of $V\gamma 9V\delta 2$ T cells at diagnosis and the opportunities of autologous immunotherapy have therefore been underestimated.

My thesis work focused on 3 main areas:

1-Prognostic role and functions of $Vy9V\delta2$ at diagnosis.

Our first study aimed at determining the prognostic impact of $T\gamma\delta$ alterations using data from 4 cohorts of newly diagnosed (ND) AML patients analysed in the laboratory (n= 198). We were able to demonstrate a negative effect of lower $V\gamma9V\delta2$ T-cell frequencies on survival. Immunophenotypic

alterations observed in patients with lower $V\gamma 9V\delta 2$ T-cells included a loss of some cytotoxic $V\gamma 9V\delta 2$ T-cell subsets and a decreased expression of BTN3A on the surface of blasts.

We also investigated the prognostic impact of circulating $\gamma\delta$ T cell alterations using high-dimensional analysis in a cohort of newly-diagnosed adult ALL patients (10 B-ALL, 9 Philadelphia+ALL, and 9 T-ALL). Our analysis revealed common alterations in CD8+ T cells and $\gamma\delta$ T cells of relapsed patients. We demonstrated that the $\gamma\delta$ T cell signature was the most discriminative between relapsed and disease-free groups and more particularly V γ 9V δ 2 T-cell signature.

Whether in PBMCs from AML or ALL patients, we were able to expand and degranulate them regardless of the prognostic group.

2-Role of the molecules BNT2A and BTN3A in AL

We have analysed the respective contributions of BTN2A and BTN3A to the cytotoxicity of myeloid and lymphoid blasts, both from cell lines and primary cells. In collaboration with the Imcheck Therapeutics laboratory, we also analysed the *in vitro* and *in vivo* activity of a new anti-BTN2A1 agonist mAb, called 107G3B5.

3- Pharmacomodulation of Vγ9Vδ2 T cells in AL

We were able to study the effect of several drugs on their ability to modulate $V\gamma9V\delta2$ functions in leukemic blasts. In particular, my project focused on the effects of a combination of venetoclax-azacitidine and ICT01.

Here, we show that $V\gamma9V\delta2$ T cells from both ND ALL and AML patients have an important prognostic impact and that we are able to maximize their own antileukemic functions. Our findings provide a strong rationale for further monitoring and triggering of $V\gamma9V\delta2$ T cells in AL, including in the autologous setting.

Keywords: Vγ9Vδ2 T cells; Acute myeloid leukemia; Acute lymphoblastic leukemia; Autologous immunotherapy; BTN3A and BTN2A molecules; Agonist monoclonal antibody