



HAL
open science

Place de l'immunothérapie par les cellules natural killer dans le traitement des tumeurs primitives cérébrales : étude in vitro du mécanisme d'action des cellules NK envers 3 lignées de médulloblastome

Manon Mouginot

► To cite this version:

Manon Mouginot. Place de l'immunothérapie par les cellules natural killer dans le traitement des tumeurs primitives cérébrales : étude in vitro du mécanisme d'action des cellules NK envers 3 lignées de médulloblastome. Sciences pharmaceutiques. 2019. hal-03297920

HAL Id: hal-03297920

<https://hal.univ-lorraine.fr/hal-03297920>

Submitted on 23 Jul 2021

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-thesesexercice-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

UNIVERSITE DE LORRAINE

2019

FACULTE DE PHARMACIE

MEMOIRE
du DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES
de BIOLOGIE MEDICALE

Soutenu devant le Jury Interrégional

Le 25.06.2019

Par MOUGINOT Manon
née le 24.10.1991

Conformément aux dispositions de l'arrêté

du 4 octobre 1988 tient lieu de

THESE
pour le DIPLOME D'ETAT
de DOCTEUR en PHARMACIE

Titre

**PLACE DE L'IMMUNOTHERAPIE PAR LES CELLULES NATURAL
KILLER DANS LE TRAITEMENT DES TUMEURS PRIMITIVES
CEREBRALES, ETUDE IN VITRO DU MECANISME D'ACTION
DES CELLULES NK ENVERS 3 LIGNEES DE
MEDULLOBLASTOME**

Membres du Jury

Président : Mme le Professeur D. BENSOUSSAN, PU-PH, CHRU Nancy (Co-directrice)
Directeur : Mme le Professeur V. DECOT, PU-PH, CHRU Nancy
Juges : M le Professeur P. CHASTAGNER, PU-PH, CHRU Nancy
M le Professeur M. DE CARVALHO, PU-PH, CHRU Nancy
M le Docteur C. BOURA, MCU, Faculté de Pharmacie Nancy

UNIVERSITÉ DE LORRAINE
FACULTÉ DE PHARMACIE
Année universitaire 2018-2019

DOYEN

Raphaël DUVAL

Vice-Doyen

Julien PERRIN

Directrice des études

Marie SOCHA

Conseil de la Pédagogie

Présidente, Brigitte LEININGER-MULLER

Vice-Présidente, Alexandrine LAMBERT

Collège d'Enseignement Pharmaceutique Hospitalier

Présidente, Béatrice DEMORE

Commission Prospective Facultaire

Président, Christophe GANTZER

Vice-Président, Jean-Louis MERLIN

Commission de la Recherche

Présidente, Caroline GAUCHER

Chargés de Mission

Communication

Innovation pédagogique

Référente ADE

Référent dotation sur projet (DSP)

Marie-Paule SAUDER

Alexandrine LAMBERT

Virginie PICHON

Dominique DECOLIN

Responsabilités

Filière Officine

Filière Industrie

Filière Hôpital

Pharma Plus ENSIC

Pharma Plus ENSAIA

Pharma Plus ENSGSI

Cellule de Formation Continue et Individuelle

Commission d'agrément des maîtres de stage

ERASMUS

Caroline PERRIN-SARRADO

Julien GRAVOULET

Isabelle LARTAUD,

Jean-Bernard REGNOUF de VAINS

Béatrice DEMORE

Marie SOCHA

Jean-Bernard REGNOUF de VAINS

Xavier BELLANGER

Igor CLAROT

Luc FERRARI

François DUPUIS

Mihayl VARBANOV

DOYENS HONORAIRES

Chantal FINANCE

Francine PAULUS

Claude VIGNERON

PROFESSEURS EMERITES

Jeffrey ATKINSON

Max HENRY

Claude VIGNERON

PROFESSEURS HONORAIRES

Pierre DIXNEUF

Chantal FINANCE

Marie-Madeleine GALTEAU

Thérèse GIRARD

Michel JACQUE

Pierre LABRUDE

Vincent LOPPINET

Alain NICOLAS

MAITRES DE CONFERENCES HONORAIRES

Monique ALBERT

Mariette BEAUD

François BONNEAUX

Gérald CATAU

Jean-Claude CHEVIN

Jocelyne COLLOMB

Bernard DANGIEN

Marie-Claude FUZELLIER

Janine SCHWARTZBROD
Louis SCHWARTZBROD

ASSISTANTS HONORAIRES

Marie-Catherine BERTHE
Annie PAVIS

Françoise HINZELIN
Marie-Hélène LIVERTOUX
Bernard MIGNOT
Blandine MOREAU
Dominique NOTTER
Francine PAULUS
Christine PERDICAKIS
Marie-France POCHON
Anne ROVEL
Gabriel TROCKLE
Maria WELLMAN-ROUSSEAU
Colette ZINUTTI

ENSEIGNANTS

Section CNU*

Discipline d'enseignement

PROFESSEURS DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS

Danièle BENSOUSSAN-LEJZEROWICZ	82	<i>Thérapie cellulaire</i>
Jean-Louis MERLIN	82	<i>Biologie cellulaire</i>
Jean-Michel SIMON	81	<i>Economie de la santé, Législation pharmaceutique</i>
Nathalie THILLY	81	<i>Santé publique et Epidémiologie</i>

PROFESSEURS DES UNIVERSITES

Christine CAPDEVILLE-ATKINSON	86	<i>Pharmacologie</i>
Igor CLAROT	85	<i>Chimie analytique</i>
Joël DUCOURNEAU	85	<i>Biophysique, Acoustique, Audioprothèse</i>
Raphaël DUVAL	87	<i>Microbiologie clinique</i>
Béatrice FAIVRE	87	<i>Hématologie, Biologie cellulaire</i>
Luc FERRARI	86	<i>Toxicologie</i>
Pascale FRIANT-MICHEL	85	<i>Mathématiques, Physique</i>
Christophe GANTZER	87	<i>Microbiologie</i>
Frédéric JORAND	87	<i>Eau, Santé, Environnement</i>
Isabelle LARTAUD	86	<i>Pharmacologie</i>
Dominique LAURAIN-MATTAR	86	<i>Pharmacognosie</i>
Brigitte LEININGER-MULLER	87	<i>Biochimie</i>
Pierre LEROY	85	<i>Chimie physique</i>
Philippe MAINCENT	85	<i>Pharmacie galénique</i>
Patrick MENU	86	<i>Physiologie</i>
Jean-Bernard REGNOUF de VAINS	86	<i>Chimie thérapeutique</i>
Bertrand RIHN	87	<i>Biochimie, Biologie moléculaire</i>

MAITRES DE CONFÉRENCES DES UNIVERSITÉS - PRATICIENS HOSPITALIERS

Béatrice DEMORE	81	<i>Pharmacie clinique</i>
Alexandre HARLE	82	<i>Biologie cellulaire oncologique</i>
Julien PERRIN	82	<i>Hématologie biologique</i>
Loïc REPEL	82	<i>Biothérapie</i>
Marie SOCHA	81	<i>Pharmacie clinique, thérapeutique et biotechnique</i>

MAITRES DE CONFÉRENCES

Sandrine BANAS	87	<i>Parasitologie</i>
Xavier BELLANGER	87	<i>Parasitologie, Mycologie médicale</i>
Emmanuelle BENOIT	86	<i>Communication et Santé</i>
Isabelle BERTRAND	87	<i>Microbiologie</i>
Michel BOISBRUN	86	<i>Chimie thérapeutique</i>
Ariane BOUDIER	85	<i>Chimie Physique</i>
Cédric BOURA	86	<i>Physiologie</i>
Joël COULON	87	<i>Biochimie</i>
Sébastien DADE	85	<i>Bio-informatique</i>

Dominique DECOLIN	85	<i>Chimie analytique</i>
Roudayna DIAB	85	<i>Pharmacie galénique</i>
Natacha DREUMONT	87	<i>Biochimie générale, Biochimie clinique</i>
Florence DUMARCAY	86	<i>Chimie thérapeutique</i>
François DUPUIS	86	<i>Pharmacologie</i>
Reine EL OMAR	86	<i>Physiologie</i>
Adil FAIZ	85	<i>Biophysique, Acoustique</i>
Anthony GANDIN	87	<i>Mycologie, Botanique</i>
Caroline GAUCHER	86	<i>Chimie physique, Pharmacologie</i>
Stéphane GIBAUD	86	<i>Pharmacie clinique</i>
Thierry HUMBERT	86	<i>Chimie organique</i>
Olivier JOUBERT	86	<i>Toxicologie, Sécurité sanitaire</i>
Alexandrine LAMBERT	85	<i>Informatique, Biostatistiques</i>
Julie LEONHARD	86/01	<i>Droit en Santé</i>
Christophe MERLIN	87	<i>Microbiologie environnementale</i>
Maxime MOURER	86	<i>Chimie organique</i>
Coumba NDIAYE	86	<i>Epidémiologie et Santé publique</i>
Arnaud PALLOTTA [⊠]	86	<i>Bioanalyse du médicament</i>
Marianne PARENT	85	<i>Pharmacie galénique</i>
Caroline PERRIN-SARRADO	86	<i>Pharmacologie</i>
Virginie PICHON	85	<i>Biophysique</i>
Sophie PINEL	85	<i>Informatique en Santé (e-santé)</i>
Anne SAPIN-MINET	85	<i>Pharmacie galénique</i>
Marie-Paule SAUDER	87	<i>Mycologie, Botanique</i>
Guillaume SAUTREY	85	<i>Chimie analytique</i>
Rosella SPINA	86	<i>Pharmacognosie</i>
Sabrina TOUCHET	86	<i>Pharmacochimie</i>
Mihayl VARBANOV	87	<i>Immuno-Virologie</i>
Marie-Noëlle VAULTIER	87	<i>Mycologie, Botanique</i>
Emilie VELOT	86	<i>Physiologie-Physiopathologie humaines</i>
Mohamed ZAIYOU	87	<i>Biochimie et Biologie moléculaire</i>

PROFESSEUR ASSOCIE

Julien GRAVOULET	86	<i>Pharmacie clinique</i>
Anne MAHEUT-BOSSER	86	<i>Sémiologie</i>

PROFESSEUR AGREGE

Christophe COCHAUD	11	<i>Anglais</i>
--------------------	----	----------------

[⊠] *En attente de nomination*

***Disciplines du Conseil National des Universités :**

80 : Personnels enseignants et hospitaliers de pharmacie en sciences physico-chimiques et ingénierie appliquée à la santé

81 : Personnels enseignants et hospitaliers de pharmacie en sciences du médicament et des autres produits de santé

82 : Personnels enseignants et hospitaliers de pharmacie en sciences biologiques, fondamentales et cliniques

85 ; Personnels enseignants-chercheurs de pharmacie en sciences physico-chimiques et ingénierie appliquée à la santé

86 : Personnels enseignants-chercheurs de pharmacie en sciences du médicament et des autres produits de santé

87 : Personnels enseignants-chercheurs de pharmacie en sciences biologiques, fondamentales et cliniques

11 : Professeur agrégé de lettres et sciences humaines en langues et littératures anglaises et anglo-saxonnes

SERMENT DES APOTHICAIRES



Je jure, en présence des maîtres de la Faculté, des conseillers de l'ordre des pharmaciens et de mes condisciples :

D' honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.

D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine ; en aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.



« LA FACULTE N'ENTEND DONNER AUCUNE APPROBATION,
NI IMPROBATION AUX OPINIONS EMISES DANS LES
THESES, CES OPINIONS DOIVENT ETRE CONSIDEREES
COMME PROPRES A LEUR AUTEUR ».

REMERCIEMENTS

Aux membres du Jury,

**Mme le Professeur Danièle BENSOUSSAN,
Présidente du Jury et co directrice de thèse**

PU-PH, Chef de Service de l'Unité de Thérapie Cellulaire et banque de Tissus, CHRU de Nancy

Pour votre gentillesse, votre écoute et la confiance que vous m'avez accordée. Je vous remercie de m'avoir ouvert les portes de l'UTCT, de m'avoir fait découvrir la thérapie cellulaire et le monde de la recherche. Et même si je ne poursuis pas dans cette direction, je garderai toujours un excellent souvenir de ces quelques mois passés dans votre service. Aujourd'hui vous me faites l'honneur de présider ce jury, soyez assurée de mon grand respect et de ma sincère reconnaissance.

**Mme le Professeur Véronique DECOT,
Directrice de thèse**

PU-PH, Unité de Thérapie Cellulaire et banque de Tissus, CHRU de Nancy

Pour votre disponibilité, votre implication et vos précieux conseils. Je vous remercie sincèrement de m'avoir accompagnée pendant mon année recherche et de m'avoir fait découvrir les cellules NK en long, en large et en travers. Dans mon futur métier de biologiste, c'est avec un autre regard que j'observerai au microscope ces grands lymphocytes granuleux.

M le Professeur Pascal CHASTAGNER,

PU-PH, Chef du service d'onco-hématologie pédiatrique, CHRU de Nancy

C'est pour moi un honneur de vous compter parmi mes juges. J'apprécie que vous puissiez évaluer mon travail en qualité de clinicien et spécialiste en onco-hématologie.

M le Professeur Marcelo DE CARVALHO,

PU-PH, Laboratoire d'immunologie, CHRU de Nancy

Vous me faites l'honneur d'accepter de juger ce travail et je vous en suis reconnaissante. J'apprécie que vous puissiez évaluer mon travail en tant que biologiste et spécialiste en immunologie.

M le Docteur Cédric BOURA,

MCU, faculté de Pharmacie de Nancy

Pour l'aide et la disponibilité que vous m'avez accordées pendant mon année recherche. Je vous remercie de m'avoir fait découvrir l'expérimentation animale. Ce fut un réel plaisir de travailler avec vous durant ces quelques mois passés.

TABLE DES MATIERES

Liste des abréviations	10
Listes des figures	14
Listes des tableaux	15
I. Introduction	16
A. Tumeurs primitives cérébrales et tumeurs primitives du système nerveux central.....	17
1. Classification.....	17
2. Epidémiologie et pronostic.....	20
3. Microenvironnement et résistance aux traitements.....	24
4. Thérapie actuelles des tumeurs cérébrales primitives et limites	26
5. Focus sur le médulloblastome	27
6. Conclusion	35
B. L'immunothérapie dans le traitement des cancers	36
1. Pourquoi l'immunothérapie	36
2. Les différentes approches.....	36
C. Les cellules Natural killer.....	38
1. Présentation.....	38
2. Caractérisation.....	38
3. Récepteurs activateurs et inhibiteurs	39
4. Les mécanismes de cytotoxicité	46
D. Utilisation des cellules Natural Killer en immunothérapie antitumorale	49
1. Intérêt de l'utilisation des cellules NK en immunothérapie antitumorale	49
2. Modèles d'étude des tumeurs cérébrales <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i> chez l'animal	50
3. Le transfert adoptif de cellules NK	51
4. Utilisation des cellules NK dans le traitement des tumeurs cérébrales primitives	56
5. Thérapie par cellules NK dans le traitement du glioblastome	56
6. Thérapie par cellules NK dans le traitement du médulloblastome	69
II. Objectifs	72
III. Matériels et Méthodes	74
A. Préparation des cellules	74
1. Isolement des cellules NK.....	74
2. Culture et prolifération des cellules NK	76
3. Congélation et décongélation des cellules NK	76
B. Cellules cibles	78
1. Lignée K562 témoin	78
2. Lignées de médulloblastome	78
C. Analyses <i>in vitro</i>	80
1. Cytométrie en flux	80

2.	Test de conjugaison des cellules NK avec les cellules cibles	82
3.	Test de dégranulation par Elispot Granzyme B.....	84
4.	Test de cytotoxicité au 7AAD	86
5.	Test de cytotoxicité mesurant la libération d'adénylate kinase.....	88
6.	Test de coculture	89
D.	Analyses statistiques	90
IV.	Résultats.....	92
A.	Phénotypage des lignées cellulaires de médulloblastome	92
B.	Test de conjugaison des cellules NK avec les cellules cibles.....	94
C.	Test de dégranulation par Elispot Granzyme B	96
D.	Test de cytotoxicité au 7AAD	98
E.	Test de cytotoxicité mesurant la libération d'adénylate kinase	100
F.	Test de coculture	102
G.	Evaluation de l'impact des manipulations <i>ex vivo</i> sur la fonctionnalité des cellules NK	104
V.	Discussion.....	108
VI.	Conclusion et perspectives	112
	Bibliographie.....	114
	Annexes.....	122

LISTE DES ABRÉVIATIONS

7AAD : 7-aminoactinomycine D
ADCC : Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity
AIF : Apoptosis Inducing Factor
AK : Adénylate Kinase
AMM : Autorisation de Mise sur le Marché
APAF1 : Apoptotic Peptidase Activating Factor 1
APC : AlloPhycoCyanine
B7-H 1/3/4/6: B7 homolog 1/3/4/6
BAT3 : HLA-B Associated Transcript-3
BB515 : Brilliant Blue 515
BCG : Vaccin bilié de Calmette et Guérin
BCIP : 5-Bromo-4-Chloro-3'-Indolyphosphate P-toluidine
BID : BH3 Interacting-Domain death agonist
BPF : Bonnes Pratiques de Fabrication
BSA : Albumine de Sérum Bovin
CAD : CAD Caspase-Activated Deoxyribonuclease
CAF : Fibroblastes associés aux cancers
CAR : Récepteur d'Antigène Chimérique
CD : Cluster of Differentiation
CELMEA : Comité d'Ethique de Lorraine en Matière d'Expérimentation Animale
CIM-O : Classification Internationale des Maladies pour l'Oncologie (ICD-O en anglais)
CMF : CytoMétrie en Flux
CMH1 : Complexe Majeur d'Histocompatibilité de classe 1
CMN : Cellules Mononucléées
CMV : CytoMégaloVirus
CRAN : Centre de Recherche en Automatique de Nancy (UMR 7039)
CSH : Cellules Souches Hématopoïétiques
CSM : Cellules Souches Mésenchymateuses
CTO : Cell Tracker Orange
DAP12 : DNAX Activating Protein
DMSO : Diméthylsulfoxyde
E/C : ratio cellules Effectrices/cellules Cibles
EGF : Epidermal Growth Factor
EGFR : Epidermal Growth Factor Receptor
EndoG : Endonuclease G
FasL : Fas Ligand
FDA : Food and Drug Administration (administration américaine des aliments & médicaments)
FITC : IsoThioCyanate de Fluoresceine

FSTL5 : Follistatin-Like protein 5
GBM : Glioblastome
GEMMs : Genetically Engineered Mouse Models
GH : Growth Hormone
GvHD : Graft-versus-Host Disease
HER : Human EGF Receptor related
HLA : Human Leukocyte Antigen
IFN : Interféron
IFN : Interféron
IL : InterLeukine
ILT : Immunoglobulin-Like Transcript
IMoPA : Ingénierie Moléculaire et Physiopathologie Articulaire
INSEE : Institut National de la Statistique et des Etudes Economiques
IRS : Immunoreactivity Scoring System
IT : intratumorale (voie)
ITAM : Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif
ITIM : Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibition Motif
IV : intraveineuse (voie)
KARAP : Killer cell Activating Receptor-Associated Protein
KIR : Killer cell Immunoglobulin-like Receptor
LAK : Lymphokine-Activated Killer
LAL B : Leucémie Aigue Lymphoblastique B
LBDGC : Lymphome B Diffus à Grandes Cellules
LCA : forme à Grandes Cellules/Anaplastique
LGL : Large Granular Lymphocytes (leucémie à grands lymphocytes granuleux)
LIR : Leucocyte Immunoglobulin-like Receptor
LMPGBCB : Lymphome Médiastinal Primitif à Grandes Cellules B
LT : Lymphocyte T
MACS : Magnetic-Activated Cell Sorting
MBEN : MédulloBlastome à Nodularité Extensive
MDSC : Cellules Myéloïdes Suppressives
MIC : Major histocompatibility complex class I related Chain A/B
NBT : Nitro blue tetrazolium chloride
NCAM : Neural Cell Adhesion Molecule
NCR : Natural Cytotoxicity Receptors
NK-EM : exosomes mimétiques de NK
NKG2D : Natural Killer Group 2D
NKT : lymphocyte Natural Killer T
OMS : Organisation Mondiale de la Santé (WHO en anglais)

PAL : Phosphatase Alcaline
PAP : Phosphatase Acide Prostatique
PBMC : Peripheral Blood Mononuclear Cell
PBS : Phosphate Buffered Saline
PCNA : Proliferating Cell Nuclear Antigen
PD1 : Programmed cell Death 1
PDGFR : Platelet-Derived Growth Factor Receptor
PDGF DD : Platelet-Derived Growth Factor (sous type) DD
PDL1 : Programmed cell Death-ligand 1
PE : Phyco-Erythrine
PerCP : Périidine Chlorophylle-Protéine
PFA : Paraformaldehyde
PfEMP1 : P. falciparum Erythrocyte Membrane Protein-1 a
PHA : Phytohémagglutinine
PI3K : Phosphoinositide 3-Kinase
PNET : Tumeurs Primitives NeuroEctodermiques
PVR : Polio Virus Receptor
ROBO1: Roundabout guidance Receptor 1
RPMI : Roswell Park Memorial Institute medium
scFV : single chain Variable Fragment
SCID : Severe Combined ImmunoDeficiency
SEM : Erreur Standard à la Moyenne
SFC : Spots Forming Cells
SHH : Sonic Hedgehog
SHP : Small Heterodimer Partner (tyrosine phosphatase)
SI : Système Immunitaire
SNC : Système Nerveux Central
SUFU : Suppressor of fused
SVF : Sérum Veau Fœtal
TAM : Macrophages associés aux tumeurs
TNF : Tumor-Necrosis Factor
TP53 : Tumor Protein 53
TRAIL : TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand
ULBP : UL-16 binding protein
UMR : Unité Mixte de Recherche
WNT : Wingless

LISTES DES FIGURES

FIGURE 1 CLASSIFICATION OMS 2016 DES TUMEURS DU SNC (LOUIS ET AL., 2016)	19
FIGURE 2 DISTRIBUTION DES TUMEURS DU SNC PAR PRONOSTIC (OSTROM ET AL., 2014).....	22
FIGURE 3 DISTRIBUTION DES TUMEURS DU SNC PAR TYPE HISTOLOGIQUES CHEZ LES ADULTES (OSTROM ET AL., 2014).....	23
FIGURE 4 DISTRIBUTION DES TUMEURS DU SNC PAR TYPE HISTOLOGIQUES CHEZ LES ENFANTS (0-14ANS) (OSTROM ET AL., 2014).....	23
FIGURE 5 : MICROENVIRONNEMENT TUMORAL (GOLAN ET AL., 2018)	25
FIGURE 6 : REPARTITION DES GROUPES MOLECULAIRES DE MEDULLOBLASTOME EN FONCTION DE L'AGE (KUMAR ET AL. 2017).....	28
FIGURE 7 : VOIES MOLECULAIRES IMPLIQUEES LE MEDULLOBLASTOME (CRAWFORD ET AL., 2007)	28
FIGURE 8 : ARBRE DECISIONNEL DE LA PRISE EN CHARGE EN THERAPEUTIQUE DES PATIENTS ATTEINTS DE MEDULLOBLASTOME (MEDULLOBLASTOME EMC)	33
FIGURE 9 DIVERSITE DES RECEPTEURS ACTIVEURS ET INHIBITEURS DES CELLULES NK.....	41
FIGURE 10 RECEPTEURS NCR ET LEURS LIGANDS (KRUSE ET AL. 2014)	42
FIGURE 11 : BALANCE ENTRE LES SIGNAUX ACTIVEURS ET INHIBITEURS	45
FIGURE 12 : MECANISME CYTOTOXIQUE DU GRANZYME B (CREATIVE DIAGNOSTICS ®)	47
FIGURE 13 : STRUCTURE D'UN RECEPTEUR ANTIGENIQUE CHIMERIQUE (CAR)	54
FIGURE 14 : PRINCIPE DE FABRICATION D'UNE CELLULE NK GENETIQUEMENT MODIFIEE A PARTIR D'UN VECTEUR VIRAL POUR EXPRIMER UN RECEPTEUR CAR (CAR-NK).....	54
FIGURE 15 : DIFFERENTES SOURCES DE NK UTILISEES EN THERAPIE	55
FIGURE 16 RESERVOIR D'OMMAYA	57
FIGURE 17 : RECEPTEURS ERBB, LIGANDS ASSOCIES ET SIGNALISATION INTRACELLULAIRE (RICHARD ET AL., 2016)	60
FIGURE 18 : STRATEGIE D'OBTENTION DES DIFFERENTS TYPES DE CELLULES NK A PARTIR D'UNE POCHE DE SANG D'UN DONNEUR.....	73
FIGURE 19 : TESTS REALISES POUR L'ETUDE DU PROCESSUS DE CYTOTOXICITE.....	73
FIGURE 20 : PRINCIPE DU TRI IMMUNOMAGNETIQUE.....	75
FIGURE 21 : CONJUGUES DE CELLULES NK ET K562 COLORES AU MGG ET OBSERVES EN MICROSCOPIE OPTIQUE (x400)	83
FIGURE 22 : STRATEGIE D'ANALYSE : TEST DE CONJUGAISON.....	83
FIGURE 23 : PRINCIPE DE LA TECHNIQUE ELISPOT METTANT EN EVIDENCE LA LIBERATION DE GRANZYME B PAR LES CELLULES NK	85
FIGURE 24 : FOND DE Puits RECOUVERT DE SPOTS	85
FIGURE 25 : STRATEGIE D'ANALYSE : TEST DE CYTOTOXICITE PAR CMF	87
FIGURE 26 : STRATEGIE D'ANALYSE : TEST DE COCULTURE	89
FIGURE 27 : COMPARAISON DES PHENOTYPES DE 3 LIGNEES DE MEDULLOBLASTOME (DAOY, D283, D341) PAR CMF.....	93
FIGURE 28 : EVALUATION DE LA CONJUGAISON DE CELLULES AVEC DIFFERENTES LIGNEES DE MEDULLOBLASTOME	94
FIGURE 29 : EVALUATION DE LA DEGRANULATION DES CELLULES NK EN PRESENCE DES DIFFERENTES LIGNEES DE MEDULLOBLASTOME	97
FIGURE 30 : EVALUATION DU POURCENTAGE DE NECROSE SPECIFIQUE DES CELLULES CIBLES EN PRESENCES DE CELLULES NK PAR CMF	99
FIGURE 31 : EVALUATION DU POURCENTAGE DE LYSE SPECIFIQUE DES CELLULES CIBLES EN PRESENCES DE CELLULES NK PAR QUANTIFICATION DE L'AK LIBEREE.....	101
FIGURE 32 : EVOLUTION DE L'EXPRESSION DE DIFFERENTS RECEPTEURS ACTIVEURS ET INHIBITEURS CHEZ LES CELLULES NK PENDANT 48H DE COCULTURE AVEC LES LIGNEES DE MEDULLOBLASTOME	103
FIGURE 33 : EVALUATION DU POURCENTAGE DE NECROSE SPECIFIQUE DES CELLULES CIBLES EN PRESENCES DE CELLULES NK SOUS FORMES FRAICHES, EN CULTURE OU DECONGELEES.....	106

LISTES DES TABLEAUX

TABLEAU I : CARACTERISTIQUES DE CHAQUE GROUPE MOLECULAIRE DE MEDULLOBLASTOME	31
TABLEAU II : CLASSIFICATION PRONOSTIQUE DE CHANG	33
TABLEAU III RECEPTEURS ACTIVATEURS ET INHIBITEURS PRINCIPAUX DES CELLULES NK ET LIGANDS ASSOCIES	42
TABLEAU IV : COMPARAISON DES ETUDES DE CASTRICONI ET AL ET FERNANDEZ ET AL SUR L'EFFET CYTOTOXIQUE DES CELLULES NK ENVERS LES CELLULES DE MEDULLOBLASTOME	70
TABLEAU V : TABLEAU RECAPITULATIF DES TRAVAUX PUBLIES SUR L'UTILISATION DES LAK ET DE CELLULES NK DANS LE TRAITEMENT DES TUMEURS CEREBRALES (MEDULLOBLASTOME EN BLEU, GLIOBLASTOME EN VIOLET)	71
TABLEAU VI : COMPOSITION DES MILIEUX SUPPLEMENTES UTILISES POUR LA CULTURE DES CELLULES NK (A) ET DES K562 (B)	77
TABLEAU VII : ANTICORPS UTILISES EN CMF : ANTICORPS COUPLES A UN FLUOROCHROME (A), ANTICORPS PRIMAIRES (B), ANTICORPS SECONDAIRES (C)	81
TABLEAU VIII : AVANTAGES ET INCONVENIENTS DES DIFFERENTES FORMES DE NK	106

I. INTRODUCTION

Selon les données de l'INSEE, les tumeurs constituent la première cause de décès en France depuis 2004 (28,8% des décès en 2013). Le cancer demeure donc un problème majeur de santé publique malgré les moyens thérapeutiques actuels. En effet, bien que de nombreux progrès aient été réalisés ces dernières années, la prise en charge des cancers reste délicate. Les traitements conventionnels, en théorie très efficaces, agissent non seulement sur les cellules cancéreuses mais également sur les cellules saines. Cela a pour conséquence la survenue d'effets indésirables parfois graves incitant à la limitation de leur dose, le développement de résistance et la rechute de la maladie.

Devant ces faits, il devient indispensable de développer de nouvelles thérapies plus spécifiques et moins nocives, d'où l'essor de la thérapie ciblée.

Au cours de mon internat, j'ai eu la chance de réaliser 3 semestres au sein de l'Unité de Thérapie Cellulaire et banque de Tissus (UTCT) du CHRU de Nancy, dirigée par le Professeur D. Bensoussan. Pendant quelques mois j'ai pu faire partie de l'équipe 6 de l'UMR CNRS UL7365 (IMoPA) co-dirigée par les Professeurs D. Bensoussan et M-T. Rubio. Cette équipe de recherche a comme thématiques l'ingénierie Cellulaire, l'Immunothérapie Cellulaire et les Approches Translationnelles (CECITA) et travaille notamment sur l'utilisation des lymphocytes T, des cellules Natural Killer (NK), des cellules Natural Killer T (NKT) et des Cellules Souches Mésoenchymateuses (CSM) en thérapie. Depuis la création de l'équipe en janvier 2018, un projet de recherche a été initié par le Professeur V. Decot en collaboration avec le Docteur C. Boura du CRAN sur l'étude des interactions entre les cellules NK et celles de médulloblastome.

Le but de ce travail a été d'étudier l'utilisation des cellules Natural Killer (NK) comme agent d'immunothérapie d'un cancer particulier : les tumeurs primitives du système nerveux central (SNC). Après avoir fait le point sur l'utilisation des cellules NK dans le traitement des tumeurs cérébrales au cours de ces dernières années, nous avons souhaité évaluer plus précisément leur mécanisme d'actions envers un type de tumeur du SNC : le médulloblastome.

A. Tumeurs primitives cérébrales et tumeurs primitives du système nerveux central

Les tumeurs primitives du système nerveux central (SNC) correspondent à l'ensemble des tumeurs se développant initialement à partir de cellules issues du cerveau (= tumeurs primitives cérébrales) ou plus rarement de la moelle épinière (= tumeurs primitives médullaires représentant moins de 10% des tumeurs du SNC).

Ce sont des tumeurs rares dont le pronostic varie essentiellement en fonction du type et de la localisation.

1. Classification

La classification 2016 de l'OMS des tumeurs du SNC (Louis et al., 2016) sert actuellement de référence pour la prise en charge de ces cancers. Elle est basée sur des critères phénotypiques et génotypiques. (Figure 1)

Parmi les principaux groupes définis dans cette classification figurent les tumeurs issues de cellules gliales appelées gliomes (astrocytomes, oligodendrogliome, épendymomes, glioblastomes...), de cellules neuronales ou mixtes (neurocytomes, gangliocytomes...), de cellules de la région pinéale (pinéalome, pinéaloblastome...), de la région pituitaire (craniopharyngiome, pituicytome...), du neurectoderme embryonnaire (médulloblastome), du tissu méningé (méningiomes)... Y figurent également des groupes de tumeurs n'ayant pas pour origine une lignée cellulaire propre au SNC mais à localisation cérébrale, comme les lymphomes ou des tumeurs mésoenchymateuses non méningées (angiomes, sarcomes...). Cette classification prend également en compte les métastases cérébrales qui ne sont pas des tumeurs primitives et ne seront donc pas abordées dans ce travail.

Diffuse astrocytic and oligodendroglial tumours		Neuronal and mixed neuronal-glia tumours	
Diffuse astrocytoma, IDH-mutant	9400/3	Dysembryoplastic neuroepithelial tumour	9413/0
Gemistocytic astrocytoma, IDH-mutant	9411/3	Gangliocytoma	9492/0
<i>Diffuse astrocytoma, IDH-wildtype</i>	9400/3	Ganglioglioma	9505/1
Diffuse astrocytoma, NOS	9400/3	Anaplastic ganglioglioma	9505/3
		Dysplastic cerebellar gangliocytoma (Lhermitte–Duclos disease)	9493/0
Anaplastic astrocytoma, IDH-mutant	9401/3	Desmoplastic infantile astrocytoma and ganglioglioma	9412/1
<i>Anaplastic astrocytoma, IDH-wildtype</i>	9401/3	Papillary glioneuronal tumour	9509/1
Anaplastic astrocytoma, NOS	9401/3	Rosette-forming glioneuronal tumour	9509/1
		<i>Diffuse leptomeningeal glioneuronal tumour</i>	
Glioblastoma, IDH-wildtype	9440/3	Central neurocytoma	9506/1
Giant cell glioblastoma	9441/3	Extraventricular neurocytoma	9506/1
Gliosarcoma	9442/3	Cerebellar liponeurocytoma	9506/1
<i>Epithelioid glioblastoma</i>	9440/3	Paraganglioma	8693/1
Glioblastoma, IDH-mutant	9445/3*		
Glioblastoma, NOS	9440/3		
		Tumours of the pineal region	
Diffuse midline glioma, H3 K27M–mutant	9385/3*	Pineocytoma	9361/1
		Pineal parenchymal tumour of intermediate differentiation	9362/3
Oligodendroglioma, IDH-mutant and 1p/19q-codeleted	9450/3	Pineoblastoma	9362/3
Oligodendroglioma, NOS	9450/3	Papillary tumour of the pineal region	9395/3
		Embryonal tumours	
Anaplastic oligodendroglioma, IDH-mutant and 1p/19q-codeleted	9451/3	Medulloblastomas, genetically defined	
<i>Anaplastic oligodendroglioma, NOS</i>	9451/3	Medulloblastoma, WNT-activated	9475/3*
		Medulloblastoma, SHH-activated and <i>TP53</i> -mutant	9476/3*
<i>Oligoastrocytoma, NOS</i>	9382/3	Medulloblastoma, SHH-activated and <i>TP53</i> -wildtype	9471/3
<i>Anaplastic oligoastrocytoma, NOS</i>	9382/3	Medulloblastoma, non-WNT/non-SHH <i>Medulloblastoma, group 3</i>	9477/3*
		<i>Medulloblastoma, group 4</i>	
Other astrocytic tumours		Medulloblastomas, histologically defined	
Pilocytic astrocytoma	9421/1	Medulloblastoma, classic	9470/3
Piloxyoid astrocytoma	9425/3	Medulloblastoma, desmoplastic/nodular	9471/3
Subependymal giant cell astrocytoma	9384/1	Medulloblastoma with extensive nodularity	9471/3
Pleomorphic xanthoastrocytoma	9424/3	Medulloblastoma, large cell / anaplastic	9474/3
Anaplastic pleomorphic xanthoastrocytoma	9424/3	Medulloblastoma, NOS	9470/3
		Embryonal tumour with multilayered rosettes, C19MC-altered	9478/3*
Ependymal tumours		<i>Embryonal tumour with multilayered rosettes, NOS</i>	9478/3
Subependymoma	9383/1	Medulloepithelioma	9501/3
Myxopapillary ependymoma	9394/1	CNS neuroblastoma	9500/3
Ependymoma	9391/3	CNS ganglioneuroblastoma	9490/3
Papillary ependymoma	9393/3	CNS embryonal tumour, NOS	9473/3
Clear cell ependymoma	9391/3	Atypical teratoid/rhabdoid tumour	9508/3
Tanycytic ependymoma	9391/3	<i>CNS embryonal tumour with rhabdoid features</i>	9508/3
Ependymoma, <i>RELA</i> fusion–positive	9396/3*		
Anaplastic ependymoma	9392/3		
		Tumours of the cranial and paraspinal nerves	
Other gliomas		Schwannoma	9560/0
Chordoid glioma of the third ventricle	9444/1	Cellular schwannoma	9560/0
Angiocentric glioma	9431/1	Plexiform schwannoma	9560/0
Astroblastoma	9430/3		
Choroid plexus tumours			
Choroid plexus papilloma	9390/0		
Atypical choroid plexus papilloma	9390/1		
Choroid plexus carcinoma	9390/3		

Melanotic schwannoma	9560/1	Osteochondroma	9210/0
Neurofibroma	9540/0	Osteosarcoma	9180/3
Atypical neurofibroma	9540/0		
Plexiform neurofibroma	9550/0	Melanocytic tumours	
Perineurioma	9571/0	Meningeal melanocytosis	8728/0
Hybrid nerve sheath tumours		Meningeal melanocytoma	8728/1
Malignant peripheral nerve sheath tumour	9540/3	Meningeal melanoma	8720/3
Epithelioid MPNST	9540/3	Meningeal melanomatosis	8728/3
MPNST with perineurial differentiation	9540/3		
		Lymphomas	
Meningiomas		Diffuse large B-cell lymphoma of the CNS	9680/3
Meningioma	9530/0	Immunodeficiency-associated CNS lymphomas	
Meningothelial meningioma	9531/0	AIDS-related diffuse large B-cell lymphoma	
Fibrous meningioma	9532/0	EBV-positive diffuse large B-cell lymphoma, NOS	
Transitional meningioma	9537/0	Lymphomatoid granulomatosis	9766/1
Psammomatous meningioma	9533/0	Intravascular large B-cell lymphoma	9712/3
Angiomatous meningioma	9534/0	Low-grade B-cell lymphomas of the CNS	
Microcystic meningioma	9530/0	T-cell and NK/T-cell lymphomas of the CNS	
Secretory meningioma	9530/0	Anaplastic large cell lymphoma, ALK-positive	9714/3
Lymphoplasmacyte-rich meningioma	9530/0	Anaplastic large cell lymphoma, ALK-negative	9702/3
Metaplastic meningioma	9530/0	MALT lymphoma of the dura	9699/3
Chordoid meningioma	9538/1		
Clear cell meningioma	9538/1	Histiocytic tumours	
Atypical meningioma	9539/1	Langerhans cell histiocytosis	9751/3
Papillary meningioma	9538/3	Erdheim–Chester disease	9750/1
Rhabdoid meningioma	9538/3	Rosai–Dorfman disease	
Anaplastic (malignant) meningioma	9530/3	Juvenile xanthogranuloma	
		Histiocytic sarcoma	9755/3
		Germ cell tumours	
Mesenchymal, non-meningothelial tumours		Germinoma	9064/3
Solitary fibrous tumour / haemangiopericytoma**		Embryonal carcinoma	9070/3
Grade 1	8815/0	Yolk sac tumour	9071/3
Grade 2	8815/1	Choriocarcinoma	9100/3
Grade 3	8815/3	Teratoma	9080/1
Haemangioblastoma	9161/1	Mature teratoma	9080/0
Haemangioma	9120/0	Immature teratoma	9080/3
Epithelioid haemangi endothelioma	9133/3	Teratoma with malignant transformation	9084/3
Angiosarcoma	9120/3	Mixed germ cell tumour	9085/3
Kaposi sarcoma	9140/3		
Ewing sarcoma / PNET	9364/3	Tumours of the sellar region	
Lipoma	8850/0	Craniopharyngioma	9350/1
Angiolipoma	8861/0	Adamantinomatous craniopharyngioma	9351/1
Hibernoma	8880/0	Papillary craniopharyngioma	9352/1
Liposarcoma	8850/3	Granular cell tumour of the sellar region	9582/0
Desmoid-type fibromatosis	8821/1	Pituicytoma	9432/1
Myofibroblastoma	8825/0	Spindle cell oncocyoma	8290/0
Inflammatory myofibroblastic tumour	8825/1		
Benign fibrous histiocytoma	8830/0	Metastatic tumours	
Fibrosarcoma	8810/3		
Undifferentiated pleomorphic sarcoma / malignant fibrous histiocytoma	8802/3		
Leiomyoma	8890/0		
Leiomyosarcoma	8890/3		
Rhabdomyoma	8900/0		
Rhabdomyosarcoma	8900/3		
Chondroma	9220/0		
Chondrosarcoma	9220/3		
Osteoma	9180/0		

The morphology codes are from the International Classification of Diseases for Oncology (ICD-O) [742A]. Behaviour is coded /0 for benign tumours; /1 for unspecified, borderline, or uncertain behaviour; /2 for carcinoma in situ and grade III intraepithelial neoplasia; and /3 for malignant tumours. The classification is modified from the previous WHO classification, taking into account changes in our understanding of these lesions. *These new codes were approved by the IARC/WHO Committee for ICD-O. *Italics*: Provisional tumour entities. **Grading according to the 2013 WHO Classification of Tumours of Soft Tissue and Bone.

Figure 1 Classification OMS 2016 des tumeurs du SNC (Louis et al., 2016)

Type de tumeur associé un **code à 4 chiffres** défini par le CIM-O selon son type ou sa morphologie et un **cinquième chiffre** selon son comportement évolutif (0 : tumeur bénigne/1 : tumeur de comportement imprévisible/2 : tumeur *in situ*/3 : tumeur maligne). Caractères italiques pour les entités provisoires.

2. Epidémiologie et pronostic

a) Incidence générale

Les tumeurs primitives du SNC (abrégées TPS) représentent une minorité des cancers. Leur incidence annuelle dans les pays développés varie entre 16 et 23 pour 100 000 habitants en fonction des études (entre 4 à 6 pour 100 000 chez l'enfant de moins de 15 ans). (Adam and Mokhtari, 2010) (Ostrom et al., 2014) . Elles représentent ainsi 1 à 2 % des tumeurs de l'adulte mais 20% des tumeurs solides de l'enfant. Malgré leur fréquence de survenue et de malignité faibles (seulement 2/3 des TPS sont considérées comme malignes) (Figure 2), elles font partie, avec les cancers des poumons, du foie, du pancréas et de l'œsophage, des tumeurs de plus mauvais pronostic. Leur taux global de survie à 5 ans est inférieur à 20%. (Mazeau-Woynar and Cerf, 2010)

b) Facteurs de risque

A ce jour plusieurs facteurs de risque ont été incriminés en fonction du type de tumeurs.

Facteurs de risque intrinsèques

Parmi les facteurs intrinsèques principaux on retrouve l'**âge**, le **sexe**, l'**origine ethnique** et certains **syndromes héréditaires**.

A titre d'exemple, la fréquence de survenue des gliomes semblent 1,5 fois supérieure chez les hommes alors que celle des méningiomes non malins serait 2,5 fois supérieure chez la femme.

De même, si la tendance générale est à l'augmentation de l'apparition des tumeurs avec l'âge, certaines seraient plus souvent rencontrées chez les jeunes. Ainsi l'incidence des médulloblastomes et des astrocytomes pilocytiques serait 10 fois supérieure chez les enfants de moins de 14 ans que chez les adultes.

Concernant l'origine ethnique, alors que le risque de développer une tumeur du SNC paraît supérieur chez les sujets d'origine caucasienne par rapport aux sujets Afro américains (AA), pour certaines localisations, l'origine AA semble être un facteur de risque. Ainsi, alors que les tumeurs neuroépithéliales sont 2 fois plus fréquentes chez les sujets blancs, la tendance est inversée pour les tumeurs de la glande pituitaire, 2 fois plus fréquentes dans la population noire.

Enfin les syndromes de prédisposition aux cancers comme les syndromes de Li-Fraumeni (mutation germinale du gène TP53), de Turcot (syndrome héréditaire associant tumeur du SNC et cancer colorectal), ou encore la neurofibromatose de type 1 (mutation du gène NF1) seraient à l'origine de 1 à 5% des TPS. (Loiseau et al., 2010)(Adam and Mokhtari, 2010)(Ostrom et al., 2014)(Ah-Pine and Rousseau, 2018)

Facteurs de risque extrinsèques

Les **radiations ionisantes** à fortes doses constituent le principal facteur de risque extrinsèque. D'après l'étude de Neglia *et al*, les enfants ayant reçu une irradiation thérapeutique cérébrale aurait 7 fois plus de risque de développer une autre tumeur du SNC par la suite. (Neglia et al.)

c) Fréquence par type de tumeurs

Chez **l'adulte**, les tumeurs primitives du SNC les plus fréquemment rencontrées sont les **méningiomes** (entre 27% et 36% des TPS) et les **glioblastomes** (entre 15% et 28%). Alors que la première est généralement de bon pronostic (80% des méningiomes sont considérés comme bénins et n'évoluent pas au cours des 10 années qui suivent leur diagnostic), la deuxième est d'évolution plus sombre avec **une survie médiane de 14 mois**. Les glioblastomes constituent la première cause de décès par tumeur cérébrale.

Les autres gliomes malins (astrocytomes diffus et anaplastiques, oligodendrogliomes anaplastiques, gliomes malins NOS ...) et les lymphomes cérébraux constituent les principales autres causes de mortalité par tumeurs primitives du SNC après les glioblastomes. (Adam and Mokhtari, 2010) (Ostrom et al., 2014) (Figure 3)

Chez les **enfants de moins de 14 ans**, ce sont les tumeurs gliales non infiltrantes (**astrocytomes pilocytiques** principalement) (entre 20 à 32% des TPS), et les **médulloblastomes** (entre 12 à 24%) qui sont les plus fréquemment rencontrées. Les astrocytomes pilocytiques correspondent à des gliomes de bas grade ayant une survie relative après 10 ans supérieure à 90%. Le pronostic des patients atteints de médulloblastome est plus réservé du fait d'une évolution parfois fatale (taux de survie globale variant de 40 à 90% en fonction du sous type moléculaire de la tumeur) et des séquelles neurologiques secondaires aux traitements non négligeables chez les jeunes enfants. (Kumar et al., 2017) (Figure 4)

Les tumeurs de la région pinéale et des nerfs crâniens sont également très fréquentes (respectivement 15 et 8% des TPS) en particulier chez le **jeune adulte** (entre 15 et 40 ans) mais de relativement bon pronostic. (Ostrom et al., 2014)

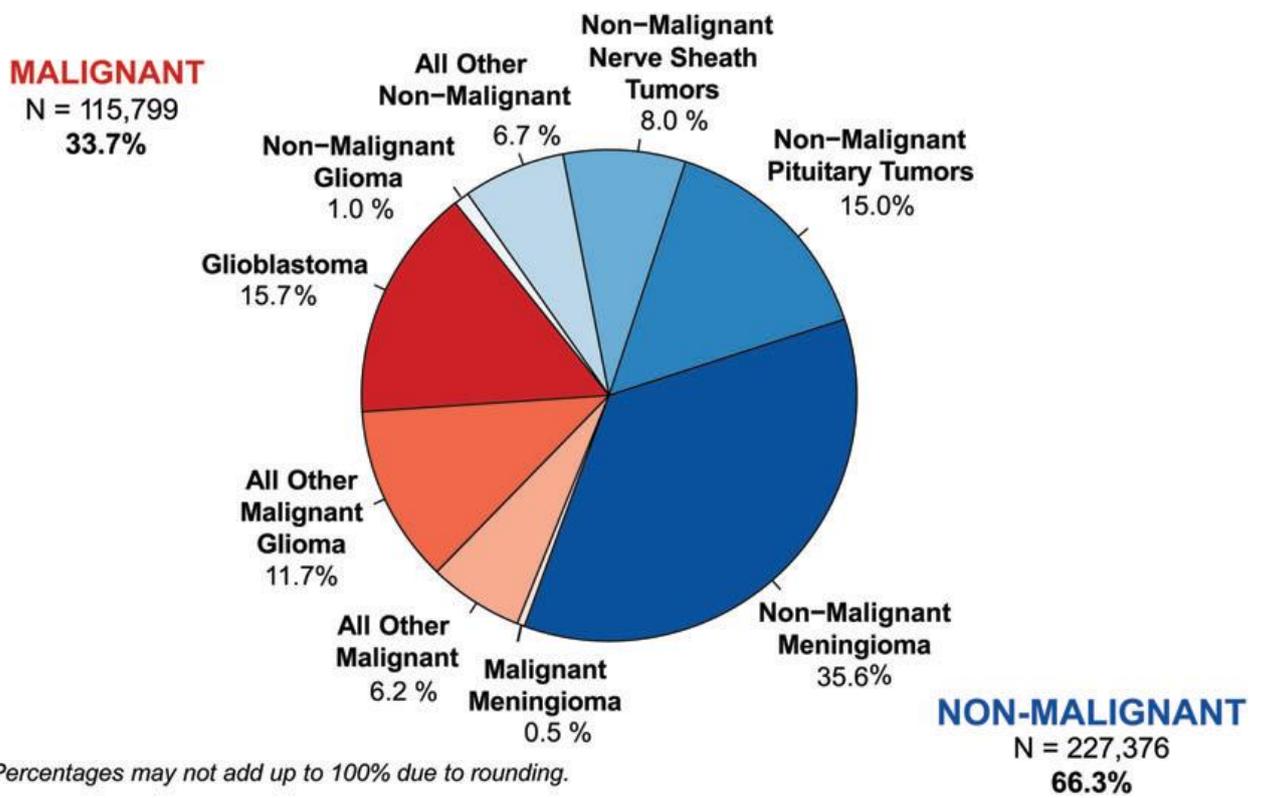


Figure 2 Distribution des tumeurs du SNC par pronostic (Ostrom et al., 2014)

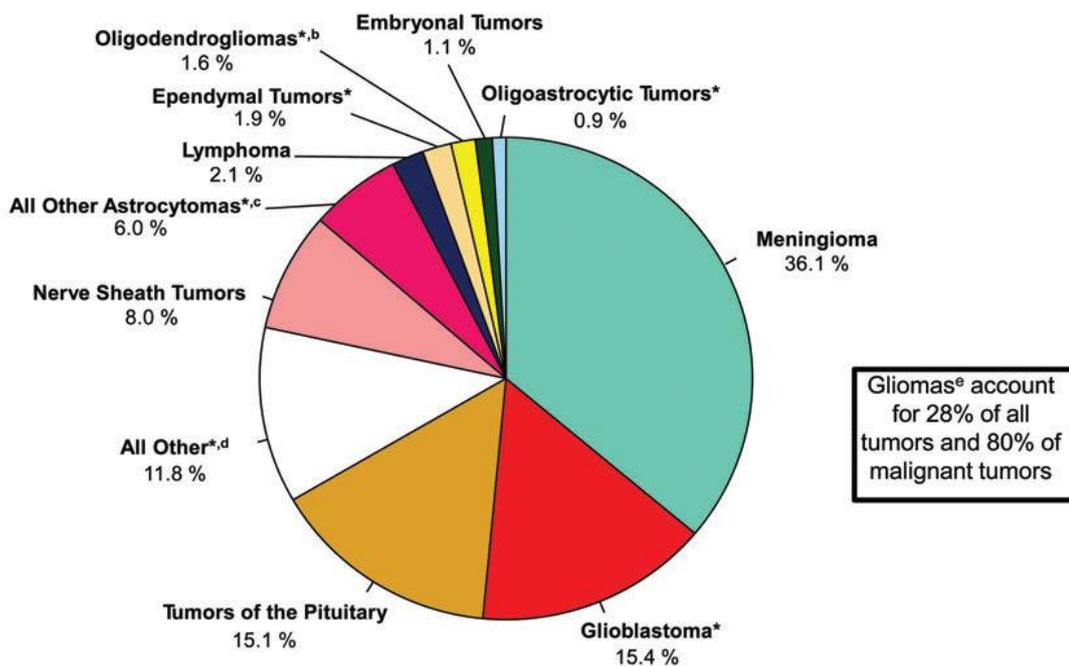


Figure 3 Distribution des tumeurs du SNC par type histologiques chez les adultes (Ostrom et al., 2014)

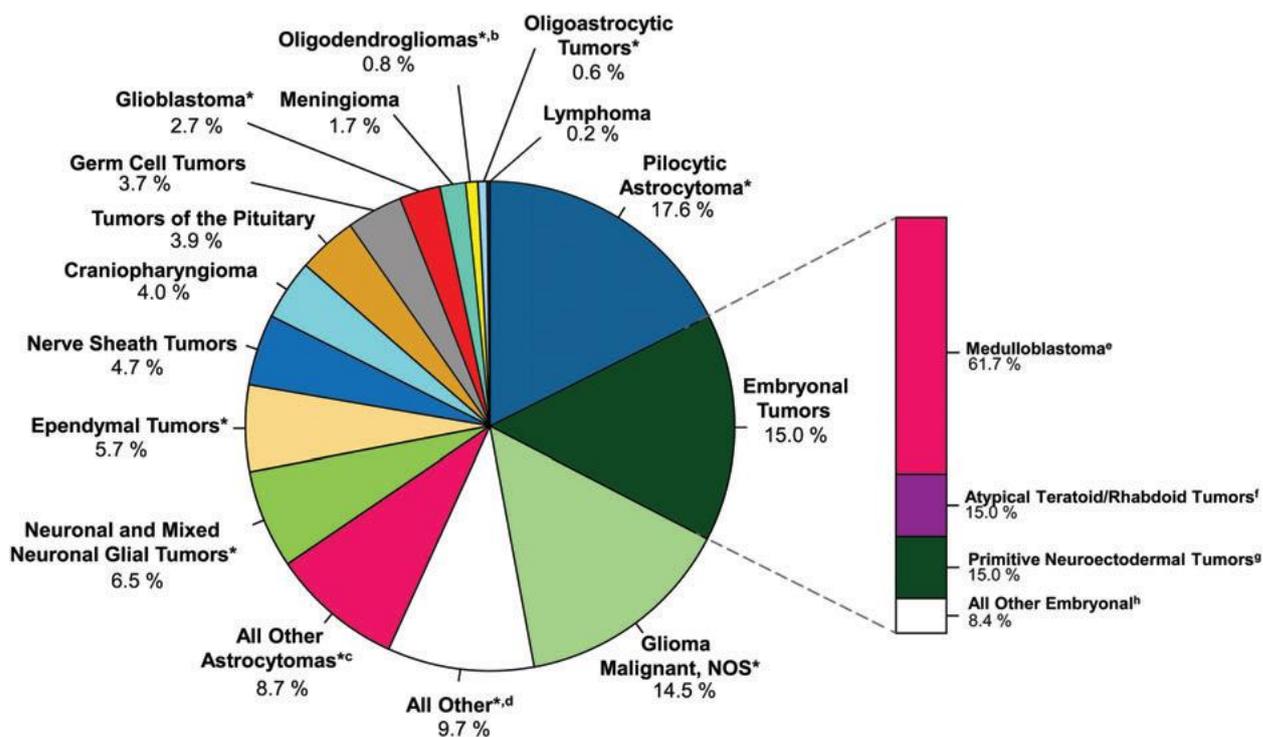


Figure 4 Distribution des tumeurs du SNC par type histologiques chez les enfants (0-14ans) (Ostrom et al., 2014)

3. Microenvironnement et résistance aux traitements

Au sein de la tumeur, les cellules communiquent entre elles et avec le stroma environnant de manière dynamique. Cette communication peut être directe (jonction entre les cellules) ou indirecte grâce à la sécrétion de facteurs dans le milieu extracellulaire (hormones, facteurs de croissance, chimiokines, ...). L'ensemble des cellules supports en interaction avec la masse tumorale, et qui vont permettre sa survie, son développement et son évasion, constitue le microenvironnement tumoral. Il est aujourd'hui admis que ce microenvironnement joue un rôle essentiel dans le caractère invasif des cancers, au même titre que le phénotype et le génotype de la cellule tumorale.

Dans les tumeurs invasives cérébrales, le microenvironnement est formé par les cellules du système nerveux central (comme les neurones et les cellules gliales : astrocytes, oligodendrocytes et microglies), par les cellules du système immunitaire (SI) (comme les macrophages, les polynucléaires neutrophiles et les lymphocytes), les cellules endothéliales du système vasculaire et les composants de la matrice extracellulaire. Les cellules tumorales sont capables de manipuler leur microenvironnement et de faire en sorte que les cellules saines voisines coopèrent dans leur développement et leur expansion. (**Figure 5**)

a) Libération de molécules immunosuppressives

Un des premiers mécanismes d'échappement de la tumeur est la sécrétion de **molécules immunosuppressives** telles que le **TGF- β** , la PGE2, l'IL10, l'IDO (indoleamine-2,3-dioxygénase), l'adénosine... Le TGF β joue un rôle important dans l'échappement des tumeurs au système immunitaire en agissant à plusieurs niveaux. Il va **réprimer l'activité des cellules NK**, en limitant notamment l'expression des récepteurs activateurs, mais également diminuer la sécrétion d'IFN γ nécessaire au recrutement des LT Th1. D'autre part, il va favoriser le recrutement des lymphocytes T régulateurs (Tregs). Ces Treg vont contribuer à la pathogenèse par inhibition des lymphocytes T cytotoxiques via la sécrétion d'autres cytokines immunosuppressives (IL-10, IL35 et TGF- β).

b) Modulation du phénotype des cellules environnantes

Les cellules tumorales vont également libérer des molécules qui vont favoriser le développement de **macrophages de phénotype M2** (sous l'effet de IL-10, IL-4 et IL-13), de **cellules myéloïdes suppressives (ou MDSC)** (sous l'effet de GM-CSF, IL6, IL10, PGE2, VEGF) et de **fibroblastes associés aux tumeurs (ou CAF)** (sous l'effet de TGF β).

Les macrophages M2, principalement impliqués dans la réparation tissulaire et la cicatrisation, sont souvent retrouvés dans les tumeurs et constituent la majorité des TAM (Macrophages Associés aux Tumeurs). Les TAM M2 vont sécréter des cytokines (IL6), des protéases (métalloprotéinases matricielles /MMP) et de facteurs de croissance (VEGF, **EGF**) qui vont favoriser l'angiogenèse, remodeler la matrice extracellulaire et la favoriser la croissance tumorale.

Les MDSC quant à elles, vont avoir un effet immunosuppresseur sur les lymphocytes et les cellules NK et induire leur apoptose. Ces cellules favoriseraient également l'angiogenèse et le développement de métastases.

Les CAF sont majoritairement dérivés de fibroblastes et de cellules mésenchymateuses. Ils expriment notamment l' α -SMA, le récepteur PDGFR β et la protéine FAP. Ce type de fibroblastes aurait la capacité de proliférer rapidement et favoriserait la communication paracrine entre les différentes cellules du stroma tumoral, l'angiogenèse et l'invasion cellulaire.(Benabbou, 2012)

c) Expression de molécules de surface

Les cellules tumorales pourront également moduler leurs antigènes de surface de manière à inhiber directement les cellules immunitaires. Ainsi les cellules tumorales ont tendance à sous exprimer ou exprimer de manière aberrante (modifiée) **les molécules du CMH de classe I** afin de ne pas être reconnues par les lymphocytes T. Un autre mécanisme d'échappement consiste à surexprimer des molécules (comme PDL1) qui vont agir sur les **points de contrôle (checkpoints) immunitaires**. Les cellules du SI, notamment les lymphocytes, possèdent des points de contrôle négatif (checkpoints) à leur surface, comme les récepteurs PD-1 ou CTLA-4, qui ont normalement pour but d'éviter une réponse immune trop forte et prolongée. Au sein des tumeurs, PDL1 est souvent surexprimé, et sa fixation au récepteur PD1 va induire l'inactivation puis la mort des lymphocytes et ainsi empêcher une réponse antitumorale. Enfin il a également été montré que certaines tumeurs expriment le ligand **PDGF-DD**. Sa fixation au récepteur PDGFR β à la surface des plaquettes et des CAF promouvrait la prolifération tumorale. Le PDGF-DD aurait également la capacité **d'activer les NK via le récepteurs NKp44**.(Barrow et al., 2018a)

(Kmiecik et al. 2014) (Yvon et al., 2017) (Golán et al., 2018)

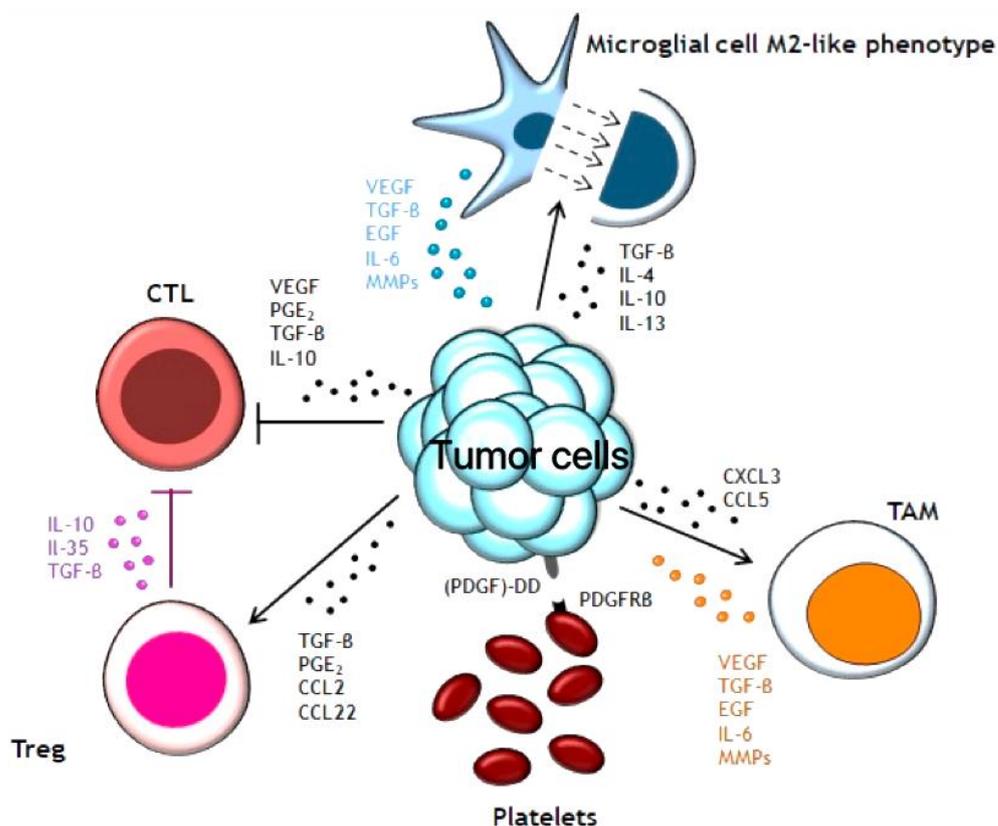


Figure 5 : Microenvironnement tumoral (Golán et al., 2018)

4. Thérapie actuelles des tumeurs cérébrales primitives et limites

La prise en charge standard des tumeurs cérébrales primitives (TCP) repose sur trois options thérapeutiques : la **résection chirurgicale**, la **radiothérapie** et la **chimiothérapie**.

Cependant plusieurs caractéristiques des tumeurs cérébrales les rendent particulièrement résistantes face à ces traitements conventionnels.

a) Une barrière physiologique

Il existe une barrière physiologique qui sépare la circulation sanguine du SNC : la **barrière hémato encéphalique** (BHE). Celle-ci est formée par les cellules endothéliales vasculaires à jonctions serrées associées à des cellules astrocytaires et des péricytes.

Ce système à perméabilité hautement sélective permet de réguler les échanges entre le sang et le cerveau le protégeant ainsi des agents pathogènes ou toxiques.

Bien qu'il est admis que la BHE soit souvent altérée dans les cancers cérébraux, le caractère inconstant et hétérogène de cette altération au sein des lésions tumorales confère à cette dernière une résistance à la plupart des agents de chimiothérapie. Seules les molécules liposolubles, sous forme non ionisée, et à faible poids moléculaire (<400 Da) seraient ainsi capables de diffuser dans la tumeur (Fortin, 2004). Le **témozolomide** (agent chimiothérapeutique de choix pour le traitement des glioblastomes) et la **lomustine** (traitement du médulloblastome en association avec la vincristine et la carboplatine) par exemple, sont des petites molécules alkylantes <250 Da, liposolubles, ayant la capacité de traverser la BHE. (Ameri and Poisson, 2009)

b) Une localisation au sein d'un organe noble à préserver

Deuxièmement, du fait de leur **localisation délicate**, et au risque de provoquer des dommages neurologiques irréversibles chez le patient, la chirurgie d'exérèse n'est pas toujours permise (notamment pour les tumeurs profondes) et la résection totale, pas toujours possible (en particulier pour les tumeurs infiltrantes).

De même, la radiothérapie doit être réalisée de manière très focalisée sur la tumeur afin de préserver les tissus sains. Utilisée à trop fortes doses la radiothérapie cérébrale peut être responsable de séquelles neurologiques et endocriniennes graves en particulier chez les jeunes enfants. (Crawford et al., 2007)

c) Une tumeur rare

Enfin du fait de la fréquence rare et de la forte hétérogénéité de ce type de tumeur, la mise en place d'essais cliniques sur de gros effectifs de patients reste compliquée à réaliser et l'apport des nouvelles thérapies parfois difficile à évaluer.

5. Focus sur le médulloblastome

Le médulloblastome est une tumeur embryonnaire, invasive, localisée au niveau de la fosse postérieure du cerveau, principalement au niveau cervelet. Elle appartient à la famille des tumeurs primitives neuroectodermiques (PNET).

a) Epidémiologie

Bien que le médulloblastome survienne à tout âge, il est principalement diagnostiqué chez l'enfant (70 à 80% des patients ont moins de 15 ans). C'est la tumeur cérébrale maligne la plus fréquente dans la population pédiatrique, représentant ainsi 16 à 25% des tumeurs primitives du SNC (Peris-Bonet et al., 2006) (Stevens et al., 1991) et 40% des tumeurs cérébelleuses. Elle représente moins de 1% des tumeurs de l'adulte (Crawford et al., 2007) et touche préférentiellement les garçons avec un sexe ratio à 1,5:1.

Le taux d'incidence annuel est estimé à 0,6 pour 100 000 chez l'enfant et 0,06 pour 100 000 chez l'adulte (Smoll and Drummond, 2012). Environ 150 nouveaux patients sont diagnostiqués chaque année en France et on estime de 5 000 à 8 000, le nombre de nouveaux cas dans le monde (Ivanov et al., 2016).

Il s'agit principalement de cas sporadiques mais certaines maladies génétiques comme les syndromes de Turcot, de Li-Fraumeni, de Bean, de Rubinstein-Taybi, de Gorlin ou autre mutation du gène SUFU (Suppressor of fused) prédisposent au médulloblastome. (Klein et al., 2015)

b) Classification

D'après la classification 2016 de l'OMS des tumeurs du SNC (Louis et al., 2016), le médulloblastome peut être divisé en 4 sous groupes histologiques en fonction de la morphologie de la tumeur ou en 4 sous groupes moléculaires en fonction de la mutation à l'origine de la cancérogenèse. Chaque groupe est assimilé à un pronostic plus ou moins favorable. (Figure 6)(Tableau I)

Classification histologique

Les 4 sous groupes histologiques comprennent :

La forme classique

C'est la forme la plus fréquente (70 à 80% des cas), elle est de pronostic variable.

La forme desmoplastique/nodulaire

Cette forme est surtout retrouvée chez l'adulte (30 à 40% des adultes contre 10 à 15% des enfants) de pronostic généralement bon en particulier chez les jeunes enfants (<5ans).

La forme à nodularité extensive (MBEN)

C'est la forme la plus rare (<5% des cas), elle est retrouvée majoritairement chez les jeunes enfants, et est de bon pronostic.

Les formes anaplastique et à grandes cellules (LCA)

Ces 2 formes sont retrouvées chez 10 à 25% des patients, ce sont les formes les plus agressives. (Brandes et al., 2015)(Kumar et al., 2017)

D'autres formes plus rares ont été décrites comme le médulloblastome et le médulloblastome mélanotique.(Crawford et al., 2007)

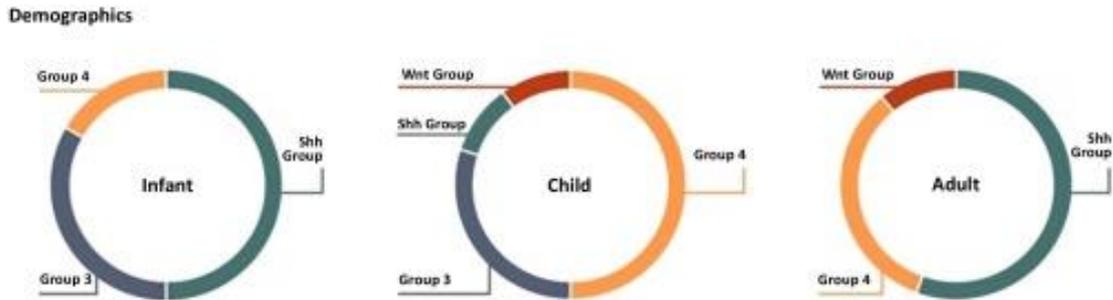


Figure 6 : Répartition des groupes moléculaires de médulloblastome en fonction de l'âge (Kumar et al. 2017)

infant <5 ans/child 5-14ans/adult > 14 ans

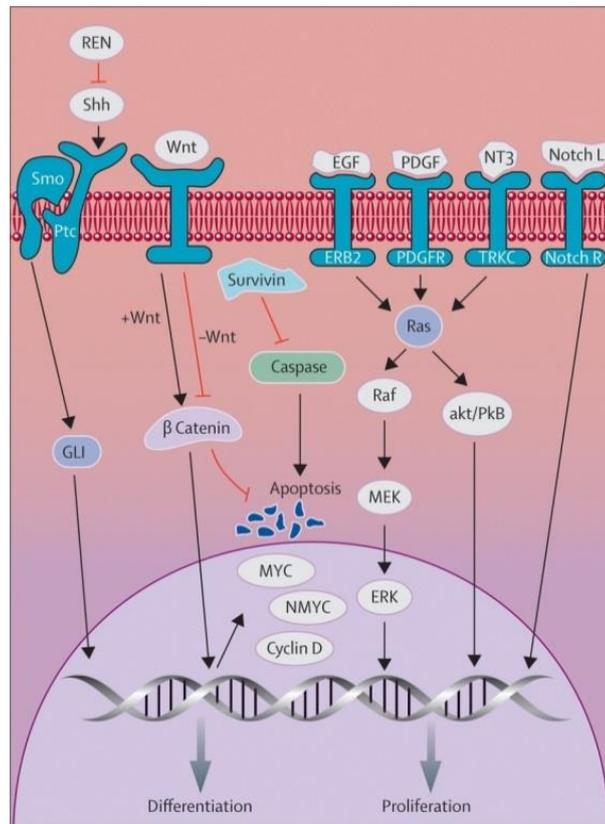


Figure 7 : Voies moléculaires impliquées le médulloblastome (Crawford et al., 2007)

Classification moléculaire

Au niveau moléculaire l'OMS définit 4 sous groupes caractérisés par leur profils génétiques, épigénétiques et phénotypiques (séquençage du génome entier, analyse de nombre d'exemplaires d'ADN, modèles d'expression d'ARNm et aberrations de nombre de copies somatiques). (Kumar et al., 2017)(Northcott et al., 2012a) (Figure 7)

Groupe avec activation de la voie de signalisation Wingless (Wnt)

Ce sous groupe retrouvé dans 10% des médulloblastomes est très rare chez le jeune enfant (< 5 ans). C'est le sous groupe le plus homogène et présentant le meilleur pronostic avec une survie globale supérieure à 90%(Taylor et al., 2012), les rares décès étant plutôt secondaires aux complications post traitement qu'à la tumeur elle-même.

La famille Wnt regroupe des glycoprotéines intervenant dans l'embryogenèse et le cancer. Elles permettent notamment de limiter la dégradation cytoplasmique de la β caténine par déstabilisation du complexe β caténine-GSK3 β -APC-axine/conductine. La β caténine est une protéine cytoplasmique jouant un rôle dans l'adhésion cellulaire et la transcription de gènes notamment de proto oncogènes comme le gène Myc.(Seva, 2001)

Dans ce sous groupe une suractivation de la voie Wnt est généralement retrouvée par mutation du gène de la β caténine : le CTNNB1 (au niveau de l'exon 3 le plus souvent) ainsi qu'une monosomie au niveau du chromosome 6.(Ivanov et al., 2016)(Kumar et al., 2017) D'autres anomalies peuvent être observées comme une mutation de la dead-box ARN hélicase DDX3X, des suppresseurs de tumeur TP53, ou APC notamment dans le syndrome de Turcot. Les tumeurs de ce sous-groupe sont principalement de morphologie classique.

Groupes avec activation de la voie de signalisation SHH

La classification de l'OMS 2016 différencie 2 groupes en fonction de l'état du facteur de transcription p53 :

- groupe avec **activation de la voie de signalisation SHH sans mutation TP53**, de pronostic intermédiaire
- groupe avec **activation de la voie de signalisation SHH et mutation TP53**, de mauvais pronostic

Dans ces 2 sous groupes on retrouve une dérégulation de la voie SHH (Sonic Hedgehog). Cette voie possède un rôle crucial dans le développement et la migration des tissus lors de l'embryogenèse.(Watson et al., 2010)

Ils représentent 25% des médulloblastomes et sont distribués de manière dichotomique chez les jeunes enfants (avec un meilleur pronostic) et les adultes suggérant 2 entités distinctes en fonction de l'âge du patient.(Northcott et al., 2012a) Ces 2 sous groupes combinent des patients avec des mutations au niveau de différents facteurs impliqués dans la voie SHH (PTCH1, PTCH2, SMO, SUFU, GLI1, GLI2) rendant ce groupe très hétérogène tant au niveau de la présentation clinique, de la réponse au traitement et de la survie globale. Les patients avec métastases, amplification de

MYCN, GLI2, perte du chromosome 14q ou 10q ou avec mutation de TP53 sont particulièrement à haut risque et présentent un taux survie à 5 ans < 50%.(Shih et al., 2014)

Toutes les morphologies sont retrouvées dans le groupe SHH dont les formes desmoplastique/nodulaire et à nodularité extensive qui sont spécifiques de ce groupe.

Groupe non Wnt et non SHH

Ce groupe peut être divisé en 2 entités distinctes en fonction des mutations à l'origine de la tumorigenèse :

- **le sous groupe 3, de mauvais pronostic**
- **le sous groupe 4, de pronostic intermédiaire**

Le **sous groupe 3** est retrouvé chez 25% des patients est considéré comme **le plus agressif** avec un taux de survie à 5 ans < 50%. Il est très rare chez l'adulte. Les patients présentent régulièrement des métastases au diagnostic et les traitements se soldent souvent par des rechutes.

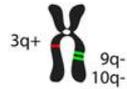
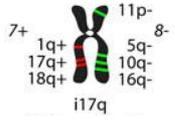
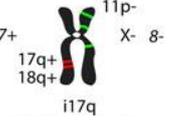
Une surexpression de MYC (protéine ou ARNm) est souvent retrouvée dans ce groupe, mais cette anomalie étant également retrouvée dans le groupe WNT (MYC est une cible en aval de cette voie), elle ne doit en aucun cas être utilisée pour la classification ou le pronostic. La mutation de TP53 retrouvée dans les sous-groupes WNT et SHH est absente dans ce groupe. Le gain de chromosome 1q, 7, 17q, 18q et les délétions du 8, 10q, 11p, 16q sont fréquemment retrouvées. Les patients du groupe 3 qui présentent une amplification de MYC ou un isochromosome 17q sont particulièrement à haut risque alors que la perte du chromosome 10 serait de meilleure pronostic.(Shih et al., 2014) (Schwalbe et al., 2017)

Le **sous groupe 4** est le plus fréquent, retrouvé chez 35% des patients, et est de pronostic intermédiaire avec un taux de survie à 5 ans de 70%.

Certaines anomalies chromosomiques sont communes au groupe 4 (isochromosome 17q, gain du 7, 17q, 18q, délétion du 8, 11p, surexpression de OTX2, FOXG1B) mais il présente un profil moléculaire distinct.(Northcott et al., 2012b) L'anomalie la plus fréquente est la présence de l'isochromosome 17q, retrouvé dans 66% des cas (contre 26% dans le groupe 3). Parmi les différences avec le groupe 3, on notera la surexpression fréquente de MYCN, alors que MYC est rarement surexprimé. La perte du chromosome X est également une particularité du groupe 4, observé chez 80% des patientes.(Taylor et al., 2012)(Li et al., 2013)

La perte du chromosome 11 ou le gain de chromosome 17 sont des facteurs de bon pronostic, alors que la surexpression du gène FSTL5 (follistatin-like protein 5) est de mauvais pronostic.(Shih et al., 2014) Bien qu'étant le sous groupe le plus fréquent, c'est aussi celui dont les mécanismes de pathogénèse sont les moins bien compris.

Tableau I : Caractéristiques de chaque groupe moléculaire de médulloblastome

Classification WHO 2016	WNT activated	SHH Activated TP53 mutant	SHH Activated TP53 wildtype	non-WNT/non-SHH	
				Groupe 3	Groupe 4
Démographie					
Fréquence	10%	30%		25%	35%
Groupe d'âges  (jeunes enfants <5 ans/enfants 5-14ans/adultes > 14 ans)					
Sexe ratio	♂ :♀	♂ :♀		♂♂ :♀	♂♂ :♀
Caractéristiques cliniques					
Histologie	Classique ++ LCA	4 formes possibles		Classique, LCA	Classique, LCA
Potentiel métastatique	-	+		+++	++
Pronostic	Très bon	Variable		Mauvais	Variable
		Très mauvais	Variable (bon chez les jeunes enfants)		
Génétique					
Anomalies génétiques	Mutation CTNNB1 	Mutation SMO/PTCH/SUFU Amplification GLI/MycN 		Amplification Myc 	Amplification MycN/CDK6 
Statut Myc	Myc+	MycN+		Myc+++	MycN+ Myc+/-
Mutation TP53 (Zhukova et al., 2013)	++	+++	-	-	+/-
- absence ; +/- : rare ; / + : probable / ++ : fréquent / +++ : très fréquent					

Critère de gravité et traitement

Les thérapies actuelles combinent une résection chirurgicale de la tumeur suivie de radiothérapie (sauf pour les enfants de moins de 5 ans) plus ou moins associée à de la chimiothérapie. Cette approche multithérapeutique a permis d'améliorer considérablement la survie des patients au cours de ces dernières années et d'atteindre des taux de survie globale variant de 40 à 90%(Kumar et al., 2017) en fonction du type moléculaire.

La plus ancienne classification à caractère pronostic avait été proposée par Chang en 1969. (Tableau II) Cette classification basée sur la taille de la tumeur et son extension métastatique n'est plus utilisée en pratique du fait de son absence de corrélation à la survie du patient au diagnostic.

De nouvelles propositions de classification ont été discutées mais aucune ne fait actuellement référence. L'important reste de bien préciser la qualité de l'exérèse chirurgicale par l'analyse du compte rendu opératoire et de l'IRM effectué dans les 72 heures suivant l'acte chirurgical. Ainsi, au terme des bilans pré et post opératoires, les médulloblastomes sont actuellement, sur le plan thérapeutique, stratifiés en 2 groupes :

- « **à risque standard** » (tous les critères nécessaires)
 - Exérèse totale ou subtotale (résidu < 1,5 cm²) (par IRM post opératoire)
 - Absence de métastases sus tentorielles ou le long de l'axe spinal
 - Absence de cellules tumorales dans le LCR
 - Absences de métastases hors SNC
 - Histologie non LCA
 - Absence d'amplification des oncogènes c-MYC et n-MYC
- « **à haut risque** »
 - Reliquat tumoral > 1,5 cm²
 - OU présence de métastases sus tentorielles ou le long de l'axe spinal
 - OU présence de cellules tumorales dans le LCR
 - OU histologie LCA
 - OU présence d'amplification des oncogènes c-MYC et n-MYC(Guidelines ANOCEF, 2016)

La conduite thérapeutique sera ainsi guidée en fonction du risque et de l'âge du patient. En effet les études actuelles tentent de limiter l'irradiation du SNC chez le jeune enfant (< 5 ans) en raison de l'effet délétère sur le développement. (Figure 8)(Taillandier et al., 2011)

Tableau II : Classification pronostique de Chang

Taille de la Tumeur (T)	
T1	Tumeur ≤ 3 cm de diamètre, limitée au vermis, au toit du 4 ^{ème} ventricule et aux hémisphères cérébelleux
T2	Tumeur > 3 cm de diamètre avec envahissement d'une structure adjacente locale ou un comblement partiel du 4 ^{ème} ventricule
T3a	Tumeur envahissant 2 structures adjacentes ou comblant le 4 ^{ème} ventricule avec une extension au niveau de l'aqueduc de Sylvius, du foramen de Magendie ou du foramen de Luschka (entraînant une hydrocéphalie marquée)
T3b	Tumeur issue du plancher du 4 ^{ème} ventricule ou du tronc cérébral comblant le quatrième ventricule
T4	Tumeur envahissant localement au-delà de l'aqueduc de Sylvius jusqu'au 3 ^{ème} ventricule ou envahissant le tronc cérébral ou envahissant la moelle cervicale supérieure
Métastases (M)	
M0	Absence de métastases
M1	Métastases dans le LCR
M2	Dépôts nodulaires sous-arachnoïdiens au niveau de cervelet, des hémisphères, dans le 3 ^{ème} ventricule ou dans les ventricules latéraux
M3	Métastases au niveau spinal
M4	Métastases en dehors de SNC

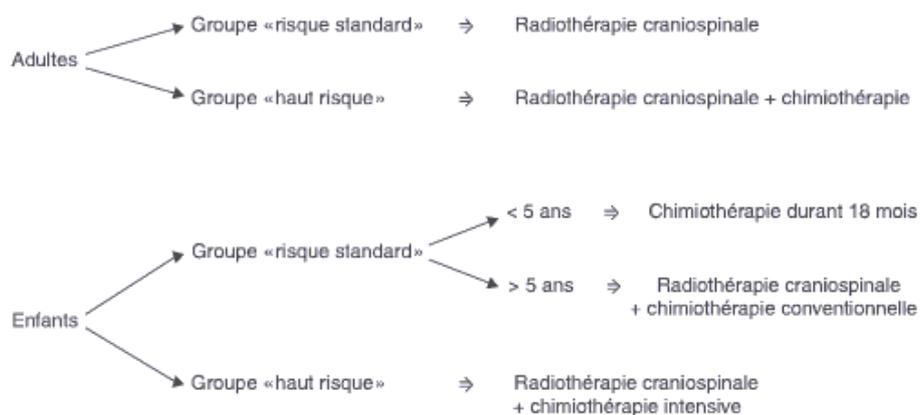


Figure 8 : Arbre décisionnel de la prise en charge en thérapeutique des patients atteints de médulloblastome (médulloblastome EMC)

c) Séquelles & complications

Bien que cette prise en charge multimodale ait considérablement augmenté la survie des patients, elle est associée à l'apparition d'effets secondaires à plus ou moins long terme.

Séquelles neurologiques

Les facteurs influençant la survenue de séquelles neurologiques sont l'âge du patient, la tumeur primitive (dissémination et degrés de l'hydrocéphalie) et la prise en charge thérapeutique (radiothérapie, chimiothérapie, et lésions lors de la réalisation de gestes chirurgicaux).

Les séquelles neurocognitives révélées notamment par une diminution du QI (Quotient Intellectuel) sont fortement liées à la radiothérapie et dose dépendante. Les jeunes enfants sont particulièrement impactés d'où les études actuelles visant à diminuer les doses et éviter la radiothérapie chez les patients de moins de 5 ans.

Des séquelles neurosensorielles peuvent également être observées notamment la perte de l'audition liée à l'utilisation de dérivés du platine et à la radiothérapie.

La chirurgie est également à l'origine de complications post opératoires à court terme. Elles peuvent être infectieuses (comme le développement d'infections au site opératoire et l'apparition de méningites) ou non (comme la fuite de LCR et le développement de pseudoméningocèle), ou liées directement à une lésion du SNC. Une des complications fréquemment retrouvées (8 à 38% des patients avec une tumeur de localisation médiane) est le « syndrome de la fosse postérieure » caractérisé par un mutisme akinétique plus ou moins associé à une hypotonie, une apraxie, une hémiparésie, une dysphagie, apparaissant 48 à 72h après la résection chirurgicale et pouvant perdurer pendant plusieurs mois.

Séquelles endocriniennes

Du fait de l'irradiation de l'axe hypothalamohypophysaire et de la glande thyroïde lors de la radiothérapie craniospinale, les séquelles endocriniennes sont quasi constantes et dose dépendante. La première anomalie est la diminution de la sécrétion de GH (Growth Hormone ou Hormone de Croissance) responsable d'un retard statural chez l'enfant et nécessitant parfois un traitement substitutif par hormone de croissance. Une hypothyroïdie est fréquemment observée, et plus rarement un dysfonctionnement gonadique ou corticotrope.(Crawford et al., 2007)

Séquelles orthopédiques

Indépendamment de la sécrétion de GH, le ralentissement de la croissance est également secondaire à une altération des cartilages de croissance vertébraux liée à la radiothérapie. Des déformations rachidiennes et une ostéopénie peuvent également survenir.

Complications malignes radio induites

Bien que rares, les tumeurs radio-induites (gliomes, méningiomes, tumeurs thyroïdiennes) sont possibles avec une occurrence augmentant avec le temps.(Taillandier et al., 2011)

6. Conclusion

Face à ce type de tumeur, l'émergence de nouvelles approches, plus spécifiques, plus efficaces, demeure indispensable et constitue parfois le dernier espoir pour les patients. De ce fait, ces traitements classiques sont de plus en plus associés à des thérapies ciblées, en particulier pour les tumeurs à haut grade de malignité.

Parmi elles, **l'immunothérapie** s'est particulièrement développée au cours des dernières décennies.

B. L'immunothérapie dans le traitement des cancers

L'immunothérapie antitumorale est une approche thérapeutique visant à **stimuler ou moduler le système immunitaire** afin de favoriser la destruction et l'élimination des cellules cancéreuses.

1. Pourquoi l'immunothérapie

Notre organisme est protégé par un système immunitaire (SI). Celui-ci est capable de détecter, d'identifier, d'attaquer et d'éliminer de notre corps les éléments étrangers comme les microorganismes pathogènes mais également les cellules altérées dont les cellules tumorales. Malheureusement dans certains cas, ces cellules « échappent » au contrôle immunitaire conduisant au développement des cancers. Le but des traitements d'immunothérapie est de restaurer la capacité d'action du SI face aux cellules cancéreuses afin de les éliminer.

2. Les différentes approches

Plusieurs techniques d'immunothérapie ont été développées au cours ces dernières années dont certaines ont fait leur preuve dans le traitement de cancers. (Pages and Ladoire, 2018)

a) L'immunothérapie non spécifique

Elle repose sur l'injection de molécules qui vont stimuler le système immunitaire. Ces molécules sont souvent des **cytokines** comme l'IL2 recombinante qui est utilisée dans le cancer du rein ou l'interféron IFN α dans le mélanome, mais aussi des agents stimulants le système immunitaire (SI) de manière plus passive comme le BCG (Vaccin bilié de Calmette et Guérin) dans les cancers de la vessie.

b) Les vaccins thérapeutiques

Le plus connu est le Sipuleucel-T/Provenge®, premier vaccin thérapeutique à avoir reçu une AMM (2013 en France). Il est utilisé dans les cancers métastatiques de la prostate hormono-résistants. Il consiste en l'injection de cellules dendritiques autologues chargées par l'antigène tumorale PAP qui vont stimuler les lymphocytes T du patient spécifiquement contre la tumeur.

c) La virothérapie

Le T-VEC/ Imlygic® (talimogene laherparepve) est le premier médicament basé sur l'utilisation d'un virus oncolytique à avoir reçu une AMM (2016 en Europe). Il est indiqué dans le traitement de certains mélanomes métastatiques. Il consiste à injecter directement dans les lésions cutanées, un virus : le virus HSV 1 génétiquement modifié. Ce dernier va pénétrer dans les cellules cancéreuses, se multiplier et stimuler le système immunitaire afin d'induire la destruction de la cellule

d) Les inhibiteurs des checkpoint immunologiques

Ces molécules ont pour but de lever les mécanismes d'inhibition induits par les tumeurs sur le SI. Trois types de molécules existent actuellement sur le marché : les anti PD1, anti PDL1, et anti

CTLA4. Plusieurs molécules ont déjà montré leur efficacité dans le traitement de tumeurs solides. On pourra citer le nivolumab/Opdivo® (anti PD1) dans le traitement des cancers bronchiques non à petites cellules et les mélanomes avancés (AMM européenne depuis 2015) ou le atézolizumab/Tecentriq® (antiPDL1) dans le cancer de la vessie (AMM européenne en 2016).

e) La thérapie cellulaire

Elle est basée sur l'utilisation de cellules immunitaires préalablement prélevées chez le patient lui-même ou chez un autre donneur et réinjectées après traitement et/ou modification en laboratoire. Dans les années 80, la greffe de cellules souches hématopoïétiques allogéniques a révolutionné la prise en charge des patients atteints de leucémie aiguë et demeure aujourd'hui encore le traitement de référence. Depuis, de nombreuses recherches ont été engagées sur l'utilisation de cellules immunitaires spécifiques sélectionnées et modifiées *ex vivo*. Plusieurs essais cliniques sont actuellement en cours sur l'utilisation de cellules T génétiquement modifiées (les CAR T Cell) capables de s'activer après reconnaissance spécifique d'un antigène (tumoral) par le récepteur CAR et ainsi induire une réponse cytotoxique ciblée.(Hartmann et al., 2017). Devant le succès de certains essais, quelques molécules ont récemment reçu une AMM. Ainsi le tisagenlecleucel/Kymriah® (Novartis) et l'axicabtagene ciloleucel/Yescarta® (Gilead) sont maintenant utilisés dans le traitement de Leucémies Aiguës Lymphoblastiques B (LAL B), de Lymphomes B Diffus à Grandes Cellules (LBDGC) et de Lymphomes Médiastinaux Primitifs à Grandes Cellules B (LMPGBCB) en rechute ou réfractaires (AMM européenne en 2018). Ces deux médicaments sont constitués de cellules T autologues génétiquement modifiées et exprimant un anticorps spécifique de l'antigène CD19 (CAR T Cell anti CD19).

A ce jour, de nombreux essais cliniques s'intéressent à ce nouveau mode de traitement très prometteur. Au-delà du coût, le défi majeur de l'immunothérapie cellulaire antitumorale réside dans le choix de la cible qui doit être à la fois spécifique et exprimée par l'ensemble des cellules tumorales.

C. Les cellules Natural killer

1. Présentation

Découvertes au début des années 70 par Rolf Kiessling et Ronald Herberman, les cellules Natural Killer ou cellules naturelles tueuses (NK) sont une sous famille de grands lymphocytes granuleux issus de la moelle osseuse. Elles représentent 10 à 15% des cellules mononucléées (CMN) du sang périphérique ou PBMC (Peripheral Blood Mononuclear Cell). Grâce à leur potentiel cytotoxique direct, elles participent à l'immunité innée par reconnaissance et destruction des cellules infectées ou étrangères.

Les cellules NK sont caractérisées par la présence à leur surface du **CD56** et l'**absence du CD3**. Elles peuvent être divisées en plusieurs sous-populations en fonction de leur stade de maturité basé sur l'expression du CD56 et du CD16.

2. Caractérisation

Les cellules NK sont issues d'un progéniteur hématopoïétique commun aux autres leucocytes exprimant le marqueur souche CD34+. Au fur et à mesure de la différenciation de la cellule souche de départ en cellules spécialisées, les cellules précurseurs vont peu à peu perdre l'expression du CD34 et acquérir celle du CD56. L'expression du CD56 variera ensuite en fonction du stade de maturité de la cellule NK.

a) Expression du CD56

Le CD56 ou NCAM (Neural Cell Adhesion Molecule) est une glycoprotéine transmembranaire jouant un rôle dans l'interaction et l'adhésion intercellulaire. Elle est principalement retrouvée au niveau du SNC sur les neurones et les cellules gliales mais également sur les cellules NK humaines différenciées matures et immatures.

En fonction du niveau d'expression, les cellules NK peuvent être divisées en 2 populations principales : les **CD56^{bright}** (immatures) et les **CD56^{dim}** (matures).

b) Expression du CD16

Le CD16 ou FcγRIII est un récepteur de faible affinité pour la partie constante des immunoglobulines G (IgG). Il joue un rôle essentiel dans la cytotoxicité dépendante des anticorps ou ADCC (Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity).

Au sein des cellules NK, il est exprimé par les cellules matures/**CD56^{dim}** et par certaines cellules immatures/**CD56^{bright}**. En fonction de l'expression du CD16 ou non, les cellules NK **CD56^{bright}** peuvent être divisées en 2 sous-populations : CD16+ et CD16-.

Il est également retrouvé sur d'autres cellules de l'immunité innée telles que les monocytes, les macrophages et les polynucléaires.

c) 3 sous populations

On peut ainsi diviser les cellules NK en 3 sous populations :

- Les **CD56^{bright} CD16-** : constituent la population immature. Elles sont localisées principalement au niveau des ganglions lymphatiques et des amygdales. Elles possèdent un fort potentiel prolifératif et jouent un rôle dans l'immunomodulation par sécrétion d'IFN γ en réponse à la stimulation par des cytokines comme l'IL12, l'IL15 et l'IL18
- Les **CD56^{bright} CD16+** : constituent une population de maturité intermédiaire.
- Les **CD56^{dim} CD16+** : constituent la population mature. Elles représentent 90% des cellules NK du sang périphérique et possèdent un fort potentiel cytotoxique. (Cheng et al., 2013)

3. Récepteurs activateurs et inhibiteurs

Les cellules NK sont ainsi capables de détruire directement les cellules étrangères ou altérées (tumoraux ou infectées) en l'absence d'immunisation spécifique préalable. En effet, contrairement aux lymphocytes T (LT) qui possèdent à leur surface un récepteur réarrangé spécifiquement pour un antigène donné, le TCR, les cellules NK expriment constitutivement un répertoire varié de récepteurs activateurs et inhibiteurs capables de reconnaître différents ligands. L'activation des cellules NK dépendra de la balance entre les signaux activateurs et inhibiteurs. (Tableau III)(Figure 9)

a) Les récepteurs inhibiteurs

Les récepteurs inhibiteurs sont capables de reconnaître les molécules CMH de classe I (Complexe Majeur d'Histocompatibilité) et ont pour but d'empêcher la destruction des cellules saines du soi.

KIR inhibiteurs

Les **KIR** (Killer cell Immunoglobulin-like Receptor ou CD158) inhibiteurs ou KIR-L (L : Long), possèdent un long domaine intracytoplasmique. Il existe 2 sous familles en fonction du nombre de domaines extracellulaires (2 ou 3D) : KIR2DL et KIR3DL. Les KIR-L contiennent au moins un motif intracytoplasmique ITIM permettant le recrutement des phosphatases SHP1 et SHP2 impliquées dans la transmission du signal d'inhibition.(Dalod and Tomasello, 2004) Les KIR inhibiteurs reconnaissent les molécules CMH de classe I classiques HLA-A,-B et C (Human Leukocyte Antigen).

LIR ou ILT

Les **LIR** (Leukocyte Immunoglobulin-like Receptor) ou ILT (Immunoglobulin-Like Transcript) représentent une famille de récepteurs possédant une large distribution cellulaire. Le LIR1 ou ILT2 retrouvé sur certaines cellules NK peut interagir avec les molécules CMH de classe I classiques ou non ainsi qu'avec la molécule UL18 synthétisée par le CMV (Cytomégalovirus)

NKG inhibiteurs

Les NKG (Natural Killer Group) inhibiteurs sont composés des hétérodimères **NKG2A/CD94** et **NKG2B/CD94**. Ce sont des récepteurs appartenant à la famille des lectines C. Ils reconnaissent des molécules CMH de classe I HLA-E. Grâce à leur motif ITIM, ils peuvent transmettre un signal inhibiteur.

b) Les récepteurs activateurs

Les récepteurs activateurs sont capables de reconnaître et interagir avec des molécules exprimées à la surface de cellules lors du **stress cellulaire**.

NKG activateurs

Les NKG activateurs comprennent le **NKG2D** et l'hétérodimère **NKG2C/CD94**. Ces récepteurs appartiennent à la famille des lectines C. Le NKG2D reconnaît des molécules apparentées aux molécules du CMH de classe I comme **MICA**, **MICB** (Major histocompatibility complex class I related Chain A/B) et **ULBP** (UL-16 binding protein). Il se lie à la molécule DAP10 qui contient le motif YINM qui va recruter la PI3-K qui va induire un signal activateur.

NKG2C/CD94 est associé au polypeptide DAP12 (ou KARAP) contenant un motif ITAM indispensable à la transmission intracellulaire des signaux d'activation.

NCR

Les NCR (Natural Cytotoxicity Receptors) représentent une famille comprenant les récepteurs suivants : **NKp46** (NCR1), **NKp44** (NCR2) et **NKp30** (NCR3).

NKp46 et NKp30 sont exprimés constitutivement sur les cellules NK alors que NKp44 n'est exprimé que sur les NK activées. Les NCR possèdent un large panel de ligands, qui ne cesse de croître. (Figure 10) Ces ligands sont exprimés principalement par les cellules tumorales ou infectées par des virus (comme les hémagglutinines et hémagglutinines neuraminidases) mais également par des parasites ou des bactéries. Ainsi, NKp30 et NKp46 sont capables de reconnaître la protéine PfEMP1 exprimée à la surface des érythrocytes infectés par plasmodium, et NKp44 des ligands bactériens de *Mycobacterium tuberculosis* et *Pseudomonas aeruginosa*. Au niveau cellulaire, la protéine PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) et l'antigène B7H6 retrouvés sur divers tumeurs ont été identifiés comme ligands respectifs de NKp44 et NKp30 ; la protéine BAT3 (HLA-B associated transcript-3) retrouvée à la surface de cellules tumorales ou corps apoptotiques est également un ligand de NKp30. Récemment, Barrow et al ont montré que le facteur de croissance PDGF-DD, très exprimé à la surface de certaines cellules tumorales tel que le glioblastome, pouvait activer les cellules NK via le NKp44. (Barrow et al., 2018b) Enfin, il a été montré que certains ligands pouvaient également inhiber les NK par liaison à leur NCR, ce serait notamment le cas lors d'une liaison directe entre l'antigène pp65 du CMV et NKp30. (Kruse et al., 2014)

Les NCR sont associés à des molécules contenant les motifs ITAM responsables de la transmission intracellulaire des signaux d'activation.

KIR activateurs

Les **KIR** activateurs ou KIR-S (S : Short), possèdent un court domaine intracytoplasmique. Ils sont également associés au polypeptide DAP12 contenant des motifs ITAM. Comme pour les KIR inhibiteurs, ils peuvent être divisés en 2 sous familles en fonction du nombre de domaines extracellulaires (2 ou 3 D) : KIR2DS et KIR3DS. (Dalod and Tomasello, 2004)

DNAM1

Le **DNAM1** (DNAX Accessory Molecule-1) ou CD226 reconnaît les molécules de nectine et nectine-like (Necl) qui sont des molécules d'adhérence exprimées lors de stress cellulaire, comme le PVR (Polio Virus Receptor) (CD155 ou Necl-5) ou la Nectine 2 (CD112). (Dalod and Tomasello, 2004)

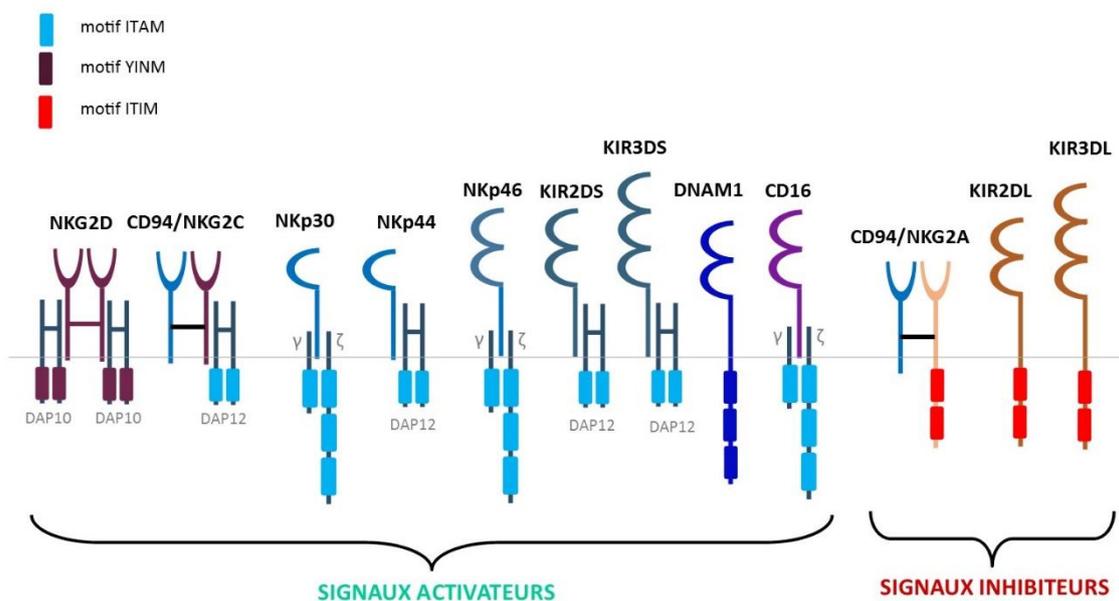


Figure 9 Diversité des récepteurs activateurs et inhibiteurs des cellules NK

Tableau III Récepteurs activateurs et inhibiteurs principaux des cellules NK et ligands associés

Récepteurs activateurs	Ligands	Récepteurs inhibiteurs	Ligands
NCR : NKp30, NKp44, NKp46	Divers ligands d'origine microbienne ou cellulaire		
DNAM1	PVR Nectine 2		
NKG2D	MICA MICB ULBP		
NKG2C/CD94	HLA E	NKG2A/CD94 NKG2B/CD94	HLA E
KIR-S	HLA A, B, C (molécules CMH I classiques)	KIR-L	HLA A, B, C (molécules CMH I classiques)
		LIR1 ou ILT2	HLA A, B, C, E, G UL18

NCR	Ligand	Signal	References
NKp30	HA of the ectromelia and vaccinia virus	Inhibition	46
	Released pp65 of the human cytomegalovirus	Inhibition	52
	PfEMP1 of <i>Plasmodium falciparum</i>	Activation	60
	Heparin and heparan sulphates	Activation	70-72
	BAT3 on tumour cells, stressed cells and DC	Activation	88
	B7-H6 on tumour cells	Activation	35,94
NKp44	HA and HN of the influenza virus, Sendai virus and Newcastle disease virus	Activation	43-45
	Envelope glycoprotein of the Dengue and West Nile viruses	Activation	54
	Unknown ligand of <i>Mycobacterium tuberculosis</i> , <i>M. bovis</i> , <i>Nocardia farcinica</i> and <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Unknown	56,57
	Heparin and heparan sulphates	Activation	70
	PCNA expressed on tumour cells	Inhibition	28,79
NKp46	NKp44L expressed on tumour cells and bystander CD4 ⁺ cell during HIV infection	Activation	81,84,85
	HA and HN of the influenza virus, Sendai virus, Newcastle disease virus, ectromelia virus and vaccine virus	Activation	42,43,45,46
	Vimentin expressed on <i>M. tuberculosis</i> -infected cells	Activation	58
	Unknown ligand of <i>Fusobacterium nucleatum</i>	Activation	59
	PfEMP1 of <i>Plasmodium falciparum</i>	Activation	60
	Heparin and heparan sulphates	Activation	70,72
	Unknown ligand on pancreatic β Langerhans cells	Activation	68,69

Abbreviations: BAT3, HLA-B-associated transcript 3; DC, dendritic cell; HA, hemagglutinins; HIV, human immunodeficiency virus; HN, hemagglutinin neuraminidases; NCR, natural cytotoxicity receptor; PCNA, proliferating cell nuclear antigen; *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein-1 (PfEMP1).

Figure 10 Récepteurs NCR et leurs ligands (Kruse et al. 2014)

c) La balance signaux activateurs/inhibiteurs

La cellule NK va s'activer ou non en fonction du nombre d'interactions ligand/récepteur activateurs et inhibiteurs présentes sur une cellule cible donnée.

En présence d'une balance « activatrice » favorable, la cellule NK s'activera et libérera le contenu de ces granules cytotoxiques dans le milieu extracellulaire afin de détruire la cellule cible. En présence d'une balance « inhibitrice », la cellule NK ne s'activera pas et continuera son chemin à la recherche d'autres cellules anormales à détruire. Trois situations peuvent être décrites : (**Figure 11**)

Rencontre avec une cellule saine du soi

En cas de rencontre avec une cellule saine exprimant normalement les molécules du CMH de classe I, ces dernières vont interagir avec les récepteurs inhibiteurs de la cellule NK et conduire à son inactivation : c'est la reconnaissance classique du soi.

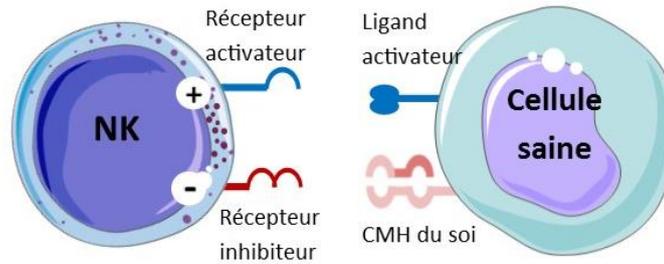
Activation par « missing self »

En cas de rencontre avec une cellule étrangère ou modifiée n'exprimant pas ou peu les molécules du CMH de classe I du soi, les NK s'activeront par absence de signaux inhibiteurs : c'est la situation du soi manquant ou « *missing self* ».

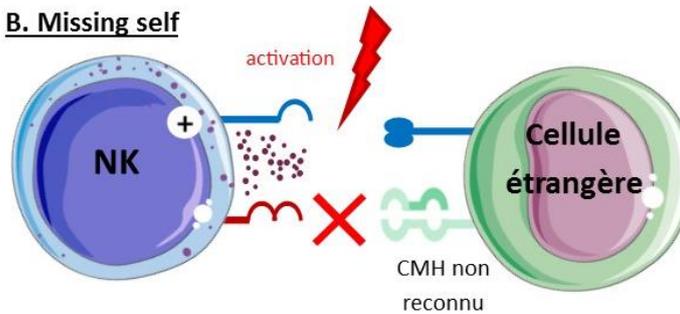
Activation par « stress induced self ligand »

En cas de rencontre avec une cellule modifiée exprimant des marqueurs de stress cellulaire ligands des récepteurs activateurs des NK, celles-ci s'activeront par présence de signaux activateurs : c'est la situation « *stress induced self ligand* ».(Cheng et al., 2013)

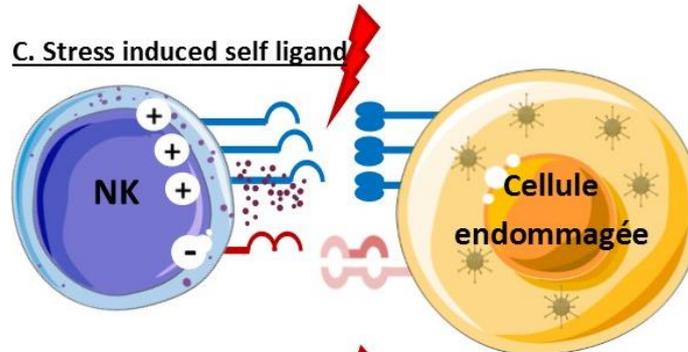
A. Reconnaissance du soi



B. Missing self



C. Stress induced self ligand



D. Association de plusieurs mécanismes

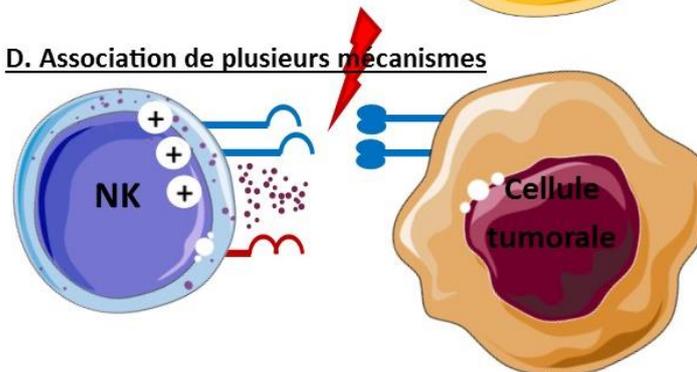


Figure 11 : Balance entre les signaux activateurs et inhibiteurs

A. Cas de la reconnaissance d'une cellule du soi par la cellule NK : pas d'activation. B. Situation de « *missing self* » lors de la rencontre avec une cellule étrangère aux CMH de classe I non reconnues : activation. C. Situation de « *stress induced self ligand* » lors de la rencontre avec une cellule du soi modifiée exprimant des marqueurs de stress : activation. D. Cas de la rencontre avec une cellule tumorale n'exprimant plus les molécules CMH de classe I mais des marqueurs de stress : activation.

4. Les mécanismes de cytotoxicité

a) La cytotoxicité naturelle des cellules NK via la production de granules cytotoxiques

Le mécanisme le plus connu est lié à la production et libération de **granules lytiques** et **cytotoxiques** lorsque la cellule NK est activée par balance « activatrice » favorable.

Suite à la reconnaissance de la cellule cible par la cellule NK, les 2 types de cellules vont se conjuguer et former une synapse immunologique « lytique ». Les cellules NK vont ainsi pouvoir libérer par exocytose le contenu de leurs granules contenant notamment un couple d'enzymes : la **perforine** et le **granzyme**. En présence de calcium, la perforine va s'ancrer et se polymériser à la membrane de la cellule cible ce qui va entraîner la formation de pores permettant la pénétration du granzyme à l'intérieur de la cellule.

Les granzymes humains (A, B, H, K et M), sont des enzymes de type sérine protéase qui sont capables de lyser les substrats intracellulaires. Les plus abondants sont les granzymes A et B.

Le granzyme B, qui est le plus étudié, est capable d'induire la mort de la cible par des mécanismes caspases-dépendants et indépendants. Comme les caspases, il clive les protéines au niveau des acides aspartiques. Cela va activer la caspase 3 et déclencher la cascade protéolytique des caspases, aboutissant à l'activation de la CAD (Caspase-Activated Deoxyribonuclease) qui va dégrader l'ADN. Il peut également activer la voie des caspases de manière indirecte par clivage et activation de la molécule proapoptotique BID (appartenant à la famille des Bcl2), ce qui va induire la libération d'autres facteurs proapoptotiques de l'espace intermembranaire mitochondrial comme le cytochrome C. L'assemblage du cytochrome C à l'APAF1 (Apoptotic Peptidase Activating Factor 1) va former l'apoptosome qui va permettre l'activation de pro caspase 9 en caspase 9 initiateur activant à son tour la caspase 3 effectrice ; d'autre part, la libération par la mitochondrie de molécules comme AIF (Apoptosis Inducing Factor) et EndoG (Endonuclease G) qui sont deux facteurs de fragmentation d'ADN. Ces facteurs vont ainsi induire la mort de la cellule par une voie indépendante de celles des caspases. (Figure 12)

Le granzyme A déclenche la mort cellulaire par altération des mitochondries indépendamment de la voie des caspases par des mécanismes différents du granzyme B et non élucidés.

Une autre protéine pouvant endommager les membranes a été identifiée dans les granules cytotoxiques, la **granulysine**. En plus de posséder une activité antimicrobienne, elle est également capable d'induire l'apoptose de cellules cibles. (Dorothee et al., 2004)(Orange, 2008)(Janeway and Murphy, 2018)

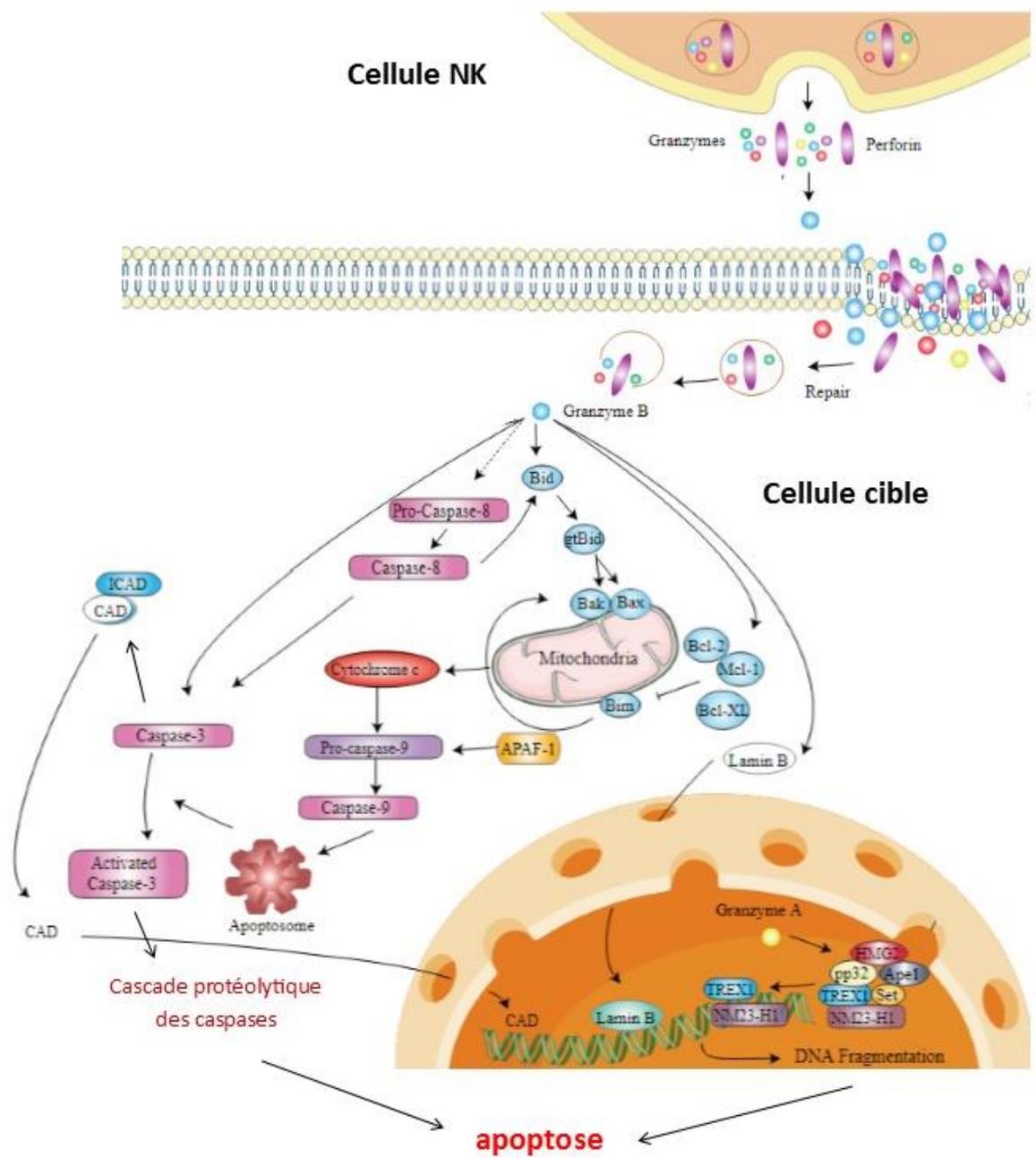


Figure 12 : Mécanisme cytotoxique du Granzyme B (Creative Diagnostics ®)

b) L'ADCC

En présence de cellules cibles à détruire dans l'organisme, les cellules NK sont capables de reconnaître et fixer via leurs récepteurs CD16 (FcγRIII) le fragment Fc d'IgG affines pour ces cellules cibles. Ce mécanisme cytotoxique qui implique la présence d'anticorps est appelé ADCC (Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity). Une fois le complexe formé entre ces 3 éléments NK-IgG-cible, le CD16 va s'associer aux molécules FcεR1γ et CD3ζ contenant des motifs ITAM permettant la transmission de signaux activateurs intracellulaires et la libération de granules cytotoxiques.

c) L'activation des récepteurs de mort

Ce mécanisme est indépendant de la production de granzyme et perforine mais fait intervenir des « récepteurs de mort ». Elle est liée à l'expression membranaire par certaines cellules NK de molécules de la famille des TNF (Tumor-Necrosis Factor) : le **TRAIL** (TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand) et le **FasL** (Fas Ligand) qui vont induire l'apoptose des cellules portant les récepteurs de mort correspondants (FAS et TRAILR) par activation de la voie des caspases.

d) Mécanismes indirects

Les cellules NK participent également à l'immunité antitumorale indirecte par interaction avec les lymphocytes T (LT), les macrophages, les cellules dendritiques, les cellules endothéliales par contact direct ou via la sécrétion de cytokines (IFN γ , IL10, TNF α) et de facteurs de croissance. (Cheng et al., 2013)

D. Utilisation des cellules Natural Killer en immunothérapie antitumorale

1. Intérêt de l'utilisation des cellules NK en immunothérapie antitumorale

L'intérêt majeur de l'utilisation des cellules NK comme **immunothérapie biologique ciblée** dans le traitement du cancer repose sur leur capacité à reconnaître et à détruire les cellules transformées comme les cellules tumorales, et ce de **manière innée**. La diminution ou la perte d'expression des molécules de CMH de classe I par les cellules tumorales serait un avantage supplémentaire par rapport à une thérapie par des lymphocytes T car elle permettrait de lever l'inhibition sur les cellules NK (normalement induite par le CMH I du soi). Enfin leur spécificité par rapport aux traitements conventionnels permettrait de **préserver les cellules saines** et donc de limiter les effets secondaires et séquelles à long terme.

De plus, plusieurs auteurs ont montré que les cellules NK cibleraient préférentiellement **cellules souches cancéreuses** (CSC).(Luna et al., 2017) (Kaur et al., 2018) Dans le modèle d'oncogenèse hiérarchique, les CSC sont les cellules ayant la capacité de proliférer de façon indéfinie et de donner naissance à toutes les autres cellules de la masse tumorale. Ces cellules auraient en outre la possibilité d'entrer en phase de quiescence, la capacité d'activer les voies de signalisation anti-apoptotiques, d'augmenter l'activité de leurs transporteurs membranaires, de migrer, de survivre en l'absence de substrat, et de résister à l'hypoxie. (Wicha et al., 2006) L'ensemble de ces propriétés leur permettrait de **former des métastases** et de **résister aux traitements anti-tumoraux conventionnels**. De ce fait la présence de CSC pourrait expliquer certains échecs thérapeutiques et rechute de la maladie.

A ce jour, plusieurs marqueurs sont utilisés pour identifier les cellules souches tumorales tel que l'expression de **SOX2**, facteur de transcription essentiel au maintien de l'auto renouvellement de la cellule, l'expression de **l'ALDH**, enzyme intervenant dans le métabolisme de l'acide rétinoïque et jouant un rôle dans le contrôle de la différenciation cellulaire, ou encore l'expression de la glycoprotéine **CD133** (dans les tumeurs cérébrales).

Plusieurs études ont montré que les cellules NK étaient capables de lyser *in vitro* des CSC de gliomes issus de lignées continues (Ames et al., 2015) ou de patients en particulier lors d'une activation préalable par de l'IL2 ou de l'IL15 (Castriconi et al., 2007)(Castriconi et al., 2009)(Avril et al., 2012) .

Enfin, quelques études ont montré que les cellules NK étaient capables de **traverser la barrière hématoencéphalique** lors de situations inflammatoires et ischémiques (Stevens et al., 1988)(Chen et al., 2019), mais également **d'infiltrer des tumeurs cérébrales**. (Kmieciak et al., 2014)

2. Modèles d'étude des tumeurs cérébrales *in vitro* et *in vivo* chez l'animal

a) Etude *in vitro*

Lignée cellulaire établie

Les lignées cellulaires continues établies présentent l'avantage d'être faciles à entretenir et à expandre de manière uniforme. Elles permettent également de reproduire des expériences entre différents laboratoires ce qui accroît la reproductibilité des résultats expérimentaux.

A ce jour, il existe de nombreuses lignées cellulaires pour l'étude des TPS. Les plus citées dans la littérature sont les lignées DAOY, UW228, D283, D341 et D425 pour le médulloblastome (Ivanov et al., 2016) et les lignées U87 et U251 pour les gliomes. (Lenting et al., 2017)

Il existe cependant des inconvénients à ce type de modèle. En plus des biais de sélection, du risque de dérive phénotypique, il existe peu de diversité dans les caractéristiques génétiques de la plupart de lignées cellulaires établies. (Ivanov et al., 2016)

Culture primaire

Les cultures de cellules ou de tissus issus de patients ou d'animaux ont été à l'origine des premiers modèles d'étude *in vitro*. Bien que ce modèle soit très proche du tissu d'origine, il constitue souvent un mélange hétérogène de cellules différentes ce qui rend leur culture difficilement standardisable et les résultats très variables. De plus après plusieurs passages, les cellules soumises à la pression de sélection en milieu de culture tendent à former des lignées cellulaires continues. (Ivanov et al., 2016)

b) Etude *in vivo*

Grefe

Le type de greffe le plus réalisé en recherche est la xénogreffe basée sur l'inoculation de cellules ou tissus humains chez des animaux. Après manipulation *in vivo* ou *in vitro*, ces tissus ou cellules issus de tumeurs excisées, de cultures primaires, ou cultures de lignées continues établies peuvent être transplantés chez des souris en sous-cutané (ectopique) ou en orthotopique. Ces modèles permettent de réaliser des études *in vivo* de manière rapide, reproductibles, peu coûteuses, et flexibles dans le choix du type de tumeur. (Wu et al., 2011)

Des animaux immunodéprimés sont souvent utilisés afin de favoriser la prise de greffe.

Il existe plusieurs modèles de souris immunodéprimées dont :

- les **souris nude** : elles sont dépourvues de thymus ce qui induit un déficit en lymphocytes T fonctionnels.
- les **souris SCID** (Severe Combined ImmunoDeficiency) : elles possèdent une mutation au niveau du gène Prkdc, impliqué dans la réparation de l'ADN lors des recombinaisons VDJ. Cela induit un déficit en lymphocytes T et B matures.

- les **souris NSG** : ce sont des souris **NOS SCID** présentant une inactivation de la chaîne commune γc de l'interleukine 2 : elles sont dépourvues de lymphocytes B et T et de cellules NK

Souris GEMMs

Les souris génétiquement modifiées (GEMMs : Genetically Engineered Mouse Models) ont été créées dans le but de mieux comprendre le développement de tumeur. Ces dernières se développent de *novo*, en interaction avec le stroma chez des souris immunocompétentes. Elles constituent un modèle utile pour l'étude de phénomènes *in vivo*. Cependant ce type de modèle coûte cher et offre peu de flexibilité dans le choix des caractéristiques de la tumeur. (Ivanov et al., 2016).

3. Le transfert adoptif de cellules NK

Il existe 4 sources principales de cellules NK pour l'utilisation en immunothérapie : les cellules NK autologues, les cellules NK allogéniques, les lignées continues de cellules NK et les cellules NK génétiquement modifiées. (Figure 15)

a) Les cellules NK autologues

La première stratégie est l'utilisation de cellules NK issues du patient lui-même ou NK autologues. Les avantages de ce type de greffe sont la biocompatibilité, les faibles risques de réaction immunitaire, et l'absence de risque de transmission de maladies.

Historiquement, les premières approches d'immunothérapies cellulaires ont été basées sur la génération de LAK (Lymphokine-Activated Killer) ou cellules tueuses activées par des cytokines. Les LAK sont obtenues par stimulation des cellules mononucléées par de fortes doses d'interleukines afin de favoriser la production et la prolifération de cellules hautement cytotoxiques composées non seulement de cellules NK mais également de lymphocytes T CD8, et de cellules NKT (CD56+ et CD3+). Initialement l'interleukine était injectée directement par voie systémique afin de favoriser la prolifération des LAK *in vivo* mais du fait d'une forte toxicité secondaire à l'injection d'IL2 cette technique fut rapidement abandonnée. Secondairement les LAK furent préparées *ex vivo* avant d'être réinjectées au patient avec des doses plus faibles d'IL2. Le succès limité et les effets secondaires liés à l'IL2 limitèrent l'intérêt de cette méthode. (Rosenberg et al., 1985)

La deuxième approche a été l'expansion *ex vivo* des propres cellules NK du patient avant réinjection. Malheureusement cette méthode a montré un succès limité lié à l'inhibition des cellules NK par les cellules tumorales exprimant le CMH de classe 1 du soi. (Cheng et al., 2013) Certains auteurs décrivent cependant que la culture prolongée de cellules NK en présence de cytokines comme l'IL15 permettrait de lever cette inhibition. (Nicholson et al., 2017)(Wagner et al., 2017)

b) Les cellules NK allogéniques

La seconde stratégie est l'utilisation de cellules NK allogéniques. Elle consiste à récupérer des cellules NK chez un donneur sain, de les expandre *ex vivo* et de les réinjecter à un patient malade.

Après sélection du donneur, une partie de ses globules blancs sont prélevés par leucaphérèse. Les CMN ainsi obtenus sont triés de manière à éliminer les lymphocytes T qui pourraient avoir un effet cytotoxique envers les cellules saines du receveur. Les cellules NK ainsi triées sont mises en culture dans un milieu riche en protéines et acides aminés et incubées à 37°C pendant plusieurs jours ou semaines. Selon les protocoles, les cellules NK sont cultivées en présence ou non des cellules nourricières (appelées feeders) et de cytokines (IL2, IL15, IL7) qui vont favoriser leur croissance, leur sélection et leur pouvoir cytotoxique. Les cellules nourricières correspondent à des cellules irradiées qui ne sont plus capables de proliférer. Elles peuvent être constituées de cellules autologues aux cellules NK (CMN irradiées) ou allogéniques (comme dans l'étude de Fujisaki et al qui utilisent des cellules tumorales K562 génétiquement modifiées comme feeders)(Fujisaki et al., 2009). Au fur et à mesure de la culture les cellules NK vont se multiplier et les autres CMN disparaîtront par effet de compétition. Après obtention d'un nombre suffisant de cellules NK, ces dernières sont lavées avant de pouvoir être réinjectées au patient malade.

Cette stratégie semble très prometteuse notamment dans le traitement d'hémopathies malignes et ce, grâce au « *mismatch* » entre les KIR inhibiteurs des cellules NK et les molécules du CMH de classe 1 des cellules malignes non reconnues comme étant du soi et permettant ainsi la levée de l'inhibition des NK.(Ruggeri et al., 2005)(Miller, 2005). En 2011, Curti et al ont rapporté les résultats d'un essai clinique de phase I dans lequel des cellules NK allogéniques à fort mismatch ont été infusées (environ 3.10^6 /kg) en association à de l'IL2 chez des patients atteints de leucémie aigüe à haut risque de rechute (sur des critères de cytogénétique). Secondairement au traitement, une rémission complète (supérieure à 18 mois) a été obtenue chez 6 des 13 patients traités et aucun effet toxique ou réaction immunitaire n'ont été rapportés. (Curti et al., 2011)

L'une des difficultés majeures de cette approche est l'expansion limitée des cellules NK *ex vivo* et de leur persistance dans l'organisme après réinjection en l'absence de cytokine. L'alloréactivité potentielle générée par les cellules immunitaires de certains patients contre ces cellules NK est également un problème à prendre en compte. D'autres stratégies associant l'utilisation de NK allogéniques en combinaison avec des anticorps monoclonaux ou d'autres molécules se développent actuellement afin de potentialiser l'effet des cellules NK *in vivo*.(Cheng et al., 2013)

c) Les lignées continues de cellules NK

La troisième stratégie est basée sur l'utilisation de lignées établies continues de cellules NK. Ces lignées sont dérivées de clones NK malins comme les cellules NK92, NKL, NKG, NK-YS, KHYG-1. L'avantage de ces lignées est de pouvoir se multiplier indéfiniment en présence de faible quantité d'interleukines. Elles conservent également de bonnes fonctions cytotoxiques et ont une expression diminuée de leurs récepteurs KIR.(Zitvogel et al., 2015)

La plus connue et la plus étudiée est la lignée NK 92. Elle est issue d'un patient atteint d'une leucémie à grands lymphocytes granuleux (LGL) de type NK. Sa prolifération est dépendante de l'interleukine 2 mais en faible quantité en comparaison à des cellules NK dérivées de donneurs sains. De plus, elle est capable de se multiplier indéfiniment et supporte très bien la cryoconservation. Elle peut ainsi être facilement expandue, de manière reproductible, à un faible coût, et selon les BPF (Bonnes Pratiques de Fabrication). Cette lignée aurait également un pouvoir cytotoxique supérieur aux autres lignées continues de NK ainsi qu'aux cellules NK allogéniques issues de donneurs sains. De plus elles seraient peu immunogène du fait d'une faible expression de molécules de CMH de classe 1 à sa surface.(Suck et al., 2016)(Klingemann et al., 2016)

Pour éviter tout risque de prolifération *in vivo*, les cellules doivent cependant être irradiées avant réinjection chez le patient. Lors d'un essai clinique de phase I, Tonn et al ont évalué la sécurité de l'utilisation de cellules NK92 irradiées (jusqu'à $10^{10}/m^2$) chez 15 patients atteints de tumeurs solides, de leucémies ou lymphomes. Les auteurs ont montré que les cellules persistaient au moins 48h dans la circulation. Un seul patient développa des anticorps contre les cellules NK92. Aucun effet secondaire au long terme ne fut observé chez les autres patients. (Tonn et al., 2013) L'alloréactivité générée par les cellules immunitaires de certains patients contre les lignées continues de NK est une limite à cette méthode même si elle reste rare. Plusieurs essais cliniques évaluant l'efficacité de ce type de cellules dans le traitement de divers cancers sont actuellement en cours. L'utilisation de cellules NK92 montre déjà des résultats encourageant notamment dans le traitement du cancer du poumon.(Suck et al., 2016) (Park et al., 2019)

d) Les cellules NK génétiquement modifiées

La dernière stratégie est basée sur l'utilisation de cellules NK modifiées génétiquement afin de les rendre plus efficaces et plus résistantes. L'une des dernières techniques mise au point est la fabrication de CAR-NK (Récepteur d'Antigène Chimérique) qui sont des cellules NK exprimant un récepteur chimérique pour un antigène tumoral donné. Les CAR sont fabriqués par fusion de fragments variables des chaînes lourdes d'immunoglobulines (scFc) à un ou plusieurs domaines de signalisation intracellulaire (comme CD3 ζ , CD28, DAP12...)(Figure 13). La fabrication de ces cellules modifiées est réalisée par la transduction du gène codant le CAR grâce à un vecteur viral. (Figure 14)

L'un des avantages des cellules CAR-NK par rapport aux CAR-T (lymphocytes T exprimant ce récepteur CAR très étudiées actuellement) est qu'elles offrent une plus grande sécurité clinique puisqu'elles n'induisent pas de GvHD (Graft-versus-Host Disease, qui correspond à l'attaque des cellules T du donneur contre les cellules du receveur). Plusieurs essais précliniques et cliniques sont actuellement en cours, notamment le traitement de leucémies et de lymphomes (NCT02892695 et NCT03056339 avec ciblage du CD19) mais également de tumeurs solides (ciblage de l'EGFR...).(Mehta and Rezvani, 2018) (Hu et al., 2017)

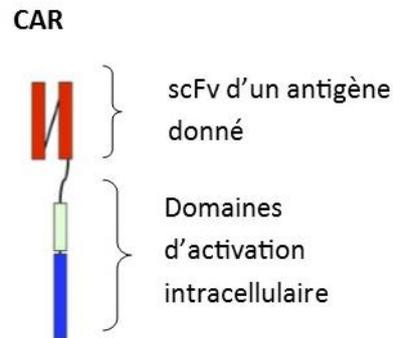


Figure 13 : Structure d'un Récepteur Antigénique Chimérique (CAR)

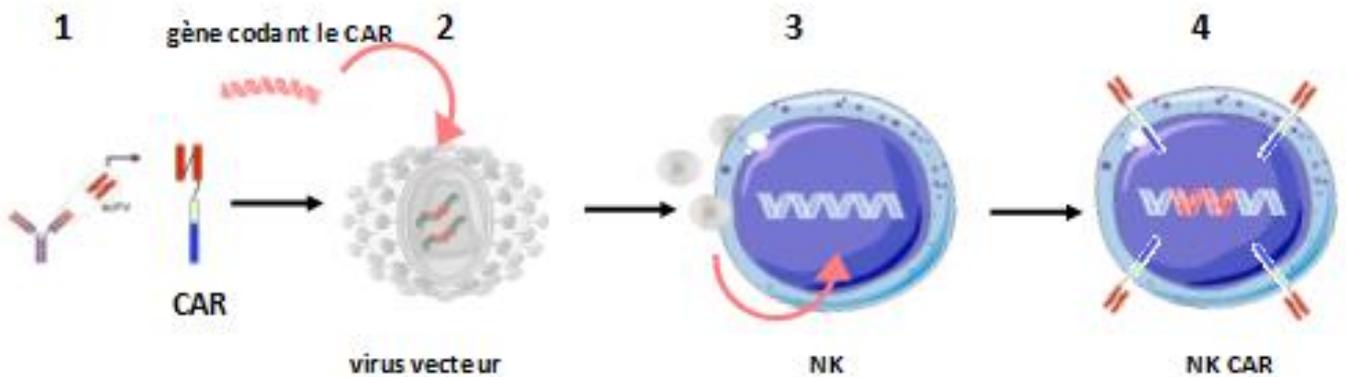


Figure 14 : Principe de fabrication d'une cellule NK génétiquement modifiée à partir d'un vecteur viral pour exprimer un récepteur CAR (CAR-NK)

1. Construction du Récepteur d'Antigène Chimérique (CAR) à partir de scFc d'immunoglobulines ciblant un antigène donné
2. Intégration du gène codant pour le CAR dans un vecteur viral
3. Transduction du gène codant pour le CAR aux cellules NK
4. Intégration du gène codant pour le CAR au génome de la cellule NK et production du récepteur par la cellule

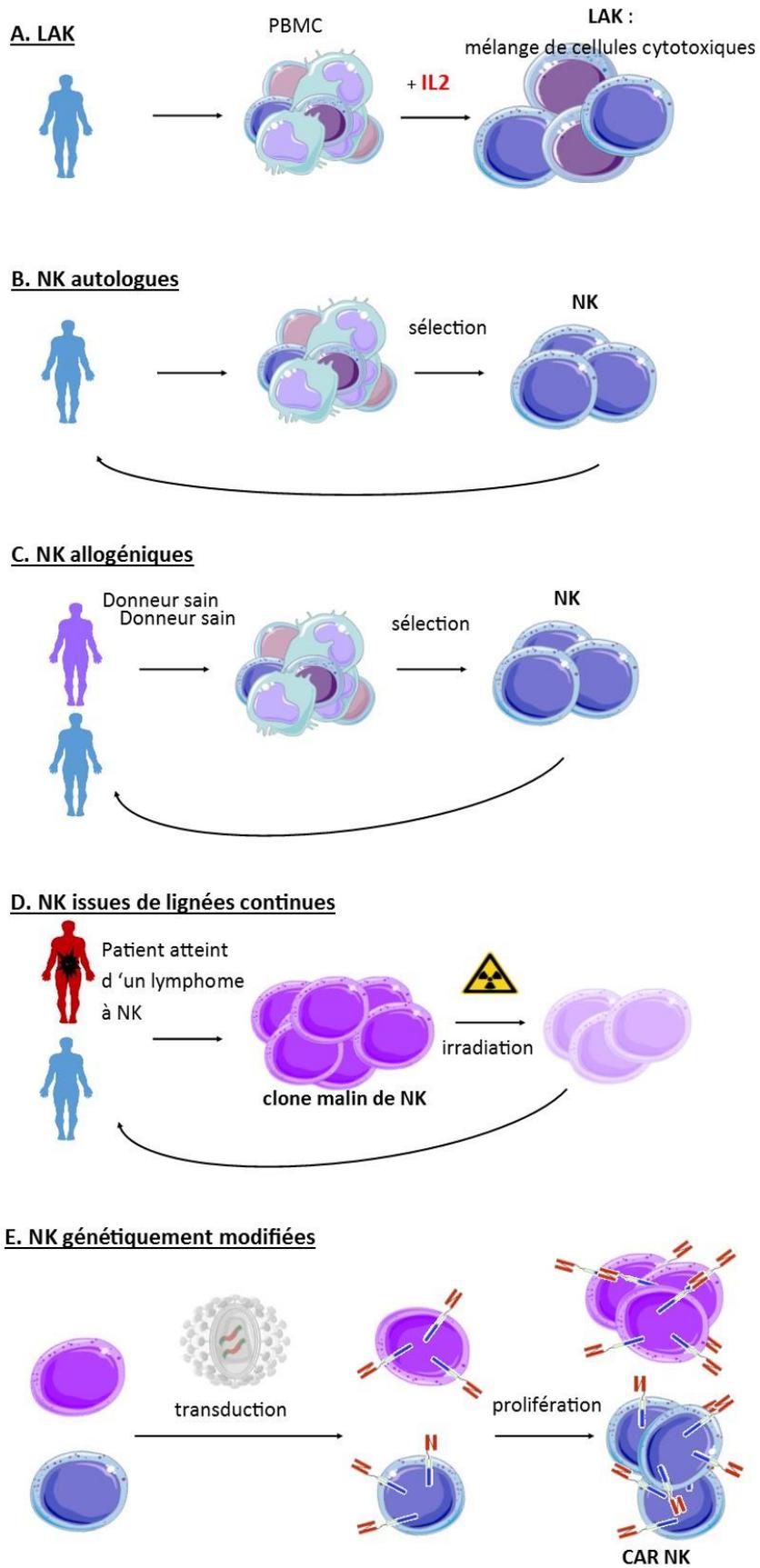


Figure 15 : Différentes sources de NK utilisées en thérapie

4. Utilisation des cellules NK dans le traitement des tumeurs cérébrales primitives

A ce jour, l'immunothérapie par les cellules NK semble avoir suscité un intérêt pour 2 types de TPS : les **glioblastomes** et dans une moindre mesure les **médulloblastomes**.

Quelques études ont également introduit dans leurs cohortes des patients atteints d'autres gliomes ou d'autres types de tumeurs cérébrales (Merchant et al., 1988) (Lillehei et al., 1991) (Hayes et al., 1995) (Ishikawa et al., 2004), mais du fait du faible nombre de patients inclus, aucune conclusion quant à l'efficacité de la thérapie n'a pu être établie.

5. Thérapie par cellules NK dans le traitement du glioblastome

Du fait du pronostic péjoratif du glioblastome, de nombreuses stratégies thérapeutiques ont été étudiées dont l'immunothérapie par les cellules NK.

a) Utilisation de LAK autologues et d'IL2 en intra cérébrale dans des essais cliniques

Essais de phase I

A partir des années 80, plusieurs essais cliniques de phase 1 basés sur l'utilisation de LAK ont été conduits chez des patients atteints de gliomes malins. Différentes stratégies ont été testées. La première étude clinique de phase 1 réalisée en 1985 chez 10 patients était basée sur l'injection 10^8 à 10^{10} LAK et/ou d'IL2 (10^4 unités) dans la cavité postopératoire juste après exérèse tumorale. Elle a permis de montrer que cette **technique était sûre** (fréquence des complications postopératoires non supérieure par rapport aux patients ayant subi une exérèse seule) et n'induisait pas toxicité particulière chez les patients. (Jacobs et al., 1986)

Après cet essai préliminaire plusieurs études associant injections intracavitaires de cellules NK et d'IL2 à différentes doses et fréquences et selon différentes modalités furent réalisées.

L'étude de Barba et al rapporte l'effet d'injections répétées de LAK (jusqu'à $20 \cdot 10^9$) et d'IL2 (jusqu'à 45×10^4 U/kg) chez 10 patients atteints de gliomes malins. L'injection fut réalisée en intra cérébrale via un réservoir relié à un cathéter (Ommaya)(Figure 16) soit directement dans la tumeur (par stéréotaxie), soit dans la cavité de résection tumorale. Secondairement à ces injections, 5 patients développèrent des **œdèmes péritumoraux** responsables de déficits neurologiques irréversibles en rapport avec à la région du cerveau ayant reçu le traitement. (Barba et al., 1989)

L'étude de Lillehei et al réalisée chez 9 patients atteintes de glioblastomes (et 2 astrocytomes malins) était basée sur un principe similaire mais avec des **concentrations plus faibles en IL2** ($400 \cdot 10^4$ U maximum) et un schéma d'administration différent. Les LAK furent déposées en 1 fois dans la cavité de résection via une matrice de gluconate de calcium et l'IL2 administrée de manière répétée via un réservoir (de Richham) relié à un cathéter. Cette étude n'a pas montré d'effet toxique majeur. L'analyse *ex vivo* des cellules administrées a cependant révélé que les patients ayant reçu une chimiothérapie préalable possédaient des LAK moins cytotoxiques. (Lillehei et al., 1991)

Essais de phase II et III

A partir de 1995, plusieurs essais de **phases II et III** basés sur le principe d'injections répétées d'IL2 et de LAK furent réalisées et montrèrent des résultats encourageants.

L'étude de Hayes et *al* (jusqu'à $3400 \cdot 10^4$ U d'IL2 et $20 \cdot 10^9$ LAK via un réservoir Ommaya) fut réalisée chez 15 patients atteints de glioblastomes, comparés à un groupe témoins de 18 patients. Les auteurs rapportent **une augmentation significativement de la survie** médiane de 26 à 53 mois avec le traitement par LAK. Malheureusement 4 patients développèrent des œdèmes cérébraux associés à des déficits neurologiques imputables à une **trop forte dose d'IL2** administrée. L'effet toxique fut cependant résolutif chez tous les patients en moins de 24h. (Hayes et al., 1995)

Deux autres études rapportées par Dillman et al (Dillman et al., 2004) (Dillman et al., 2009) furent réalisées chez de grandes cohortes de patients. La première fut réalisée chez 31 patients atteints de glioblastomes et comparée à une cohorte de 41 patients traités selon les protocoles de l'époque. La deuxième fut réalisée chez 40 patients et comparée à la survie générale des patients atteints de GBM au moment de l'étude. Dans les deux essais les patients recevaient en moyenne $2 \cdot 10^9$ LAK (sans injection d'IL2 supplémentaire) en guise de **thérapie adjuvante** aux autres moyens conventionnels (chirurgie, radiothérapie, radiochirurgie et chimiothérapie par temozolomide). Dans les 2 études une augmentation de la médiane de survie à partir du diagnostic fut montrée (17,5 mois contre 13,6 dans le groupe témoin pour la première et 20,5 mois contre 12 à 15 mois pour la deuxième). Aucun effet secondaire majeur n'a été observé dans les 2 essais.

Malgré une augmentation de la survie retrouvée dans ces quelques études, l'effet inconstant et fugace des LAK et la toxicité potentielle liée à l'IL2 menèrent à envisager d'autres stratégies.

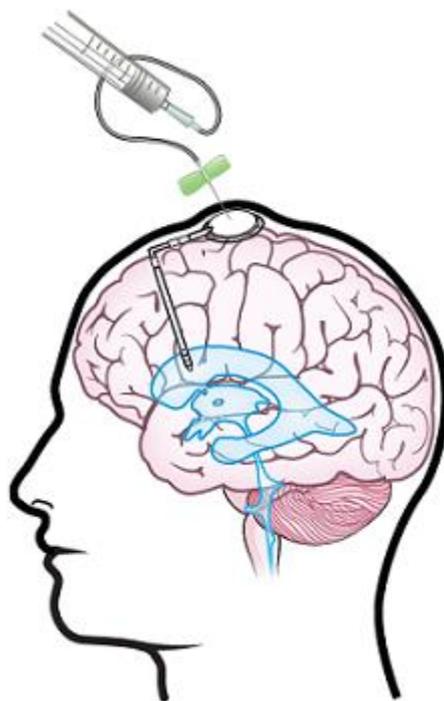


Figure 16 Réservoir d'Ommaya

b) Utilisation de cellules NK en association

Essai de phase I associant NK autologues et IFN β

En 2004 Ishikawa et al, ont évalué l'effet d'administrations répétées de cellules NK autologues associées à de l'IFN β chez 9 patients atteints de gliomes de haut grade dont 3 glioblastomes. L'IFN β favoriserait l'effet cytotoxique des cellules NK. Les cellules NK étaient obtenues à partir de CMN après leucaphérèse du patient puis expandues *ex vivo* dans un milieu sélectif en présence d'IL2 et de cellules nourricières. Elles furent injectées de manière répétée (3x/semaines) par voies intraveineuse ou intratumorale (via un réservoir d'Ommaya) associées à une faible quantité d'IL2 (maximum 100U/kg). Une fois par semaine, une injection d'IFN β (6.10^6 UI) était réalisée en intraveineuse. Une stabilisation/diminution de la masse tumorale fut observée chez 2 des 3 patients atteints de GBM durant la durée des injections. Aucune toxicité neurologique sévère n'a été signalée chez l'ensemble des patients. (Ishikawa et al., 2004)

Evaluation de l'association des cellules NK à la trichostatine A

En 2013, Horing et al ont testé l'effet *in vitro* puis *in vivo* de la trichostatine A, un inhibiteur de l'histone désacétylase, contre des cellules de GBM. Cette molécule naturelle initialement développée pour ses propriétés antibiotique et antifongique a révélé une puissante action inhibitrice contre les histones désacétylases. Ces enzymes ont pour rôle d'augmenter l'affinité entre l'ADN et les histones afin d'empêcher le relâchement de la fibre chromatinienne nécessaire à la transcription. Elles agissent ainsi comme des corégulateurs négatifs et leur inhibition entraînent de ce fait des altérations de la fonction, du recyclage ou de la demi-vie des protéines impliquées dans le cycle cellulaire.

In vitro, cette molécule semble favoriser l'apoptose des cellules cancéreuses induite par les cellules NK. L'étude *in vivo* fut réalisée chez des souris *nude* porteuses de tumeurs ectopiques de GBM. Un groupe témoin comprenait des souris ayant reçu un traitement supplémentaire afin de créer une déplétion en cellules NK (anticorps anti asialo-GM1). Une diminution de la taille des tumeurs fut observée chez les souris non immunodéprimées en cellules NK et recevant de la trichostatine A par rapport au groupe témoin. Ces observations suggèrent que la trichostatine A pourrait avoir un effet potentialisateur de la cytotoxicité des cellules NK vis à vis des tumeurs de GBM. (Höring et al., 2013)

Evaluation de l'association de NK au bortézomib

En 2019, Luna et al suggèrent que l'utilisation d'un inhibiteur du protéasome, le bortézomib, augmenterait le ciblage des cellules NK contre des cellules souches cancéreuses (CSC).

Dans cette étude, plusieurs lignées tumorales ont été utilisées dont la lignée de GBM U87. Le bortézomib utilisé *in vitro* à des concentrations inférieures à des concentrations cytotoxiques (20nM contre 40 nM) aurait tendance à enrichir les tumeurs en cellules exprimant positivement l'ALDH (ALDH^{bright} considérées comme des CSC). Cependant, le bortézomib induirait également une augmentation de l'expression des ligands de stress MICA, MICB, ULBP1 et des récepteurs de mort FAS et DR5, ce qui favoriserait l'activation des cellules NK. Lors de la réalisation de tests de

cytotoxicité *in vitro*, les cellules tumorales ALDH^{bright} se sont montrées beaucoup plus sensibles aux cellules NK après sensibilisation par le bortézomib qu'avec des cellules NK ou du bortézomib utilisé seul. L'effet potentialisateur du bortézomib a ensuite été testé *in vivo* chez des souris greffées avec des cellules U87 ectopiques. Comme observé *in vitro*, le bortézomib utilisé seul a entraîné une augmentation significative du pourcentage de cellules ALDH^{bright}. En revanche, la combinaison du bortézomib et de cellules NK (10⁶) administrée par voie intratumorale (à 24h d'intervalle) a entraîné une diminution significative de la fréquence et du nombre total de cellules ALDH^{bright}. L'effet sur la survie a ensuite été évalué chez des souris greffées en orthotopique. Une survie sans progression de 25 jours fut observée chez les animaux ayant reçu le traitement combiné (contre 6 jours pour ceux n'ayant reçu que des cellules NK ou du bortézomib).

L'ensemble de ces résultats suggèrent que ce type de thérapie combinée pourrait limiter la croissance tumorale en détruisant les CSC ALDH^{bright} responsables de la rechute des cancers traités par les approches classiques.

c) Utilisation des cellules NK allogéniques génétiquement modifiées

Les études les plus récentes concernent l'utilisation de cellules NK génétiquement modifiées dans le traitement des glioblastomes. En plus de l'avantage lié à l'allogénicité des cellules NK, à savoir la levée de l'inhibition induite par les molécules du CMH de classe 1 de la tumeur, les modifications génétiques permettraient de renforcer leur pouvoir cytotoxique en ciblant un antigène spécifique.

Evaluation de l'effet de NK exprimant un récepteur dominant négatif pour le TGFβ

En 2017, Yvon et al montre un effet encourageant de l'utilisation de cellules NK transduites par un récepteur dominant négatif au TGFβ (DNRII). L'expression d'un récepteur dominant négatif TGFβ à la surface des cellules permet de bloquer l'effet du TGFβ par compétition avec les autres récepteurs et ainsi diminuer son effet suppresseur. Une particularité de l'étude est l'utilisation des cellules NK issues de sang de cordon. L'avantage majeur de cette source selon l'auteur serait lié à la disponibilité et la flexibilité de choix du donneur de sang selon le typage HLA déjà préétabli par les banques de sang de cordon. Testées uniquement *in vitro* envers différentes lignées tumorales (dont la lignée U87), les auteurs rapportent qu'une fois modifiées, les cellules NK ne sont plus sensibles à l'effet suppresseur du TGFβ et conservent leur pouvoir cytotoxique. En effet, après 4 heures d'incubation à différents ratios cellules Effectrices/Cibles (E/C) (NK/U87), une moyenne de 50% de lyse spécifique a été observée lors de l'utilisation de NK modifiées en présence ou non de TGFβ, alors qu'avec les cellules NK non modifiées le pourcentage de lyse spécifique était significativement diminué en présence de TGFβ (15% contre 55%). Ces résultats *in vitro* offre la perspective prometteuse d'une utilisation future de NK-DNRII *in vivo*, plus résistantes au microenvironnement immunosuppresseur tumoral. (Yvon et al., 2017)

Evaluation de l'effet de NK EGFRvIII-CAR

EGF et récepteurs EGFR

L'EGF (Epidermal Growth Factor ou facteur de croissance épidermique) fait partie des facteurs de croissance les plus impliqués dans le développement et la croissance des tissus et organes du corps humain. Son action est médiée par une famille de récepteurs membranaires appelée ErbB ou HER (Human EGF Receptor related) pouvant être divisée en 4 sous familles : les récepteurs EGFR ou HER1 ou ErbB1, HER2 ou ErbB2, HER3 ou ErbB3 et les récepteur HER4 ou ErbB4. Ce sont des récepteurs à activité tyrosine kinase ayant un rôle important dans la croissance et la différenciation cellulaire. A l'état basal, ils sont sous forme de monomère inactif. La fixation de ligands aux domaines extracellulaires va entraîner leur dimérisation et induire un changement de conformation dévoilant l'activité tyrosine kinase qui va mener à l'activation des voies de signalisation intracellulaire. (Figure 17) De par leurs propriétés ils sont considérés comme des proto-oncogènes et sont fréquemment impliqués dans la tumorigénèse. Leur surexpression ou des mutations induisant une activation spontanée de ces récepteurs sont fréquemment retrouvées chez les cellules des tumeurs agressives. Cela leur confère un fort potentiel prolifératif et invasif, souvent associé à une résistance aux traitements conventionnels. Ces récepteurs sont beaucoup étudiés en tant que cible thérapeutique. (Hubert, 2006)

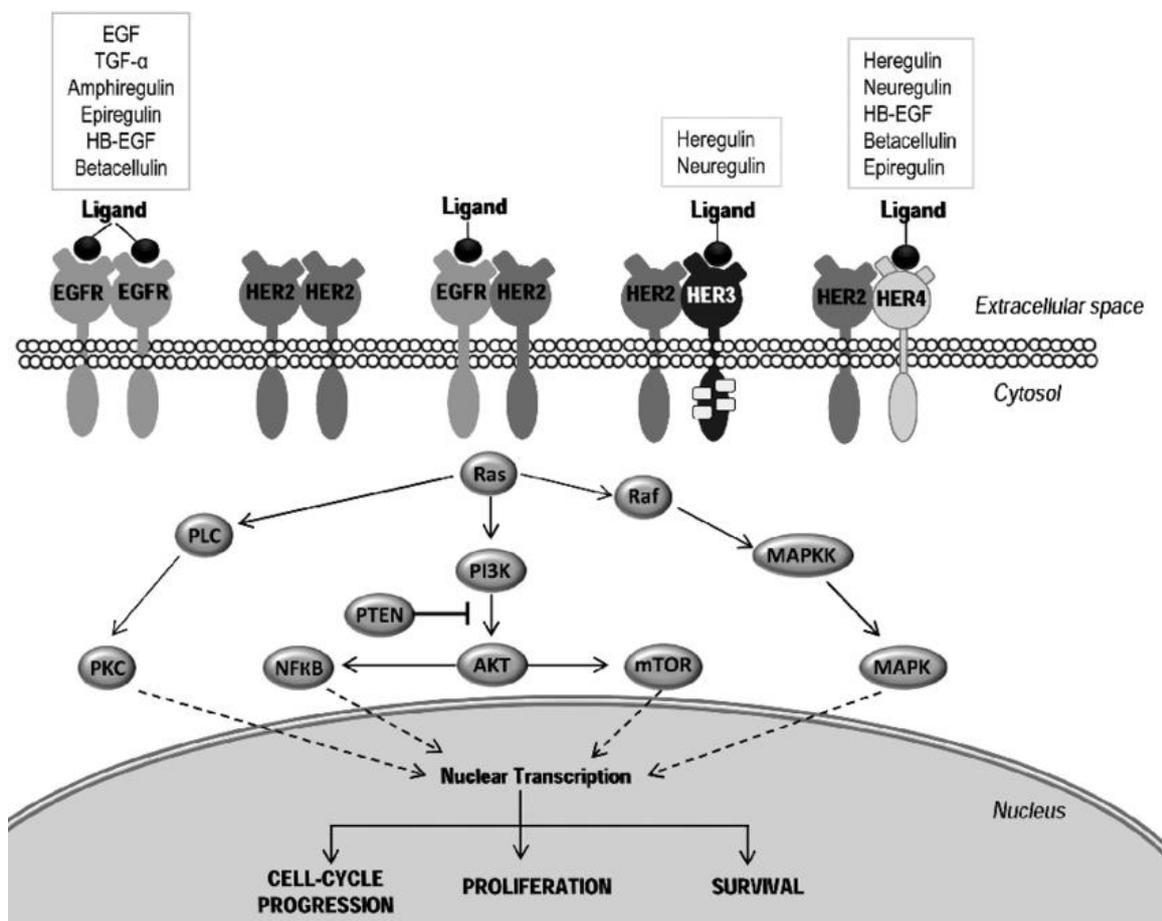


Figure 17 : Récepteurs ErbB, ligands associés et signalisation intracellulaire (Richard et al., 2016)

1^{ère} étude de Muller et al

L'expression des récepteurs EGFR est très fréquemment augmentée sur les cellules tumorales alors que dans les tissus cérébraux sains, elle est faible voire indétectable. L'EGFR est fortement exprimé dans 50% des glioblastomes (Pang et al., 2017) L'EGFRvIII est un mutant oncogénique de l'EGFR ayant la particularité de s'activer constitutivement en l'absence d'EGF. Il est retrouvé chez 30 à 40% des gliomes malins et leur confèrent un potentiel prolifératif et invasif accru.

Le CXCR4 est un récepteur de la chimiokine CXCL12 (ou SDF-1 α). Il est retrouvé sur les précurseurs de cellules NK dans la moelle osseuse mais son expression est progressivement dérégulée au cours de la maturation des NK. Ce couple chimiokine/récepteur est impliqué dans la mobilité des cellules par chimiotactisme. Il est décrit que le CXCL12 (SDF-1 α) est souvent exprimé et sécrété par les cellules de glioblastomes, et de ce fait impliqué dans la prolifération et la migration des cellules tumorales de manière autocrine. De plus son niveau d'expression est corrélé à une diminution de la survie dans les gliomes de bas grade.

Muller et al se sont ainsi intéressés à l'effet que pourrait avoir des cellules NK génétiquement modifiées portant un anticorps ciblant spécifiquement le récepteur de croissance mutant EGFRvIII. Ces cellules NK pourrait en théorie détruire spécifiquement les cellules tumorales exprimant ce récepteur. Ils se sont également intéressés à l'effet d'une surexpression du CXCR4 par les cellules NK, ce qui favoriserait en théorie leur attraction jusqu'aux cellules tumorales exprimant le CXCL12.

Pour se faire ils ont fabriqué des cellules NK EGFRvIII-CAR surexprimant le CXCR4 et ont testé leur pouvoir cytotoxique *in vivo* chez des souris. Les cellules NK utilisées provenaient de la lignée YTS. Ces NK modifiées ont été obtenues après transduction du gène codant pour le récepteur antigénique chimérique (CAR) à l'EGFRvIII et du gène codant pour le récepteur CXCR4. Les récepteurs CAR ont été obtenus par fusion du récepteur anti EGFRvIII (MR1.1) et domaine d'activation intracellulaire DAP12.

L'utilisation de ces cellules NK EGFRvIII CAR surexprimant le CXCR4 aurait ainsi pour avantage de guider les NK par « homing » jusqu'aux cellules tumorales exprimant le SDF-1 α , puis de les détruire après activation des cellules NK via la reconnaissance du récepteur EGFRvIII tumoral par le CAR. Après avoir validé cette hypothèse *in vitro*, l'efficacité de ces cellules NK modifiées a été testée sur des souris greffées en avec des cellules de la lignée U87 modifiées pour surexprimer l'EGFRvIII et le SDF-1 α ou non (U87-MG^{EGFRvIII/SDF1a} et U87-MG^{EGFRvIII} respectivement). Après obtention de tumeurs de taille homogène (10mm²), 4.10⁶ cellules NK modifiées ont été injectées dans la veine caudale chez les différents groupes de souris en fonction de l'expérience (1 groupe des cellules NK exprimant l'EGFRvIII CAR fonctionnel seul (YTS^{MR1.1-DAP12}), 1 groupe avec des NK exprimant un EGFRvIII CAR défectif (YTS^{MR1.1-DAP12mut}), 1 groupe avec NK exprimant le CAR et surexprimant CXCR4 (YTS^{MR1.1-DAP12/CXCR4}), 1 groupe contrôle non traité). L'injection de cellules NK a été répétée toutes les 48 heures pendant 40 jours.

Dans la première expérience réalisée sur des souris porteuses de tumeurs U87-MG^{EGFRvIII}, une diminution significative de la taille des tumeurs fut observée dans le groupe de souris traitées par YTS^{MR1.1-DAP12} par rapport au groupe traité par YTS^{MR1.1-DAP12mut} et le groupe contrôle. De plus une

augmentation de la survie au-delà des 40 jours a été décrite uniquement dans le groupe traité par YTS^{MR1.1-DAP12} (25% des souris). Ces résultats montrent ainsi la capacité des cellules NK exprimant l'EGFRvIII CAR à détruire les cellules tumorales exprimant le récepteur mutant, alors que ces dernières semblent insensibles à l'action des NK exprimant le récepteur CAR déficient. Dans la deuxième expérience réalisée sur des souris porteuses de tumeurs U87-MG^{EGFRvIII/SDF1a}, 3 souris (sur 20) traitées par YTS^{MR1.1-DAP12/CXCR4} ont montré une régression totale de la tumeur et 20% des souris ont survécu au-delà de 60 jours contre 10% dans le groupe YTS^{MR1.1-DAP12} (et aucune dans les autres groupes). L'expression du CXCR4 par les cellules NK semble donc être un avantage à la destruction des tumeurs exprimant le SDF-1 α .

Ces résultats offrent une nouvelle approche très encourageante concernant l'utilisation de NK-CAR ciblant un antigène tumoral donné et surexprimant des récepteurs impliqués dans le chimiotactisme cellulaire. (Müller et al. 2015)

2^{ème} étude de Murakami et al

En 2018, Murakami et al confirme l'intérêt d'un NK CAR ciblant l'EGFRvIII en utilisant cette fois une autre lignée continue de cellules NK : la lignée KHYG. La cytotoxicité de leur modèle de cellules EGFRvIII CAR KHYG a été évaluée *in vitro* envers des cellules U87 exprimant ou non l'EGFRvIII. Au ratio cellules Effectrices/Cible (E/C) 5:1, les cellules EGFRvIII CAR KHYG ont été capables de détruire significativement plus d'U87-MG^{EGFRvIII} (lignée U87 modifiée exprimant l'EGFRvIII) que de cellules U87-MG (lignée non modifiées n'exprimant pas l'EGFRvIII) (pourcentages de cytolysse respectifs de 90% et 45%). Les cellules KHYG sauvages ont montré des pourcentages de cytolysse significativement similaire envers les lignées U87-MG et U87-MG^{EGFRvIII} (respectivement 50 et 55%). Cette étude confirme la cytotoxicité spécifique des l'EGFRvIII CAR KHYG envers des cibles EGFRvIII positives et montre la faisabilité de l'utilisation de la lignée KHYG pour la fabrication de NK CAR. (Murakami et al., 2018)

Evaluation de l'effet de NK EGFR-CAR ciblant l'EGFR sauvage et l'EGFRvIII

1^{ère} étude de Han et al

En 2015, Han et al ont étudié l'effet de cellules NK EGFR-CAR ciblant à la fois les récepteurs EGFR sauvages (wtEGFR) et les EGFR mutants (EGFRvIII). Cela permettrait de cibler un plus grand nombre de cellules de glioblastomes par rapport à l'étude de Muller et al dans laquelle les NK modifiées ne ciblaient que les cellules tumorales exprimant l'EGFR mutants (seulement 30 à 40% des tumeurs expriment un l'EGFRvIII).

Trois types de cellules NK ont été comparées : la lignée continue NK 92, la lignée continue NKL et des cellules NK issues du sang périphérique. Une étude préliminaire *in vitro* a d'abord été réalisée sur 10 lignées de GBM afin de connaître leur niveau d'expression en EGFR. Cela a permis de montrer que 9 exprimaient l'EGFR : 2 l'EGFR sauvage et 7 l'EGFRvIII.

In vitro, les 3 lignées de cellules NK CAR ont montré qu'elles étaient capables de produire plus d'IFN γ en présence des lignées de GBM par rapport à des cellules NK non modifiées. La production était corrélée à l'expression de l'EGFR par les cellules tumorales.

Pour l'étude *In vivo*, des souris ont été xenogreffées en orthotopique soit avec une tumeur exprimant l'EGFR sauvage (wtEGFR) soit une tumeur exprimant l'EGFRvIII. La lignée NK92 (soit sauvage, soit modifiée) a été utilisée pour l'expérience et injectée en une seule fois (2×10^6 cellules non irradiées) en intratumoral 7 jours après la greffe de la tumeur. Une diminution significative de la masse tumorale a été observée chez les souris ayant reçu des cellules NK92 sauvages (quel que soit le type de tumeur), et une régression totale a été observée chez certaines souris ayant reçues des cellules NK92 EGFR CAR. La survie post traitement a également été améliorée chez les souris ayant reçu les cellules NK92 EGFR CAR. Les souris greffées avec une tumeur wtEGFR ont montré une survie moyenne de 200j, 160j et 140j respectivement après avoir reçu un traitement par cellules NK92 EGFR-CAR, cellules NK92 sauvages, ou aucun traitement (groupe témoin). Les souris greffées avec la tumeur EGFRvIII ont quant à elles présenté une survie moyenne respective de 40j, 25j et 20j pour les 3 groupes.

Après injection de NK EGFR CAR en intratumoral chez des souris saines, aucune toxicité n'a été observée. L'analyse de la distribution dans divers organes de ces NK modifiées 3 jours après injection a montré que les NK restaient localisées à l'intérieur de la tumeur.

L'utilisation de NK CAR ciblant spécifiquement le récepteur muté semble améliorer l'efficacité du traitement, comme montré dans les deux études précédentes. Cependant, quel que soit le traitement, l'étude réalisée *in vivo* montre un fort désavantage induit par la mutation du récepteur EGFR sur la survie des animaux.

2^{ème} étude de Genbler et al

La même année, Genbler *et al* ont publié une étude portant également sur l'utilisation de cellules NK92 EGFR CAR. Dans cette étude 3 types de cellules NK EGFR CAR ont été comparées *in vitro* et *in vivo* : les NK92/R1 ciblant l'EGFR sauvage seul, les NK92/MR1-1 ciblant l'EGFRvIII seul et les NK92/225 ciblant les 2 types d'EGFR.

Les résultats observés *in vitro* confirment ceux de l'étude de Han *et al*. L'ensemble des cellules NK92 (modifiées ou non) ont été capables de reconnaître les cellules de GBM, et la cytotoxicité des NK92 modifiées était plus spécifique envers les tumeurs exprimant l'EGFR ciblé par le CAR.

Dans l'étude *in vivo*, les souris xenogreffées en orthotopique ont cette fois-ci été divisées en 4 groupes : un groupe recevant des cellules tumorales exprimant l'EGFR seul, un l'EGFRvIII seul, un des cellules tumorales exprimant l'EGFR sauvage et l'EGFRvIII et un recevant les 2 types de tumeurs (ratio du nombre de cellules exprimant l'EGFR sauvage ou mutant 1:1). L'injection des différents types de NK92 ($2 \cdot 10^6$ /injection) a été réalisée 1 fois par semaine en intratumoral pendant 8 à 12 semaines. Alors que les résultats vis-à-vis de la progression de la taille de la tumeur des 3 premiers groupes étaient en accord avec les résultats présentés *in vitro*, le 4^{ème} groupe correspondant aux souris ayant reçu un mixte de cellules tumorales a révélé des résultats

intéressants. Les souris de ce groupe ayant reçu les NK92/225 doublements spécifiques et les NK92/MR1.1 spécifiques de l'EGFRvIII présentaient les plus longues médianes de survie (respectivement 150j et 110j) par rapport aux souris traitées avec des cellules NK92/R1 et NK92 sauvages (médiane de survie respective de 90 et 80 jours). Afin de mieux comprendre ces résultats, une étude *in vivo* supplémentaire a été réalisée chez des souris recevant une xéno greffe de cellules de GBM mixtes. Elle a permis de montrer que les cellules tumorales portant le phénotype EGFRvIII avaient tendance à supplanter celles exprimant l'EGFR sauvage, rendant de ce fait les tumeurs résistantes au NK CAR ciblant l'EGFR seul, alors que les NK CAR ciblant les 2 types de récepteurs EGFR restaient vraiment efficaces. (Genßler et al., 2016)

Evaluation de l'effet de NK ErbB2-CAR

Récepteur ErbB2

ErbB2 (ou HER2) est un récepteur à la famille des récepteurs ErbB. Une de ses particularités est son absence de ligand connu. Il a cependant la capacité de se dimériser avec l'ensemble des récepteurs de la famille des ErbB. Sa surexpression dans certain cancer va également entraîner la formation d'homodimères actifs en l'absence de ligand. Une expression élevée d'ErbB2 est souvent retrouvée dans les tumeurs agressives (notamment le glioblastome) et corrélée à un mauvais pronostic. (Hubert, 2006) (Figure 17)

1^{ère} étude de Zhang et al

En 2016, Zhang *et al* ont étudié l'effet des cellules NK92/5.28.z qui sont des cellules NK92 modifiées portant un récepteur CAR ciblant l'ErbB2.

Sur 56 tumeurs primaires de GBM étudiées, 40% exprimaient de manière moyenne à forte l'ErbB2 (en immunohistochimie selon le score IRS). L'étude de la cytotoxicité de ces cellules NK92/5.28.z envers des cellules de GBM *in vitro*, a démontré sans surprise la corrélation entre le pourcentage de lyse spécifique des cellules de GBM et leur niveau d'expression en ErbB2.

L'efficacité des cellules NK-92/5.28.z NK a ensuite été évaluée *in vivo*, dans 2 modèles de souris. Des souris immunodéprimées (NSG) ont été greffées par des tumeurs de GBM ErbB2 xénogénique (lignée LN-319 humaine), puis des souris immunocompétentes ont été greffées en syngénique (lignée GL261/ErbB2 murine). Les 2 types de modèles ont été greffés en sous-cutané ou en orthotopique. Sept jours après l'inoculation des cellules tumorales, les cellules NK (NK-92/5.28.z ou NK 92 en quantité variant de $2 \cdot 10^6$ à $2 \cdot 10^7$ en fonction du groupe) ont été injectées en intratumoral ou par voie intraveineuse. Le traitement a été répété 1 fois par semaine pendant 3 à 11 semaines.

Chez les souris NSG greffées en orthotopique (greffe xénogénique), une augmentation significative de la survie fut observée chez les souris traitées par NK92 modifiées par rapport à celles traitées par NK92 sauvages (médiane de survie de 200j contre 73j).

Chez les souris immunocompétentes greffées en sous-cutané (greffe syngénique), 4 souris sur 5 traitées par NK modifiées et 1 sur 5 traitées par NK-92 montrèrent une régression totale de la

tumeur en moins de 56 jours. Chez les souris greffées en orthotopique, seules certaines souris traitées par NK modifiées (5 sur 8) montrèrent une régression totale de la tumeur.

Pour évaluer l'immunité anti-tumorale endogène induite par le traitement, les souris qui avaient éliminées totalement la tumeur ont reçu une seconde injection (à J100 pour les greffes sous cutanées ou J126 pour les greffes orthotopiques) de cellules tumorales. Aucune souris ayant reçu le premier traitement n'a développé de tumeur contrairement aux souris naïves.

Aucun effet toxique majeur secondaire au traitement n'a été rapporté.

Autre fait intéressant, aucune sélection de cellules ErbB2 négative ne fut observée dans les tissus tumoraux après des traitements répétés par NK ErbB2 CAR. Enfin, l'irradiation des cellules NK92 modifiées (10 Gy), indispensable pour une utilisation clinique, n'a pas montré d'effets sur le potentiel cytotoxique des cellules NK.

Cette première étude sur l'utilisation de NK92/5.28.z ciblant spécifiquement l'ErbB2 en immunothérapie adoptive envers les tumeurs de glioblastome montre des résultats encourageants pour de futures études cliniques.

2^{ème} étude sur la fabrication de NK ErbB2-CAR de grade clinique

En 2018, Nowakowska et al se sont intéressés à la fabrication de cellules NK92/5.28.z de grade clinique selon les Bonnes Pratiques de Fabrication (BPF).

Cela permettrait la fabrication de cellules de manière standardisée, reproductible et sûre en vue d'une utilisation future dans des essais cliniques de phase I/II. Ils ont étudié la capacité d'expansion de ces cellules en grande quantité (jusqu'à 10^{10} cellules nécessaires pour une utilisation clinique) selon les BPF ainsi que l'effet de l'irradiation sur leur survie et leur capacité à détruire les cellules cibles.

Des cellules NK92 issues d'une banque agréée par la FDA (Food and Drug Administration) ont été transduites avec un vecteur lentiviral codant pour une construction CAR comprenant un fragment d'anticorps (scFv) spécifique à l'ErbB2 associée au CD28 (molécule de costimulation) et au CD3- ζ (5.28.z) (domaine de stimulation). Après transduction, les cellules NK92 modifiées ont été purifiées puis remises en culture afin d'obtenir un nombre suffisant de cellules pour une utilisation clinique. Après optimisation de la méthode, le milieu X-Vivo 10 rTF (Lonza) de grade clinique supplémenté par de l'IL2 (500 U/mL) et du plasma humain thermoinactivé (5%) a été choisi. Ce milieu a la particularité d'être riche en albumine humaine ce qui en théorie permettrait d'éviter l'utilisation de plasma supplémentaire (dérivé d'un donneur). En outre il contient de la transferrine sous forme recombinante qui est un facteur favorisant la croissance cellulaire par transfert de fer aux cellules. Cependant les NK-92/5.28.z montrèrent une croissance beaucoup plus lente en milieu sans plasma par rapport à un milieu supplémenté en plasma humain thermoinactivé (temps de doublement des cellules respectif de 47h contre 29h).

Après expansion, les cellules ont été irradiées par rayons γ à dose croissante toutes les 24h pendant 5 jours. La prolifération après irradiation, la libération de cytokines ainsi que la capacité à détruire des cellules de GBM ont ensuite été analysées. La dose de 10Gy a finalement été retenue car elle assurerait un bon compromis entre la sécurité après injection chez le patient (absence de

prolifération de NK92/5.28v après irradiation), une bonne viabilité après 24h (>90%) et la conservation d'une toxicité spécifique envers des cibles ErbB2 positives (>50%).

Dans l'optique de créer une banque de cellules utilisables sans délai, les auteurs ont étudié la stabilité des cellules NK92/5.28v maintenues en culture et ont montré qu'elles étaient phénotypiquement stables pendant 3 mois.

Enfin le potentiel cytotoxique des cellules NK92/5.28v de grade clinique envers des cellules ErbB2 positives (lignée de cellules tumorales mammaires MDA-MB-453) versus des cellules ErbB2 négatives (lignée de cellules leucémiques K562) a été évalué *in vitro*. Une cytotoxicité spécifique envers les cellules ErbB2 positives a été observée (pourcentage de cytotoxicité > 94% contre 20 à 45% envers les cellules ErbB2 négatives (en fonction de la concentration en IL2)).

Cette étude montre ainsi la faisabilité de produire des NK92/5.28.z de grade clinique, conservant les principales caractéristiques de la lignée d'origine (phénotype, temps de doublement, mêmes conditions optimales de culture), tout en présentant une cytotoxicité sélective contre les cibles exprimant l'ErbB2 normalement résistantes à la cytotoxicité des cellules NK.(Nowakowska et al., 2018) Une évaluation future de l'efficacité de ces cellules *in vivo* permettrait de compléter cette étude.

Evaluation de l'effet de cellules NK Robo-CAR

En 2018, Qu *et al* ont publié une étude sur les NK92 Robo-CAR, des cellules NK92 modifiées capables de reconnaître les cellules portant le récepteur Robo1 à leur surface. Les récepteurs Robo (Roundabout guidance Receptor) et leurs ligands Slits, ont initialement été identifiés comme facteurs clé du guidage axonal et dans la régulation des points de ramification dans le système nerveux. Cependant des recherches récentes ont montré qu'ils étaient également impliqués dans la tumorigenèse en favorisant la prolifération et la motilité cellulaire en attirant ou repoussant la migration des cellules cancéreuses. L'expression des récepteurs Robo est souvent dérégulée dans les tumeurs invasives comme le GBM.

L'évaluation du potentiel cytotoxique *in vitro* de ces NK-92 Robo-CAR envers une lignée de GBM (la lignée U87) exprimant le Robo1 a montré un pourcentage de lyse spécifique supérieur lors de l'utilisation des NK92 modifiées par rapport à des NK92 simples, en particulier lorsque les cellules seraient stimulées par de l'IL15.(Qu and Bi, 2018)

Conclusion sur l'utilisation NK modifiées

Ces quelques études sur l'utilisation de NK modifiées dans le traitement du GBM montrent des résultats encourageants. Cependant des analyses plus poussées sur d'autres lignées de GBM ou des tumeurs de patients doivent être réalisées afin de mieux évaluer l'impact du choix de la cible antigénique sur des tumeurs plus hétérogène et sur les tissus sains environnants.

d) Utilisation d'exosomes de cellules NK

Une autre approche récente est basée sur l'utilisation **d'exosomes** de cellules NK comme agent antitumoral (NK-Exo).

Les exosomes sont des nanovésicules naturellement libérées par diverses cellules de l'organisme et ayant pour but de délivrer des molécules aux cellules cibles. Les exosomes de cellules NK contiendraient des molécules tueuses (comme le Fas ligand (FasL), du TNF α et la perforine) et seraient capables d'inhiber la croissance de tumeurs (Zhu et al., 2017). Leur efficacité a été testée envers plusieurs cancers incurables dont le mélanome, la leucémie aigüe ou le neuroblastome. De plus, plusieurs auteurs suggèrent que ces nanovésicules, du fait de leur petite taille, seraient capables de traverser la barrière hémato encéphalique. (Zhuang et al., 2011)

Les propriétés conférées par leur taille nanométrique et leur origine cellulaire, en font de bons candidats pour une utilisation comme transporteurs de molécules endogènes ou exogènes antitumorales.

Exosomes de cellules NK obtenues après culture

Dans une première étude publiée en 2018, Zhu et al ont testé l'effet anti-tumoral d'exosomes dérivés de cellules NK envers le glioblastome (lignée U87) *in vitro* et *in vivo* et ont déterminé leur capacité à cibler la tumeur par imagerie de fluorescence.

Ils ont utilisé des exosomes de cellules NK (NK-exo) obtenus après ultracentrifugation puis purification en gradient de densité et les ont caractérisé par microscopie électronique à transmission. Les NK exo exprimaient des marqueurs spécifiques tels que Alix ou CD63 et contenaient du TNF α et du granzyme B. A certaines concentrations et en 24h ils étaient susceptibles d'induire l'apoptose ou la nécrose de plus de 80% des U87 traitées. Ces résultats ont été confirmés *in vivo* par injections intraveineuses répétées de NK-Exo chez des souris porteuses de xénogreffe de GBM en sous cutané puis en orthotopique. En 24h, une accumulation sélective des NK-Exo a été observée dans la tumeur. Une diminution par 2 de la taille de la tumeur a été observée chez les souris traitées par rapport aux souris témoins, 14 jours après l'injection. Cette effet était encore plus marqué et durable lorsqu'un pré-traitement par sulfate de dextran était réalisé 2h avant l'injection de NK-exo, celui-ci ayant pour rôle d'empêcher l'accumulation des NK-exo dans le foie et la rate.

Enfin aucun effet secondaire et aucune lésion visible dans les organes (foie, poumons, rate et cœur) n'ont été observés chez les souris traitées avec NK-Exo.(Zhu et al., 2018a)

Exosomes de cellules NK primées par de l'IL15

Quelques mois plus tard, Zhu et al ont évalué l'impact de l'IL-15 sur la production d'exosomes par la lignée NK92MI. Pour cela les vésicules ont été isolées comme dans l'étude précédente à partir de milieu de culture contenant de l'IL15. *In vitro*, ces nouvelles vésicules primées ont montré un potentiel cytotoxique jusqu'à 4 fois supérieur par rapport aux vésicules non primées selon la concentration utilisée. Les quantités de FasL, granzyme et perforine sur la membrane et dans le cytoplasme ont été mesurées par Western Blot. Les résultats ont montré que les vésicules primées étaient plus riches en FasL et en granzyme/perforine, ce qui pourrait expliquer l'amélioration de la

cytotoxicité envers plusieurs lignées tumorales testées (lignées de cancer du sein, de la thyroïde et de glioblastome). *In vivo*, les souris porteuses de xénogreffes de glioblastome ayant reçu des injections des vésicules primées ont montré une croissance tumorale 1,5 fois inférieure à celles ayant reçu des vésicules non primées et 3 fois inférieures à celle n'ayant reçu aucun traitement.

Cette étude confirme le rôle essentiel de l'IL15 dans la potentialisation du pouvoir cytotoxique des cellules NK.(Zhu et al., 2019)

Exosomes obtenus par extrusion de cellules NK

Une des limites de l'approche de traitement par exosomes est la faible quantité libérée par les cellules et la difficulté à les purifier. Zhu *et al* ont proposé dans une seconde étude une autre technique afin d'obtenir un plus grand nombre d'exosomes. Les cellules NK (lignée NK92MI) ont été directement extrudées à travers une série de membranes de polycarbonate contenant des pores de tailles décroissantes afin d'obtenir des nanovésicules de taille standardisée appelées exosomes mimétiques de NK (NK-EM). Ces nanovésicules d'environ 100nm combinent ainsi les caractéristiques des exosomes et des cellules. De plus leur rendement de fabrication serait 50 fois supérieur aux NK-Exo. L'effet cytotoxique de ces vésicules a ensuite été testé *in vitro* et *in vivo* envers différents types de tumeurs dont le GBM. L'évaluation de la cytotoxicité *in vitro* a été réalisée envers la lignée de GBM D54 et comparée à celle induite par des NK-Exo. A des temps et concentrations équivalents, les NK-EM se sont montrées significativement plus cytotoxiques que les NK-Exo. Après lyse des 2 types de nanovésicules et analyse du lysat par Western blot, les NK-EM se sont avérées plus riches en perforine/granzyme, FasL et TRAIL.

L'évaluation de l'effet anti-tumoral *in vivo* a été réalisée chez des souris greffées en sous cutané par des cellules GBM D54. Dix jours après l'injection de cellules tumorales, les animaux ont reçu 3 doses de NK-EM par voie intraveineuse ou intratumorale à 3 jours d'intervalle. Au bout de 10 jours les souris ont été sacrifiées et la taille de la tumeur mesurée. A la fin de l'expérience les souris traitées ont montré une nette régression de la taille de la tumeur par rapport au groupe témoin n'ayant reçu aucun traitement. (volume et poids de la tumeur respectivement pour les souris traitées par voie IT, IV et le groupe témoin : 46 mm³ pour 105 mg ; 189mm³ pour 220mg et 489mm³ pour 621mg). L'injection par voie intratumoral semble également plus efficace.

Les résultats suggèrent que les NK-EM sont susceptibles d'exercer un effet cytotoxique plus important sur les cellules cancéreuses par rapport aux NK-Exo traditionnels.(Zhu et al., 2018b)

6. Thérapie par cellules NK dans le traitement du médulloblastome

Il a été montré que les cellules de médulloblastome avaient tendance à sous exprimer ou exprimer de manière aberrante (modifiée) les molécules du CMH de classe I afin d'échapper aux lymphocytes T du soi. (Smith et al., 2009) De plus, en fonction des lignées, elles expriment à leur surface de ligands pouvant activer les cellules NK (comme la Nectine 2, le PVR, le MICA, l'ULBP) (Castriconi et al., 2007), ainsi que de récepteurs de mort (comme FAS et TRAILR). (Bodey et al., 1999) Par ces différents mécanismes, elles seraient donc des cibles potentielles à la cytotoxicité des cellules NK.

a) Utilisation de LAK autologues et d'IL2 dans des essais de phase 1

A la fin des années 80, plusieurs essais de phase 1 ont évalué l'effet d'une immunothérapie cellulaire dans le traitement du médulloblastome. Les cellules effectrices oncolytiques utilisées étaient des LAK.

En 1988, Okamoto, Shimizu *et al* ont rapporté l'effet de l'utilisation de LAK chez 8 patients atteints de médulloblastome avec une dissémination au niveau du Liquide CéphaloRachidien (LCR). Après avoir reçu une thérapie standard, les patients ont bénéficié d'une injection intrathécale de LAK allogéniques (maximum 15.10^9). Trois patients montrèrent une disparition des cellules tumorales intrarachidiennes et une rémission complète a été obtenue chez 1 patient. Aucun effet toxique secondaire aux injection de LAK n'a été rapporté. (Okamoto et al., 1988)(Shimizu et al., 1989)

b) Evaluation de l'effet oncolytique de NK allogéniques *in vitro*

Deux études ont ensuite été publiées dans les années 2000, s'intéressant plus spécifiquement à l'intérêt des cellules NK dans le traitement du médulloblastome. Castriconi *et al* et Fernandez *et al*. ont ainsi montré que les cellules NK allogéniques exerçaient un effet cytotoxiques envers différentes lignées de médulloblastome *in vitro* (1603-MED, D283, DAOY). Ils ont étudié cet effet en utilisant des cellules NK stimulées ou non avec de l'IL-15 ou de l'IL2 et associées à des anticorps bloquants soit les récepteurs activateurs des cellules NK (NKG2D, DNAM1 et NCR), soit les ligands activateurs des cellules tumorales (MICA/B et ULBP) soit les molécules CMH de classe 1. Les résultats ont révélés que le blocage des récepteurs ou ligands activateurs par des anticorps diminuait de façon variable l'activité des cellules NK en fonction de la lignée étudiée. Le blocage des molécules CMH de classe 1 a en revanche montré des résultats différents dans les 2 publications : alors que dans l'étude de Fernandez *et al* les anticorps anti CMH de classe 1 augmentent considérablement l'effet cytolytique des cellules NK, dans l'étude de Castriconi *et al* ce blocage semble avoir beaucoup moins d'impact. (**Tableau IV**) (Castriconi et al., 2007) (Fernández et al., 2013)

Tableau IV : Comparaison des études de Castriconi et al et Fernandez et al sur l'effet

Lignée de médulloblastome	Élément mesuré et technique	Durée incubation	Type de cellules NK	n	% de cytolyse en fonction du Ratio E:C en l'absence d'anticorps bloquants (bleu) ou en présence d'anticorps anti CMH de classe I (rouge)			
					0,25:1	1:1	4:1	8:1
<i>Castriconi et al (2007)</i>								
D283	Cytolyse : Test à Chrome 51	4h	En culture avec IL2	1	22 27	44 45	50 50	/
DAOY					20 21	49 56	81 88	/
1603 MED					30 35	50 52	61 62	
<i>Fernandez et al (2013)</i>								
DAOY	Cytolyse : Test à europium TDA	2h	Fraiches stimulées avec IL15	?	/	18 ±5 38 ±5	38 ±10 72 ±10	45 ±10 85 ±10
			Fraiches non stimulées			14 ±5 28 ±5	19 ±8 64 ±10	25 ±8 72 ±10

cytotoxique des cellules NK envers les cellules de médulloblastome

c) Suivi de NK marquées injectées chez des souris porteuses de médulloblastome

Récemment, Kennis *et al* ont publié une étude sur l'effet de cellules NK envers le médulloblastome *in vivo*. En amont, l'effet cytotoxique a été réévalué *in vitro* chez 5 lignées continues de médulloblastome (DAOY, D283, D341, UW228 et UW42) et montré des pourcentages de cytolyse variant de 10 à 60% en fonction de la lignée et des ratio cellules E/C utilisées.

Le but de l'étude était surtout d'évaluer la possibilité de suivre des cellules NK marquées au ¹⁹F par IRM. Pour ce faire, des souris NSG ont reçu une injection de cellules DAOY (10⁵ cellules exprimant la luciférase) au niveau cérébral. Sept jours après l'injection de cellules tumorales, les souris ont bénéficié ou non d'un traitement par cellules NK marquées au ¹⁹F (10⁶ cellules à J7 puis à J14) en intracérébral soit directement dans la tumeur, soit en controlatéral. Cette étude a montré que le marquage par le ¹⁹F n'altérait ni la viabilité ni la cytotoxicité ni la capacité à transiter jusqu'à la tumeur des cellules NK. De plus ce marqueur était traçable par IRM plus de 5 jours après administration. (Kennis et al., 2019)

Tableau V : Tableau récapitulatif des travaux publiés sur l'utilisation des LAK et de cellules NK dans le traitement des tumeurs cérébrales (médulloblastome en bleu, glioblastome en violet)

Années	Evènements/Etudes	Auteurs
1956	Première greffe de cellules souches hématopoïétiques (CSH)	
1975	Découverte des cellules NK par Rolf Kiessling et Ronald Herberman	
1986	Création du registre France Greffe de moelle et démocratisation des greffes de CSH dans le traitement des leucémies	
années 1980	Création des premières cellules CAR T Zelig Eshhar	
1985-1995	Essai Clinique de Phase I sur l'utilisation de LAK autologues dans le traitement du GBM	Jacobs et al, Barba et al, Lillehei et al
1986-1988	Essai Clinique de Phase I sur l'utilisation de LAK allogéniques dans le traitement du médulloblastome	Okamoto, Shimizu et al
2004-2009	Essai Clinique de phase II et III sur l'utilisation de LAK autologues dans le traitement du GBM	Hayes et al, Dillman et al
2004	Essai Clinique de phase I sur l'utilisation de cellules NK autologues associées à de l'IFN γ dans le traitement du GBM	Ishikawa et al
2013	Association de cellules NK à la trichostatine A dans le GBM	Horing et al
2014-2018	Utilisation de cellules NK EGFRvIII-CAR dans le GBM	Muller et al, Han et al, Genbler et al
2017	Utilisation de cellules NK exprimant un récepteur dominant négatif pour le TGF β dans le GBM	Yvon et al
2016-2019	Utilisation de cellules NK ERbB2-CAR dans le GBM	Zhang et al, Nowakowska et al
2018-2019	Utilisation d'exosomes de cellules NK dans le GBM	Zhu et al
2019	Association de cellules NK au bortézomib dans le GBM	Luna et al
2019	Première étude de l'utilisation de cellules NK dans le traitement du médulloblastome chez l'animal	Kennis et al

II. OBJECTIFS

En dépit du développement de traitements agressifs incluant la chirurgie, la radiothérapie, et la chimiothérapie, le pronostic des tumeurs cérébrales restent mauvais. C'est pourquoi il est nécessaire de développer de nouvelles approches thérapeutiques innovantes plus spécifiques parmi lesquels l'immunothérapie prend une place grandissante.

Si plusieurs études ont étudié l'impact de l'utilisation de cellules NK dans le traitement des gliomes, peu se sont intéressées à l'impact de cette approche dans le traitement de la tumeur cérébrale maligne la plus fréquente chez l'enfant : le médulloblastome.

Les moyens thérapeutiques actuels contre ce type de tumeur permettent d'atteindre des taux de survie globale variant de 40 à 90%. Malheureusement certaines formes de médulloblastome restent de pronostic sombre, et les patients qui survivent, souvent jeunes au moment du diagnostic, doivent faire face toute leur vie à des séquelles lourdes principalement liées à la radiothérapie. L'utilisation de ce nouveau type de thérapie plus spécifique semble donc intéressante.

L'objectif de mon travail a été d'évaluer *in vitro*, le **mécanisme cytotoxique** des cellules NK envers différentes lignées de médulloblastome humaines (DAOY, D283, D341). La réponse cytotoxique des cellules NK envers une cible donnée implique **plusieurs étapes** indispensables au bon déroulement du processus telles que : la reconnaissance de la cible par la cellule NK et son activation, la formation d'une synapse immunologique avec la conjugaison entre les deux types de cellules, la libération des granules cytotoxiques par la cellule NK et enfin la mort des cibles sensibles à cette cytotoxicité.

Plusieurs tests *in vitro* ont été réalisés afin d'étudier ces étapes : (Figure 19)

- La **conjugaison** des cellules NK aux cellules de médulloblastome par Cytométrie en Flux
- La **dégranulation** des cellules NK en présence de cellules de médulloblastome par test Elispot Granzyme B
- L'évolution des cellules de médulloblastome vers un **état apoptotique ou nécrotique** en présence de cellules NK par marquage au 7AAD et mesure par Cytométrie en Flux
- La **lyse** des cellules de médulloblastome en présence de cellules NK par mesure de la libération d'adénylate kinase
- La **modification du phénotype** des cellules NK lors d'une incubation prolongée en présence de cellules de médulloblastome par mesure de l'expression de différents récepteurs par Cytométrie en flux

Nous avons également étudié la fonctionnalité des cellules NK obtenues de différentes manières (fraîches, en culture avec de l'IL15, décongelées) afin d'évaluer l'impact des manipulations *ex vivo*.

A la suite de cette étude *in vitro*, la lignée de médulloblastome la plus sensible sera choisie pour l'évaluation du potentiel cytotoxique des cellules NK *in vivo* chez l'animal. Cette étude est actuellement en cours de réalisation.

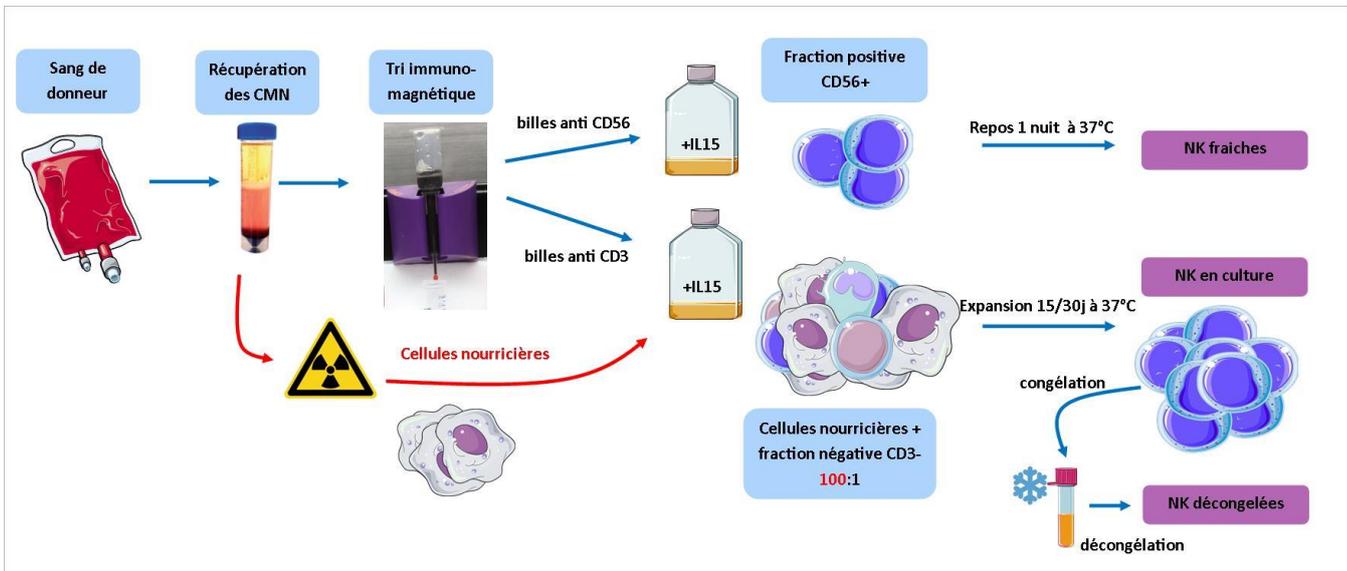


Figure 18 : Stratégie d'obtention des différents types de cellules NK à partir d'une poche de sang d'un donneur

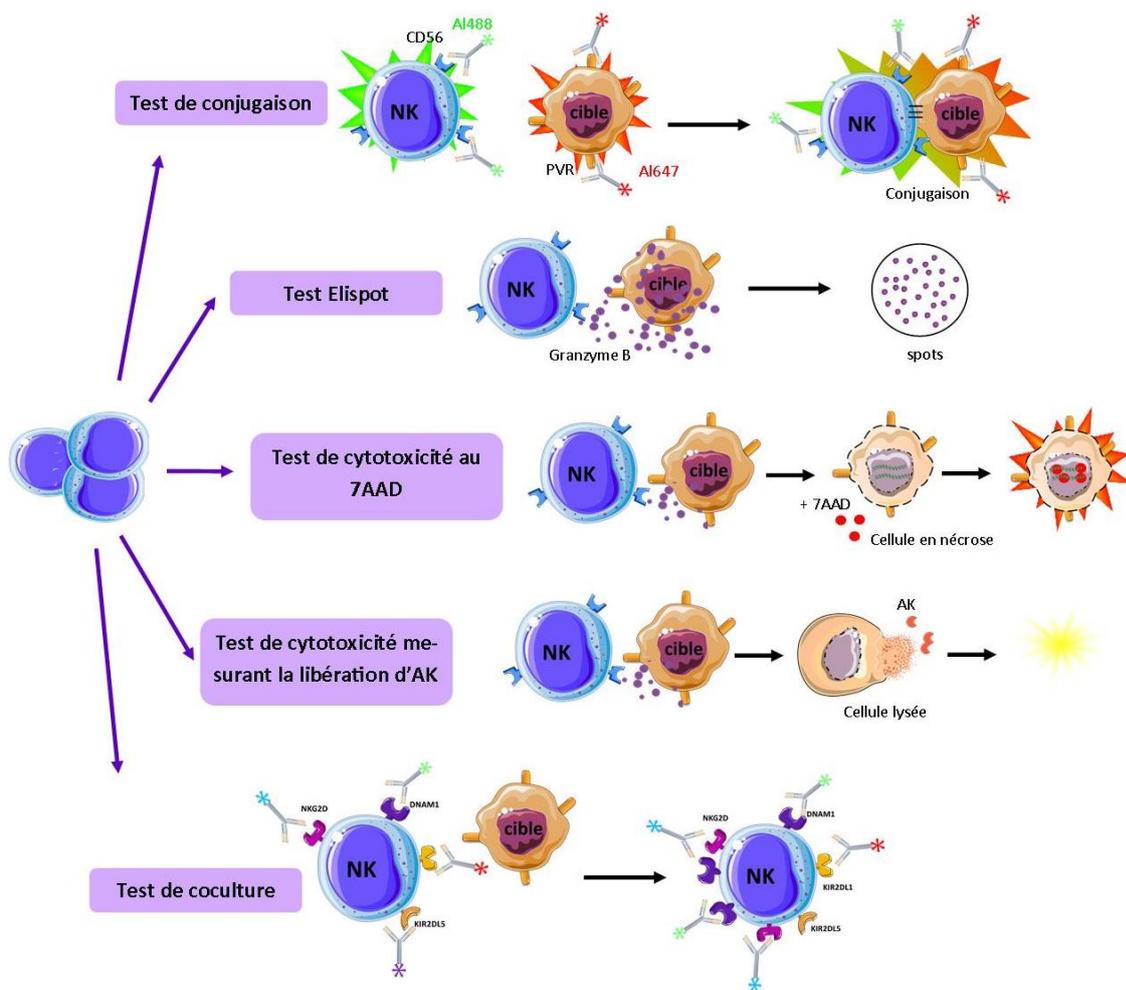


Figure 19 : Tests réalisés pour l'étude du processus de cytotoxicité

III. MATERIELS ET METHODES

A. Préparation des cellules

1. Isolement des cellules NK

a) Récupération des CMN

Des poches d'environ 300mL de sang anti-coagulé ont été collectées auprès de donneurs sains ayant donné leur consentement éclairé pour un usage non thérapeutique, par l'EFS Lorraine Champagne Ardenne. Les cellules mononucléées (CMN) ont été isolées par séparation en gradient de densité en tubes Leucosep (Greiner Bioone), puis lavées 2 fois avec du tampon PBS et reprises en tampon MACS (PBS/0.5% Albumine/0,2mM EDTA filtré de Miltenyi Biotec). (protocole détaillé en Annexe 1)(Figure 18)

b) Tri des cellules NK

Les CMN contenant les cellules NK ont ensuite été soumises à un tri immunomagnétique sur colonne (Miltenyi Biotec). (Figure 20)

Les cellules NK ont été isolées de 2 manières :

- par **sélection positive**, basée sur la **rétection des cellules NK CD56+** sur la colonne après incubation des avec des billes immunomagnétiques anti-CD56. La fraction ainsi obtenue, très pure en cellules NK, pouvait être utilisée immédiatement ou jusqu'à +24h après incubation en milieu NK (composition Tableau 4 A) et présence d'IL-15 (50ng/mL) à 37°C, sous 5% de CO₂.

= CELLULES NK FRAICHES

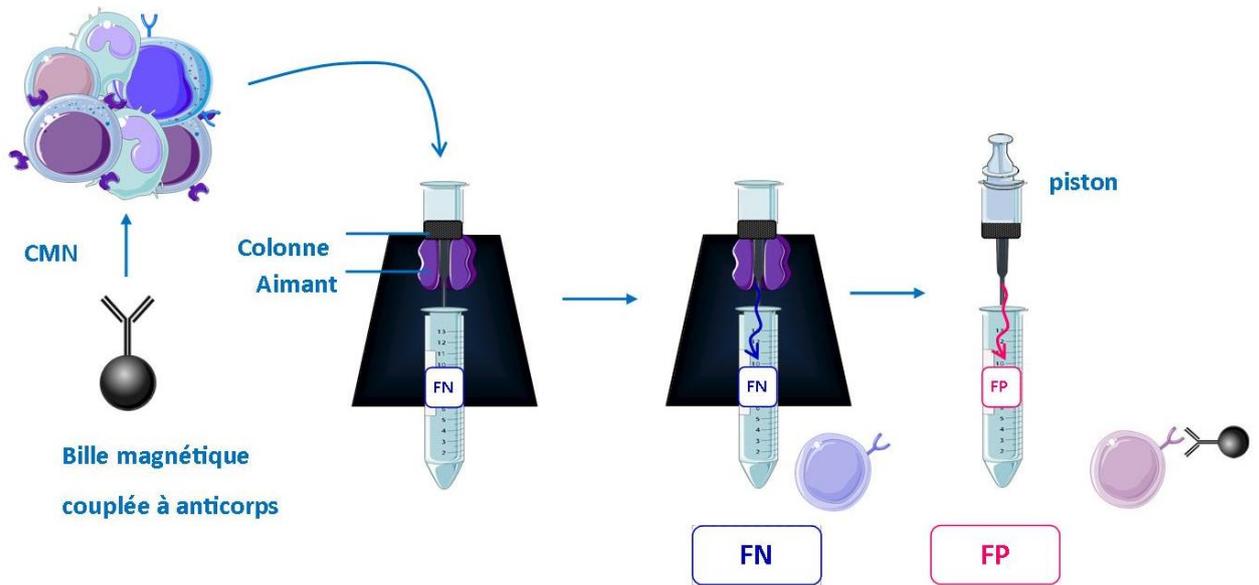
- par **sélection négative** basée sur une **déplétion des lymphocytes T CD3+** après incubation des CMN avec des billes immunomagnétiques anti-CD3. La fraction ainsi obtenue, de pureté inférieure en cellules NK, pouvait être utilisée pour l'expansion cellulaire en culture.

= CELLULES NK EXPANDUES EN CULTURE

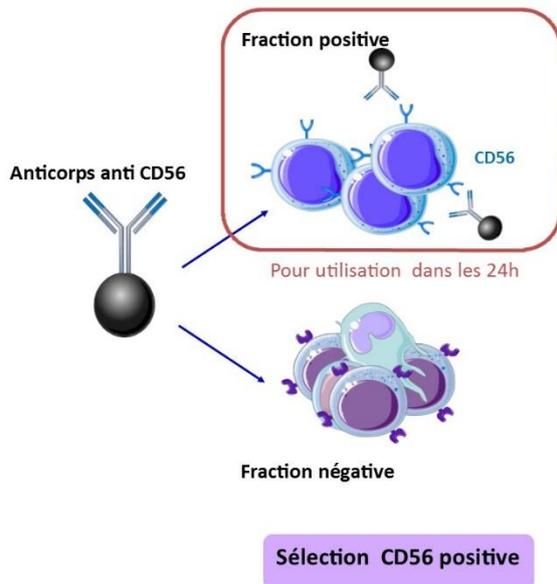
c) Contrôle de pureté

La présence de cellules NK (CD56+CD3-) et l'absence de LT (CD3+) dans les fractions utilisées ont été contrôlées par CMF (CytoMétrie en Flux)(BD FACSCanto I).

A.



B.



C.

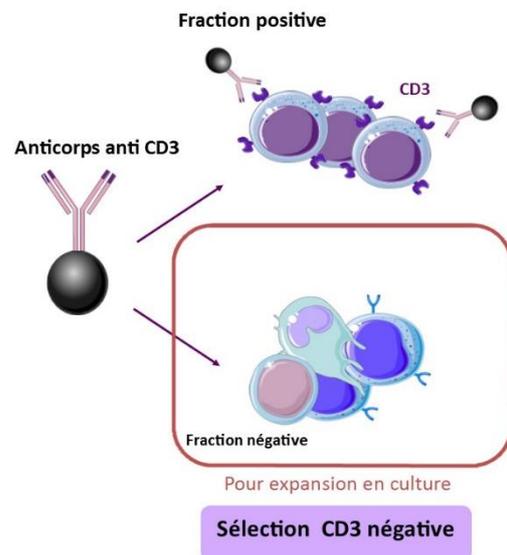


Figure 20 : Principe du tri immunomagnétique

A. Principe général avec récupération de la FN par simple écoulement des cellules à travers la colonne, puis récupération de la FP après éloignement de la colonne de l'aimant et réalisation d'une pression à l'aide d'un piston. B. Sélection CD56 positive. C. Sélection CD3 négative (FP : fraction positive, FN : fraction négative)

2. Culture et prolifération des cellules NK

a) Choix de l'interleukine

La mise en culture des cellules NK permet d'obtenir un grand nombre de cellules en quelques semaines. En plus d'un milieu culture comprenant les éléments nutritifs adéquats, les cellules NK nécessitent la présence d'interleukine pour proliférer. Nous avons choisi d'utiliser de l'interleukine 15 (IL-15) à la suite d'une étude comparative de différentes interleukines (IL2, IL7, IL15) réalisée dans notre laboratoire en 2010. (Decot et al., 2010) L'avantage majeur de l'IL15 par rapport à l'IL2 est qu'elle ne stimule pas la prolifération de lymphocytes T régulateurs (LTreg) responsables d'un effet suppresseurs sur les cellules NK.

b) Mise en culture et expansion

Les cellules NK obtenues après tri CD3 ont été mises en culture en présence de cellules nourricières au ratio 1:100. Les cellules nourricières ont été obtenues par irradiation des CMN non utilisées à 25Gy pendant 18 minutes (irradiateur X-RAD 320, CRAN).

Les cellules NK ont ensuite été cultivées en milieu NK supplémenté (Tableau VI A) pendant 15 à 30 jours à 37°C, sous 5% de CO₂, jusqu'à obtention d'un pourcentage de cellules NK parmi les cellules vivantes proche de 100%. La culture a été enrichie en IL15 tous les 2 jours (50ng/mL) et le milieu changé 2 fois par semaine.

La prolifération des cellules a été évaluée toutes les semaines par mesure de la viabilité au bleu trypan et comptage en cellule de Malassez. Les pourcentages en cellules NK, lymphocytes T et éventuellement NKT ont été évalué par CMF selon l'expression des marqueurs CD3 et CD56 par les cellules

3. Congélation et décongélation des cellules NK

Après avoir atteint une pureté proche de 100%, les cellules NK non utilisées ont été congelées dans leur milieu de culture supplémenté par 10% de DMSO (Diméthylsulfoxyde) à -80°C ou en azote liquide pour une conservation très longue.

Après décongélation, les cellules ont été lavées 2 fois en milieu NK, puis remises en culture en présence d'IL15 avant utilisation.

Tableau VI : Composition des milieux supplémentés utilisés pour la culture des cellules NK (A) et des K562 (B)

A.

Composition du milieu de culture NK supplémenté	
NK MACS Medium de Miltenyi Biotec	500mL
NK MACS supplement de Miltenyi Biotec	5 mL
Sérum AB (fourni par l'EFS) filtré	50mL
Glutamine	5 mL
Agents antimicrobiens Antibiotic-Antimycotic de ThermoFisher (pénicilline G, streptomycine, amphotéricine B)	5mL
+ IL15 recombinante humaine PeProtech extemporanément au moment de l'utilisation du milieu	50ng/mL

B.

Composition du milieu de culture RPMI supplémenté	
RPMI 1640 de Eurobio	500mL
Sérum Veau Fœtal (SVF) de Eurobio décomplémenté	100mL
Glutamine	5 mL
Agents antimicrobiens Antibiotic-Antimycotic de ThermoFisher (pénicilline G, streptomycine, amphotéricine B)	5mL

B. Cellules cibles

1. Lignée K562 témoin

La lignée cellulaire K562, connue comme étant très sensible à la cytotoxicité des cellules NK du fait de l'absence de molécules CMH de classe 1 à leur surface (Lozzio and Lozzio, 1979), a été utilisée comme témoin positif. Cette lignée est issue de cellules tumorales d'un patient atteint de leucémie myéloïde chronique, en phase blastique. *In vitro*, elles sont de taille hétérogène avec un aspect de blastes érythroïdes. Elles se cultivent en suspension dans du milieu RPMI supplémenté (Roswell Park Memorial Institute medium) (composition Tableau VI B). Le milieu était changé 2 fois par semaine et seulement 1/10 des cellules étaient conservées d'une culture à l'autre du fait de l'expansion rapide de ces cellules.

2. Lignées de médulloblastome

Trois lignées de cellules de médulloblastome ont été étudiées. Ces cellules étaient fournies chaque semaine par le CRAN (UMR CNRS 7039, Université de Lorraine) :

- la lignée **DAOY** ou **HTB-186** est issue d'une tumeur de type desmoplastique et appartient au groupe moléculaire SHH avec mutation TP53. Ce sont des cellules tétraploïdes, de grosse taille, polygonales et adhérentes *in vitro*. (protocole détaillé de la trypsination en Annexe 2)
- la lignée **D283** ou **HTB-185** est issue de métastases péritonéales d'une tumeur dont le groupe moléculaire n'est pas clairement défini et est généralement classée dans le groupe 3 ou 4. *In vitro*, elles sont semi adhérentes, de forme sphéroïde et ont tendance à se regrouper en amas.
- la lignée **D341** ou **HTB-187** est issue d'une tumeur appartenant au groupe moléculaire 3. *In vitro*, elles se cultivent en suspension et sont de forme sphéroïde.

Avant chaque utilisation, les cellules ont été comptées et leur viabilité a été évaluée par coloration au bleu trypan en cellule de Malassez,

Les cellules cibles ont été phénotypées par cytométrie en flux (CMF) afin de connaître l'expression de ligands activateurs ou inhibiteurs à leur surface.

C. Analyses *in vitro*

1. Cytométrie en flux

Pour chaque analyse par cytométrie en flux (CMF), les cellules à étudier étaient reprises en tampon MACS à la concentration de $2 \cdot 10^6$ /mL, puis incubées en présence d'anticorps selon les recommandations des fabricants pendant 15 minutes à température ambiante et à l'obscurité (Tableau VII **Erreur ! Source du renvoi introuvable.**). Elles étaient ensuite lavées 2 fois (1 fois en tampon MACS et 1 fois en PBS) puis reprises dans 300 μ L de PBS avant d'être analysées sur le cytomètre BD FACSCanto I avec le logiciel d'analyse DIVA 6.0. Un minimum de 100 000 événements étaient acquis par test.

Tableau VII : Anticorps utilisés en CMF : anticorps couplés à un fluorochrome (A), anticorps primaires (B), anticorps secondaires (C)

A.

Marquage	Fournisseur	Référence	Dilution	Fluorochrome
CD56	Miltenyi Biotec	130-113-305	1/50	APC
CD56	BD Pharmingen	557699	1/50	Alexa fluor 488
CD3	Miltenyi Biotec	130-113-138	1/50	FITC
NKG2D	BD Horizon	564566	1/50	BB515
KIR2DL1/DS1	Miltenyi Biotec	130-092-684	1/5	PE
KIR2DL5	Miltenyi Biotec	130-096-199	1/5	PE
B7H1*				
B7H4*				
CD105	BD Stemflow	51-9007648	1/50	PerCP-Cyanine 5.5
CD73	BD Pharmingen		1/5	PE
PVR	BD Pharmingen	566305	1/50	Alexa fluor 647
Cellules en nécrose ou apoptose tardive	BD Pharmingen	559925	1/10	7AAD

* anticorps utilisés lors d'un marquage antérieur

B.

Marquage	Fournisseur	Référence	Dilution	Espèce isotype
DNAM1 humain	Invitrogen de ThermoFisher Scientific	PA5-31111	1/500	lapin
NKp30 humain	Merck Millipore	ABF127	1/50	lapin
B7H3 humain	BD Pharmingen	565828	1/50	souris
MICA/B humain	Invitrogen de ThermoFisher Scientific	14-5788-80	1/100	souris

C.

Espèce Cible	Fournisseur	Référence	Dilution	Espèce Isotype	Fluorochrome
souris	Invitrogen de ThermoFisher Scientific	A21126	1/1000	chèvre	Alexa fluor 633
lapin	Invitrogen de ThermoFisher Scientific	A21443	1/1000	poulet	Alexa fluor 647
lapin	Invitrogen de ThermoFisher Scientific	A21207	1/1000	âne	Alexa fluor 594
souris	Invitrogen de ThermoFisher Scientific	A28175	1/500	chèvre	Alexa fluor 488

2. Test de conjugaison des cellules NK avec les cellules cibles

Le principe de ce test est la mise en évidence par CMF des conjugués formés entre les cellules NK et les cellules cibles. (protocole détaillé en Annexe 3)

Les cellules NK et les cellules cibles sont marquées séparément et respectivement avec des anticorps antiCD56 (Alexa fluor 488) et antiPVR (Alexa fluor 647). Après lavage, les cellules NK et les cibles ont été reprises dans du milieu NK supplémenté à la concentration de $2 \cdot 10^6$ /mL, mélangées au ratio 1:1, centrifugées 1min à 200g afin de favoriser leur contact au fond du tube et incubées 15 min à 37°C 5% de CO₂. Le mélange a été bloqué par ajout de 70µL de paraformaldehyde à 4% (PFA) durant 10min à température ambiante et dans l'obscurité. Les cellules ont été centrifugées une dernière fois 4min à 200g sans freinage afin d'éliminer le surnageant, remises délicatement en suspension dans du PBS puis analysées en CMF. Des tubes témoins contenant des cellules cibles ou NK seules avec ou sans anticorps ont été réalisés à chaque expérience.

Stratégie d'analyse : (Figure 22)

Le pourcentage de cellules NK conjuguées correspond au pourcentage d'événements doubles positifs CD56/PVR par rapport à l'ensemble des événements CD56 positifs.

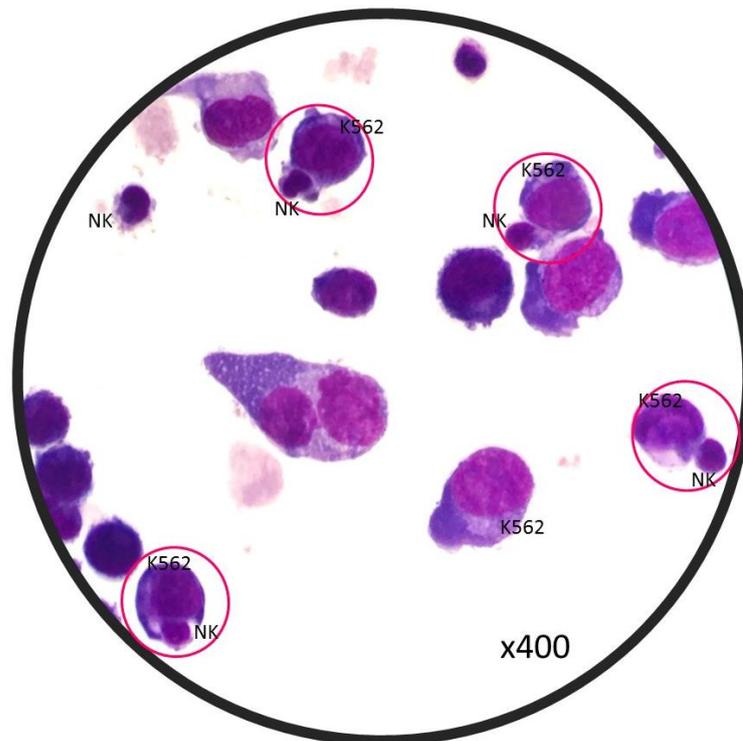


Figure 21 : Conjugués de cellules NK et K562 colorés au MGG et observés en microscopie optique (x400)

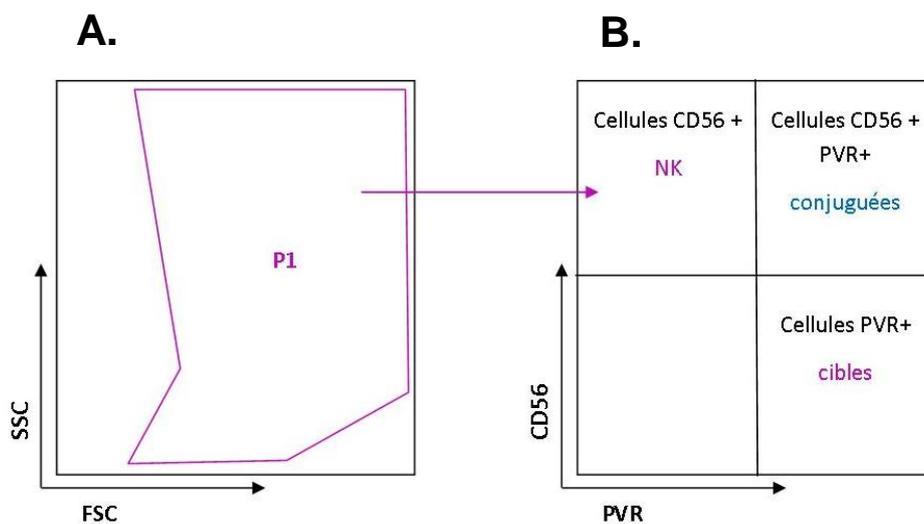


Figure 22 : Stratégie d'analyse : test de conjugaison

- A. Une fenêtre d'analyse P1 est réalisée sur les cellules NK et les cellules cibles en fonction de leur taille (FSC) et de leur granularité (SSC).
- B. Les évènements en P1 sont analysés selon l'expression des marqueurs CD56 et PVR. Les cellules conjuguées correspondent aux événements doubles positifs CD56/PVR.

3. Test de dégranulation par Elispot Granzyme B

Le principe de ce test est la mise en évidence sous forme de spots, du granzymes B libéré par les cellules NK activées. (protocole détaillé en Annexe 4)

Les kits *Human Granzyme B Elispot development module* et *Elispot Blue color module* de chez R&D systems et des microplaques 96 puits MultiScreen IP Filter Plate (Merck Millipore) ont été utilisés selon les recommandations des fabricants.

Réalisation du test : (Figure 23)

Pour décrire brièvement la réalisation du test (protocole détaillé en Annexe 4), des anticorps antigranzyme B ont été fixés au fond de puits contenant une membrane poreuse.

Les cellules NK et/ou cibles ont ensuite été ajoutées dans ces puits. Le granzyme sécrété par les cellules NK activées a pu ainsi se lier aux anticorps antigranzyme fixés à la membrane poreuse. Après 24h d'incubation à 37°C les cellules ont été retirées des puits.

La seconde étape de ce test consiste à révéler la présence du granzyme. Pour cela un second anticorps pour le granzyme B couplé à de la biotine a été ajouté dans chaque puits. De la streptavidine (molécule très affine pour la biotine) couplée à la phosphatase alcaline (PAL) ont ensuite été ajoutées afin de créer un complexe granzyme B/anticorps-biotine/streptavidine-PAL. Enfin du NBT (nitro blue tetrazolium chloride) associé à du BCIP (5-brom-4-chloro-3'-indolyphosphate p-toluidine salt) ont été utilisés pour terminer la réaction. Cette combinaison permet d'obtenir un précipité insoluble violet intense lorsqu'elle réagit avec la phosphatase alcaline. On peut ainsi visualiser ces précipités sous formes de spots (Figure 24), en nombre proportionnel à la quantité de granzyme B libérés par les cellules.

Les spots ont été comptés par l'automate Bioreader 4000 PRO-S (BIO-SYS).

Choix des concentrations et des ratios E/C :

Plusieurs concentrations de cellules NK ont été testées ($5.10^4/2,5.10^4/1,25.10^4/0,625.10^4$ dans 100µL de milieu par puit) en présence d'une quantité fixe de cellules cibles (1.10^3 cellules par puits permettant d'obtenir différents ratios : 50:1/25:1/12,5:1/6,25:1). Un contrôle positif a été réalisé par ajout de 0,2µg de PHA (Phytohémagglutinine de ThermoFisher, agent mitogène qui déclenche la dégranulation des cellules NK) dans un puits contenant 5.10^4 cellules NK. Des blancs ont été réalisés par incubation des cellules cibles seules ou du milieu seul. Enfin un contrôle négatif contenant des cellules NK seules a également été réalisé. Chaque condition a été reproduite en triplicate.

Stratégie d'analyse :

Les résultats sont exprimés en nombre de SFC (Spots Forming Cells) pour 1.10^5 cellules NK correspondant au nombre de spots par puits (rapporté à 1.10^5 cellules NK) auquel ont été soustrait le nombre de spots des blancs et du contrôle négatif (rapporté à 1.10^5 cellules NK également).

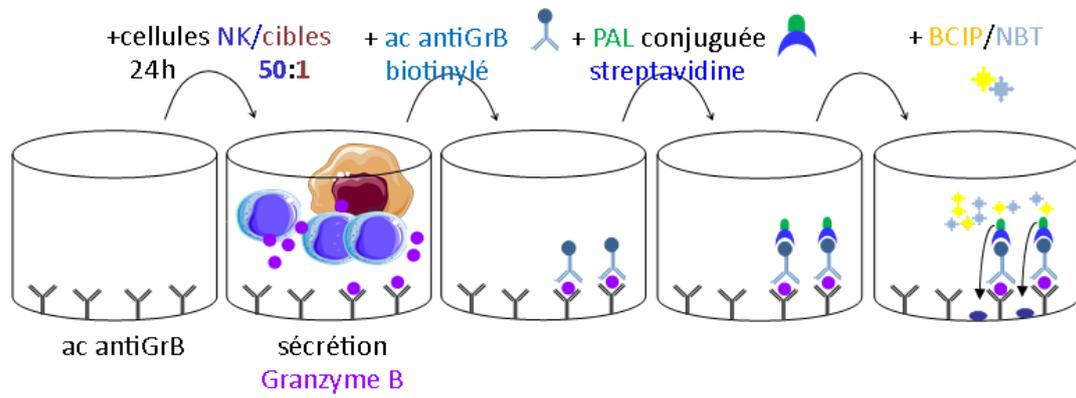


Figure 23 : Principe de la technique Elispot mettant en évidence la libération de granzyme B par les cellules NK

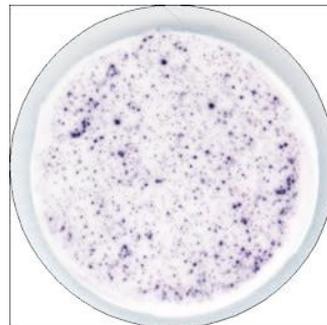


Figure 24 : Fond de puits recouvert de spots

4. Test de cytotoxicité au 7AAD

Le principe de ce test est basé sur la détection des cellules en phase de nécrose ou apoptose tardive par CMF après marquage au 7AAD (7-aminoactinomycine D). Le 7AAD est un composé fluorescent s'intercalant dans l'ADN cellulaire dont la membrane a perdu son intégrité.

Choix des concentrations et des ratios E/C :

Les cellules NK et cibles sont mélangées au ratio 5:1 ($2,5 \cdot 10^6/\text{mL}$ NK et $0,5 \cdot 10^6/\text{mL}$ de cellules cibles) en milieu NK supplémenté en IL-15 ($50\text{ng}/\text{mL}$). Des tubes témoins contenant des cellules cibles ou NK seules ont également été réalisés.

Réalisation du test

Après 4h d'incubation, à 37°C à 5% de CO_2 , les cellules ont été lavées au PBS. $5\mu\text{L}$ de 7AAD ont été ajoutés dans chaque tube, puis incubées 5min à température ambiante avant de mesurer la fluorescence en CMF.

Stratégie d'analyse (Figure 25)

Le pourcentage de nécrose des cellules cibles obtenu lors de l'incubation de ces dernières avec les cellules NK est appelé « pourcentage expérimental de nécrose » tandis que celui obtenu avec les tubes témoins lorsque les cellules cibles ont été incubées seules est appelé « pourcentage de nécrose non spécifique ».

Le pourcentage de cellules cibles en phase de nécrose réellement induit par les cellules NK est exprimé en « **pourcentage de nécrose spécifique** » et déterminé selon la formule suivante :

$$\% \text{ de nécrose spécifique} = \frac{\% \text{ expérimental de nécrose} - \% \text{ nécrose non spécifique}}{100 - \% \text{ nécrose non spécifique}}$$

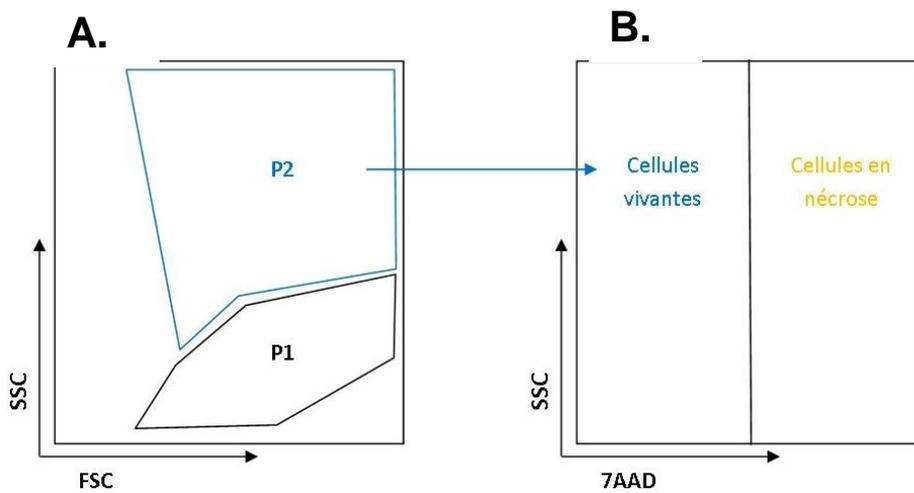


Figure 25 : Stratégie d'analyse : test de cytotoxicité par CMF

- A. 2 fenêtres d'analyse sont réalisées selon la taille (FSC) et la granularité (SSC) des évènements : la première contenant les cellules NK (P1) et la seconde contenant strictement les cellules cibles (P2).
- B. Les évènements en P2 sont analysés selon leur émission de fluorescence du 7AAD. Le pourcentage de cellules en P2 émettant cette fluorescence permet de déterminer le pourcentage de cellules cibles en nécrose (ou apoptose tardive).

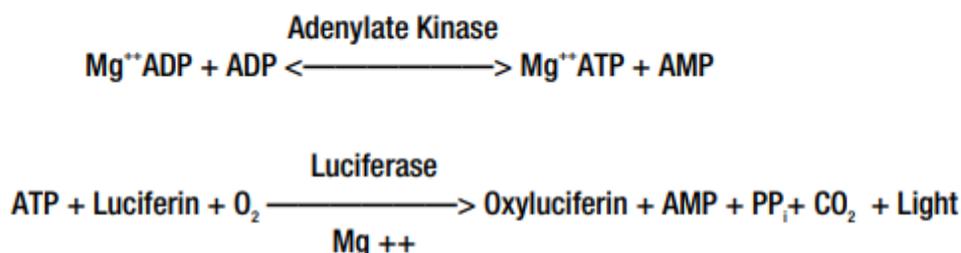
5. Test de cytotoxicité mesurant la libération d'adénylate kinase

Le kit *ToxiLight biossay* de Lonza a été utilisé pour ce test. (protocole détaillé en Annexe 5)

Le principe est basé sur la mesure de la bioluminescence du milieu extracellulaire proportionnelle à la présence d'adénylate kinase (AK) dans ce milieu. L'AK est une enzyme naturellement présente dans les cellules et qui est libérée dans le milieu lors de la lyse de ces dernières.

La production de luminescence à partir de l'AK se déroule en 2 étapes :

- la première implique l'addition de molécules d'ADP en excès dans le milieu, Ces dernières seront converties en molécules ATP par les enzymes AK présentes dans le milieu.
- la deuxième implique l'addition de luciférase et de son substrat la luciférine. Proportionnellement à la présence d'ATP dans le milieu, les luciférases vont transformer les molécules de luciférines en oxyluciférines et permettent la formation de lumière.



Réalisation du test

Les cellules NK, à la dose de $10 \cdot 10^4$, $5 \cdot 10^4$, $1 \cdot 10^4$ dans $100 \mu\text{L}$ de milieu par puits, ont été incubées en présence d'une quantité fixe de cellules cibles ($1 \cdot 10^4$ cellules par puits) en milieu NK MACS sans sérum pendant 24h à 37°C à 5% de CO_2 de manière à obtenir différents ratios E/C de 10:1, 5:1 et 1:1. Des puits contenant des cellules cibles seules ont été réalisés en double afin de mesurer l'adénylate kinase libérée lors de la lyse spontanée et lors de la lyse maximale.

Après incubation, le réactif *AK detection reagent* est ajouté dans chaque puits selon les recommandations du fabricant. Après 5 min, la luminescence émise dans chaque puits est mesurée par le luminomètre VICTOR X4 (PerkinElmer) et exprimée en coups/min.

La lyse maximale est obtenue par ajout de solution de lyse *Toxilight 100% lysis* dans les puits contenant les cellules cibles seules. Après 15 min d'incubation à température ambiante le réactif *AK detection reagent* a été ajouté dans chaque puits et la luminescence a été mesurée comme précédemment.

Stratégie d'analyse :

L'intensité lumineuse obtenue à partir des puits contenant les cellules cibles incubées en présence de cellules NK est appelée « lyse expérimentale de nécrose » tandis que celle obtenue à partir des puits contenant des cellules cibles seules est appelé « lyse spontanée ». L'intensité lumineuse obtenue à partir des puits contenant des cellules cibles seules lysées à 100% par la solution de lyse est appelée « lyse maximale ».

Le pourcentage de cellules cibles lysées réellement par les cellules NK est exprimé en « **pourcentage de lyse spécifique** » et déterminé selon la formule suivante :

$$\% \text{ spécifique de lyse} = \frac{(\text{lyse expérimentale} - \text{lyse spontanée})}{(\text{lyse maximale} - \text{lyse spontanée})} \times 100$$

6. Test de coculture

Une éventuelle variation d'expression de récepteurs activateurs et inhibiteurs des cellules NK en présence des cellules cibles a été évaluée après 48h de coculture.

Réalisation du test

Les cellules NK et cibles ont été mélangées au ratio 5:1 (1.10⁶/mL de NK et 0,2. 10⁶/mL de cibles) en milieu NK supplémenté en l'IL-15 (50ng/mL) et incubées 48h à 37°C et 5% de CO₂.

Des prélèvements de cellules ont été effectués à 3 temps différents soit +4h, +24h et +48h. Les cellules ont été lavées en tampon MACS et marquées avant d'être analysées par CMF selon les modalités précédemment décrites. Des puits témoins contenant des cellules cibles ou cellules NK seules ont également été réalisés.

Stratégie d'analyse :

Les marqueurs suivants ont été analysés: DNAM1, NKG2D, KIR2DL1, KIR2DL5. (Figure 26)

Les résultats sont exprimés en rapport de l'intensité de fluorescence des récepteurs exprimés par les cellules NK en coculture par rapport à celle exprimée par les cellules NK en culture seules.

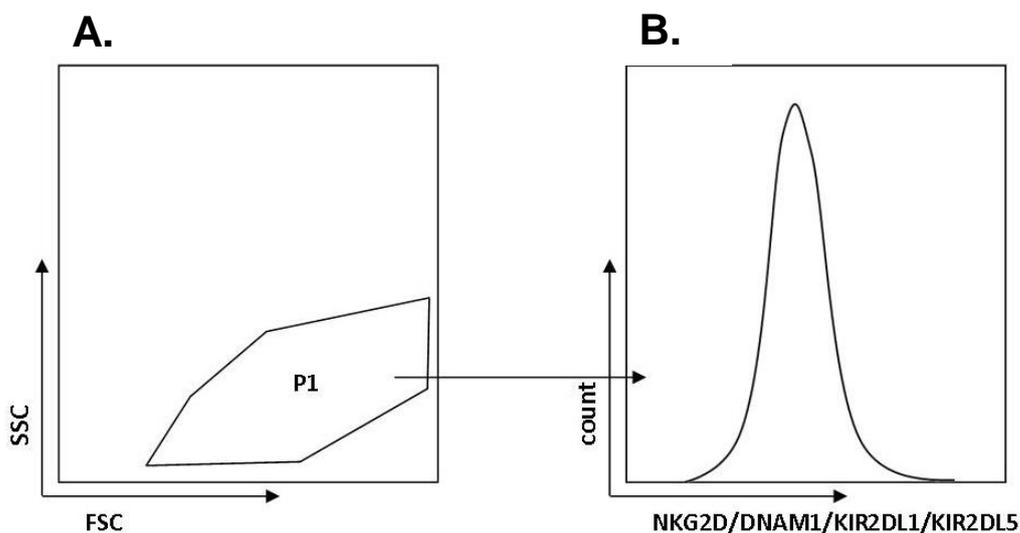


Figure 26 : Stratégie d'analyse : test de coculture

A. Une fenêtre d'analyse (P1) est réalisée sur les cellules NK en fonction leur taille (FSC) et de leur granularité (SSC) de manière à éliminer les débris cellulaires.

B. L'intensité de fluorescence des cellules pour les différents récepteurs testés est analysée sur la fenêtre P1.

D. Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel GraphPad Prism. L'ensemble des résultats a été présenté sous la forme de moyenne \pm SEM (Erreur Standard à la Moyenne). La normalité de la distribution des valeurs a été évaluée par les tests de K2 de D'Agostino-Pearson ou de Shapiro-Wilk en fonction des conditions de départ. Le niveau de significativité des différences entre les groupes a été mis en évidence par le test t de Student en échantillons appariés.

IV. RESULTATS

A. Phénotypage des lignées cellulaires de médulloblastome

Un phénotypage de chaque lignée a été réalisé par CMF afin de mettre en évidence un marqueur spécifique et sensible des cellules de médulloblastome et d'essayer de prédire en fonction de leur phénotype une sensibilité aux cellules NK.

a) Marqueurs évalués

Pour prédire une éventuelle résistance aux cellules NK, nous avons évalué l'expression de molécules impliquées dans **l'immunomodulation**. Nous avons ainsi testé les **molécules de la famille B7** (B7H1 ou PD-L1, B7H4 et B7H3) qui vont exercer un rôle immunosuppresseur sur les cellules immunitaire, et le **CD73** (ou 5'ecto-nucléotidase) impliqué dans la production d'adénosine immunosuppressive.

L'expression de **ligands des récepteurs activateurs** des cellules NK comme **MICA/B** (ligand du récepteur NKG2D) et **PVR** (ligand de DNAM-1) a également été évaluée afin de prédire cette fois si la capacité des cellules de médulloblastomes à stimuler les cellules NK.

De nombreux tests étant basés sur la co-incubation des cellules NK avec les cellules de médulloblastome, nous avons voulu savoir si le marqueur **CD56** était exprimé par les cellules de médulloblastome.

Enfin nous avons voulu connaître l'expression d'un marqueur de cellules souches, le **CD105** (ou endogline) présent à la surface des cellules souches mésenchymateuses, et qui pourrait éventuellement nous servir de marqueur pour nos cellules cancéreuses.

b) Résultats

Concernant les marqueurs impliqués dans l'immunosuppression, des résultats variables ont été retrouvés en fonction des lignées. Ainsi seule notre lignée DAOY exprime la molécule B7H3 (et de manière faible) alors qu'une précédente étude avait retrouvé ce marqueur sur les 3 lignées. (Castriconi et al., 2007) Le marqueur B7H1/PD-L1 est très faiblement positif sur la lignée DAOY mais absent sur les 2 autres lignées. Le marqueur B7H4 est positif sur les lignées DAOY et D341 mais négatif sur la lignée D283. Le CD73 n'a été retrouvé que sur la lignée DAOY. La lignée DAOY semble donc avoir un potentiel immunomodulateur sur le SI plus développé que les 2 autres lignées.

Le ligand activateur PVR est présent chez toutes les lignées alors que MICA/B n'est faiblement exprimé que chez la lignée DAOY. Les cellules DAOY ont donc en théorie une plus grande capacité à stimuler les cellules NK.

Le marqueur d'immaturation CD105 est exprimé chez les 3 lignées avec des intensités d'expression variables. Enfin, Les 3 lignées sont fortement positives pour la molécule d'adhésion neuronale CD56 également présente sur les cellules NK. (Figure 27)

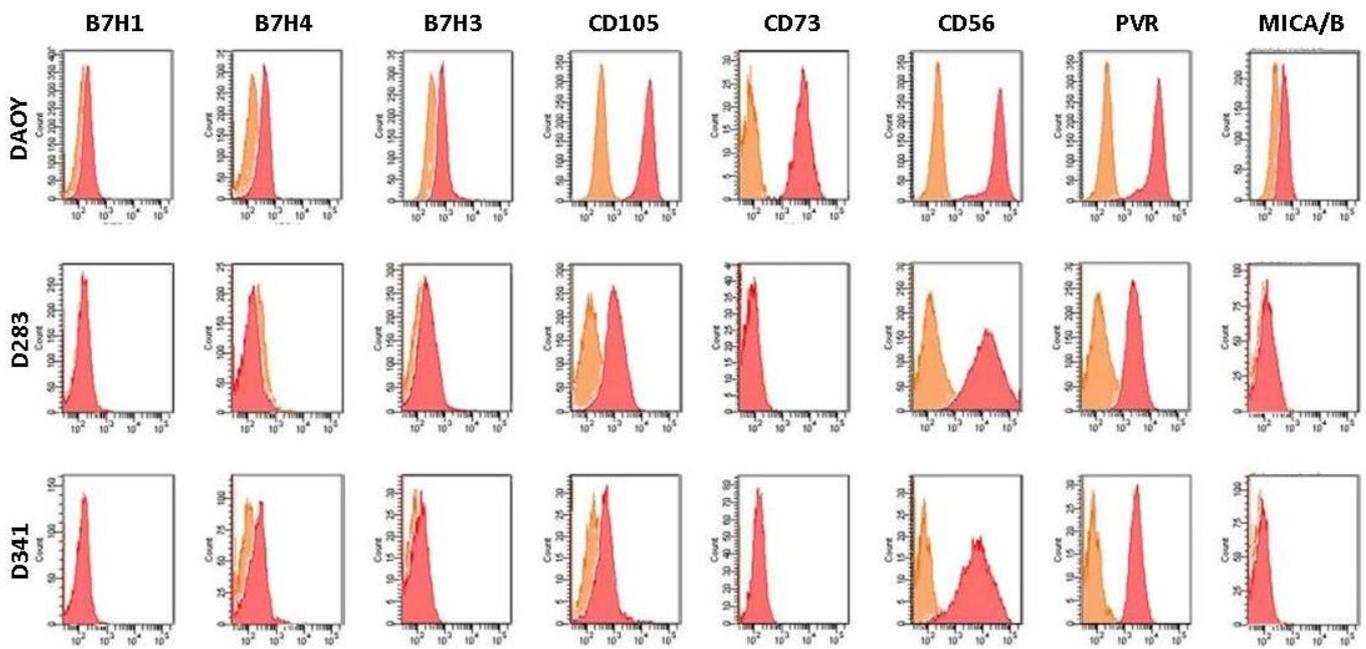


Figure 27 : Comparaison des phénotypes de 3 lignées de médulloblastome (DAOY, D283, D341) par CMF

B. Test de conjugaison des cellules NK avec les cellules cibles

La capacité des cellules NK à former une synapse immunologique avec les cellules tumorales a été mesurée en mettant au point un test de conjugaison par cytométrie en flux.

Le test de conjugaison a été réalisé pour 5 lignées différentes de NK (cellules isolées et expandues en culture ou décongelées). Après 15 min d'incubation, les cellules NK forment significativement plus de conjugués avec les cellules K562 ($66\% \pm 11$) (non représenté sur la figure A) qu'avec les cellules de médulloblastomes. Parmi les lignées de médulloblastomes, les cellules DAOY se conjuguent significativement plus que les 2 autres lignées ($45\% \pm 9$, contre $37\% \pm 6$ avec les D341 et $16\% \pm 2$ avec les D283). (Figure 28)

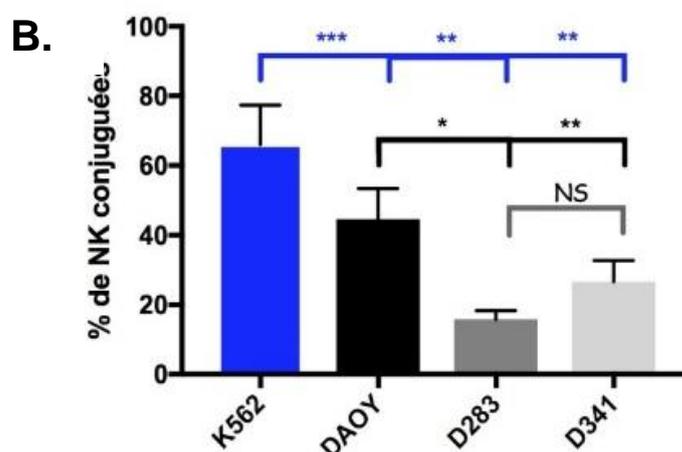


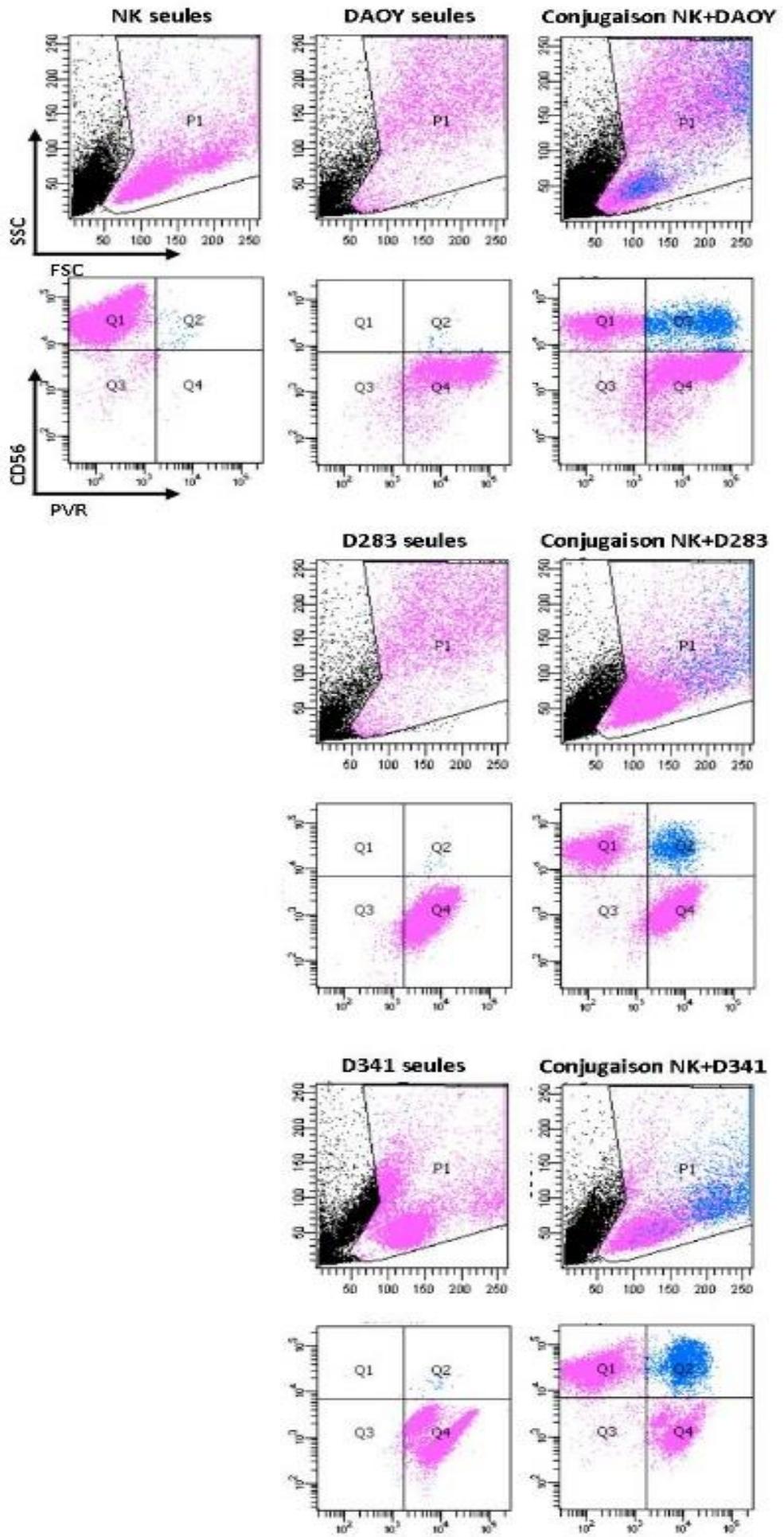
Figure 28 : Evaluation de la conjugaison de cellules avec différentes lignées de médulloblastome

A. Figure représentant les cellules NK marquées avec un anticorps antiCD56 AI488 co-incubées pendant 15 minutes avec les lignées de médulloblastome marquées avec un anticorps anti-PVR AI647 à un ratio E/C de 1:1. Les populations cellulaires sont ciblées en P1 afin d'éliminer les débris. La fenêtre P1 est ensuite divisée en 4 quadrants soit Q1, les événements CD56+ et PVR- (cellules NK seules) ; Q2, les événements CD56+ et PVR+ (conjuguées) ; Q3, les événements CD56- PVR- ; Q4 les événements PVR+ et CD56- (lignées de médulloblastome). Les cellules ont été marquées séparément afin d'éviter que l'antiCD56 ne marque aussi les lignées de médulloblastome. Les cellules conjuguées apparaissent en bleu alors que les non conjuguées sont représentées en rose.

B. Valeurs moyennes \pm SEM du test de conjugaison établies sur n=5 lignées de cellules NK. En bleu foncé, valeur moyenne des conjugués obtenus avec la lignée K562, en noir avec la lignée DAOY, en gris foncé avec la lignée D283 et en gris clair avec la lignée D341.

(* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$)

A.



C. Test de dégranulation par Elispot Granzyme B

La formation de la synapse immunologique évaluée par le test de conjugaison s'accompagne d'une réorganisation du cytosquelette intracellulaire et d'un déplacement des granulations intracellulaires vers la zone de contact entre les 2 cellules. L'étape suivante du processus de cytotoxicité est la fusion des granulations avec la membrane plasmique et la libération des molécules de perforines et de granzymes contenus dans ces granulations.

La capacité de dégranulation des cellules NK a été mesurée en quantifiant le nombre de spots formés par le test *Elispot granzyme B*. Un nombre moyen de 145 spots \pm 36 SEM, 41 spots \pm 35 SEM, 44 spots \pm 26 SEM a été obtenu lorsque les cellules NK ont été incubées respectivement en présence de cellules DAOY, D283 et D341. Après 24h d'incubation, seule la lignée DAOY induit une libération de granzyme B significativement supérieure par rapport aux cellules NK non stimulées.

Toutes les cellules NK ont montré une bonne réponse à la stimulation par la PHA (contrôle positif) avec un nombre moyen de spots de 326 \pm 84, nous n'avons pas trouvé de différence significative entre les cellules NK incubées avec du PHA ou en présence de cellules de la lignée DAOY. (Figure 29)

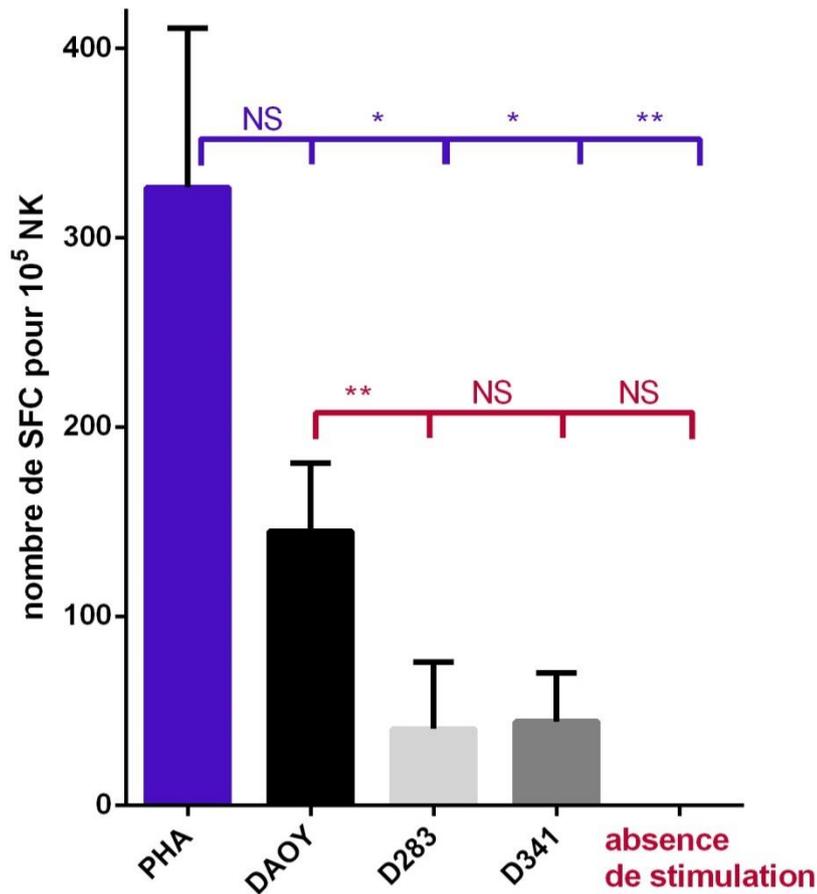
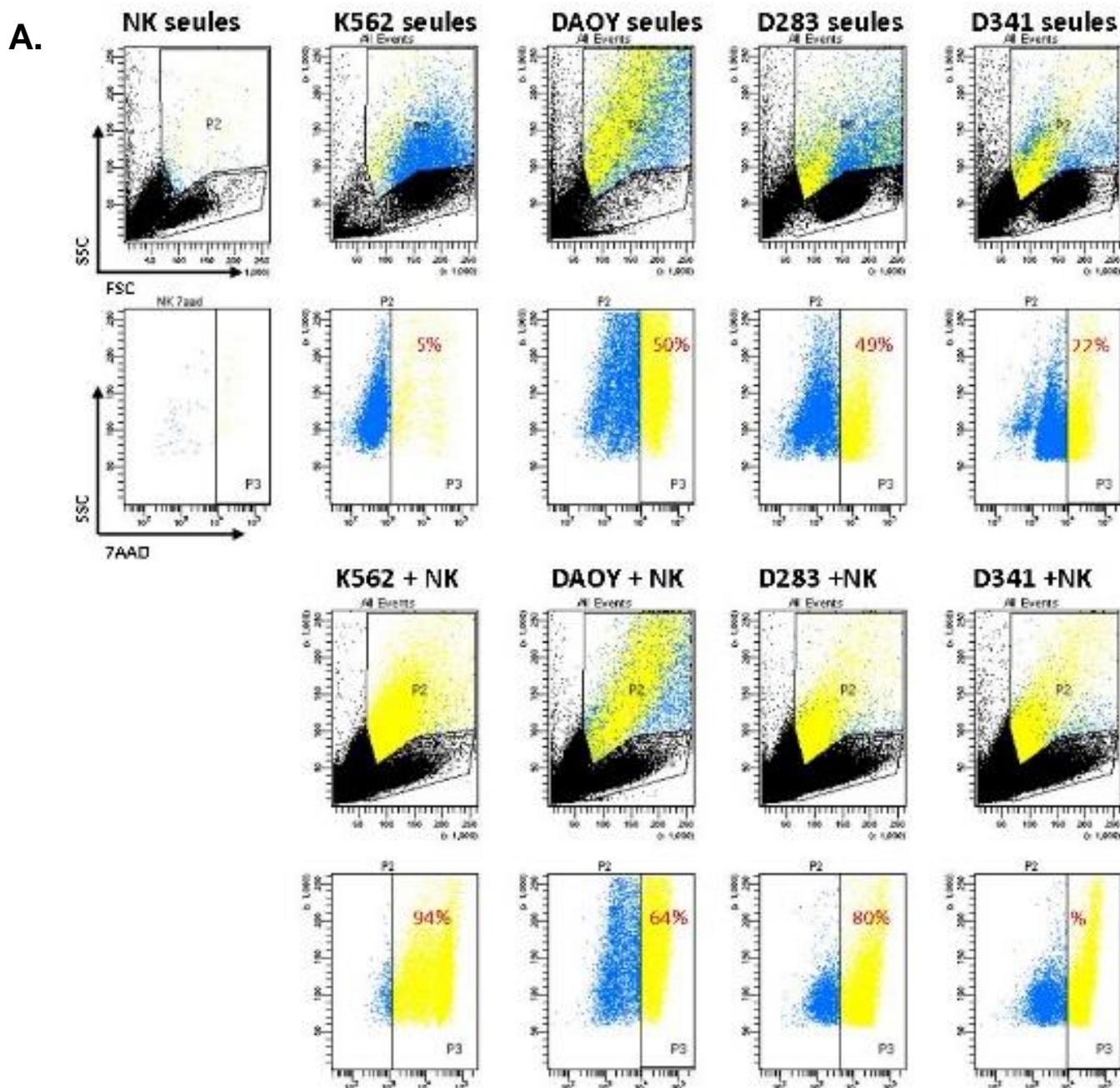


Figure 29 : Evaluation de la dégranulation des cellules NK en présence des différentes lignées de médulloblastome

Valeurs moyennes \pm SEM du nombre de SFC pour 1.10^5 cellules NK après 24h d'incubation en présence des différentes lignées de médulloblastomes, établies sur $n=6$ lignées de cellules NK. En bleu foncé valeur moyenne de spots obtenus en présence de PHA, en noir avec la lignée DAOY, en gris foncé avec la lignée D283, et en gris clair avec la lignée D341. (* $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$ par rapport au PHA en bleu foncé, et par rapport à l'absence de stimulation en rouge)

D. Test de cytotoxicité au 7AAD

Le test de cytotoxicité au 7AAD a été réalisé 25 fois avec différents types de NK (9 fraîches, 10 en culture, 6 décongelées) issues de 13 donneurs différents. Après 4h d'incubation, les NK induisent une nécrose chez toutes les lignées mais en pourcentage très variables en fonction du donneur. Les cellules NK induisent significativement plus de nécrose chez les cellules K562 ($49\% \pm 6$) que chez les lignées de médulloblastomes entre lesquelles n'a pas été retrouvée de différence significative ($38\% \pm 4$, $30\% \pm 4$, $30\% \pm 4$ respectivement pour les DAOY, D283 et D341). (Figure 30)



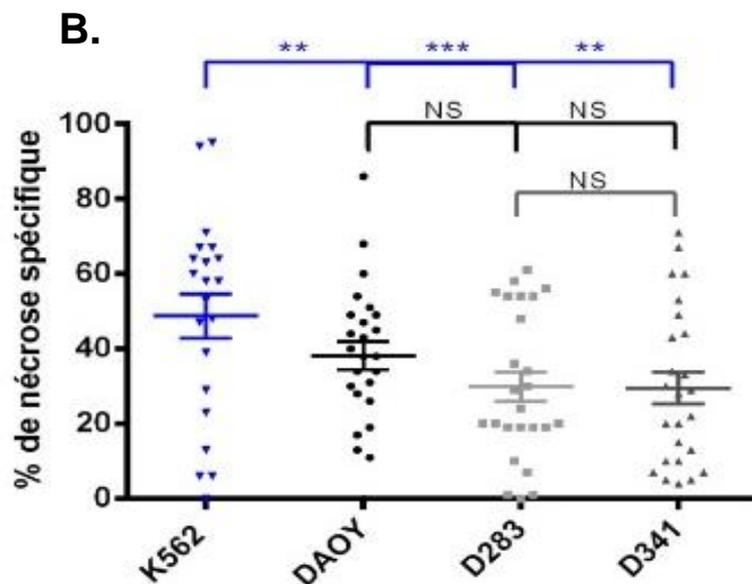


Figure 30 : Evaluation du pourcentage de nécrose spécifique des cellules cibles en présences de cellules NK par CMF

A. Figure représentant la nécrose des cellules cibles incubées pendant 4 heures avec les cellules NK à un ratio E/C de 5:1. P1 représente les événements ayant une taille/structure correspondant aux NK, alors que P2 représente strictement les cellules ciblent. La fenêtre P2 est ensuite analysée en fonction de la fluorescence émise par le 7AAD. Le pourcentage de cellules cibles en phase de nécrose ou apoptose tardive a été déterminé à partir du pourcentage de cellules P2 en P3. Ces cellules sont représentées en jaune alors que les cellules vivantes sont représentées en bleu. **B.** Valeurs moyennes \pm SEM du nécrose spécifique par lignée de cellules cibles établies au cours de n=25 expériences. En bleu foncé, valeur moyenne obtenue avec la lignée K562, en noir avec la lignée DAOY, en gris foncé avec la lignée D283 et en gris clair avec la lignée D341. (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ par rapport à K562 en bleu, à DAOY en noir, entre D283 et D341 en gris)

E. Test de cytotoxicité mesurant la libération d'adénylate kinase

L'avantage de ce test par rapport au test de cytotoxicité effectué en cytométrie en flux réside dans sa capacité à quantifier les cellules tumorales qui ont été lysées lors du processus de cytotoxicité et qui ne sont plus visibles en cytométrie. Le test de cytotoxicité mesurant la libération d'AK a été réalisé avec 6 lignées de NK toutes issues de culture. Après 24h d'incubation, les NK induisent une cytolysse de toutes les lignées. On retrouve cependant un pourcentage de lyse significativement plus élevé chez les lignées D283 et D341 (au ratio E/C : 5:1, 40% ± 10 de lyse spécifique chez les K562, 32% ± 2 chez les DAOY, 54% ± 11 chez les D283 et 77 ± 17 chez les D341). Un effet dose significatif est observé uniquement envers les lignées K562 et DAOY (pourcentage de lyse spécifique respectivement au ratio 10:1, 5:1 et 1:1 de 51% ± 7, 40% ± 10, 23% ± 20 envers les K562 et 42% ± 8, 32% ± 2, 10% ± 3 envers les DAOY, 83% ± 26, 54% ± 11, 38% ± 11 envers les D283, et 66% ± 11, 77% ± 17, 40% ± 20 envers les D341) (différences non représentées sur le graphique). (Figure 31)

Le fait que les cellules K562 et DAOY présentent un pourcentage de lyse spécifique plus faible peut sembler surprenant. En fait nous pensons que ces valeurs ont été sous estimées. Nous avons en effet remarqué que les cellules K562 et DAOY cultivées seules, étaient capables de proliférer très rapidement même en milieu NK (multiplication jusqu'à un facteur 10 en 3 jours). La valeur de lyse maximale (correspondant à la lyse totale des cellules cibles incubées seules pendant 24h) utilisée dans le calcul de la lyse spécifique est donc potentiellement surestimée, ce qui induirait une sous-estimation de ce pourcentage de la lyse spécifique.

La comparaison des résultats de ce test entre les différentes lignées demeure donc délicate puisque nous ne tenons pas compte de la prolifération cellulaire. Pour des manipulations futures il faudrait donc en revoir la conception.

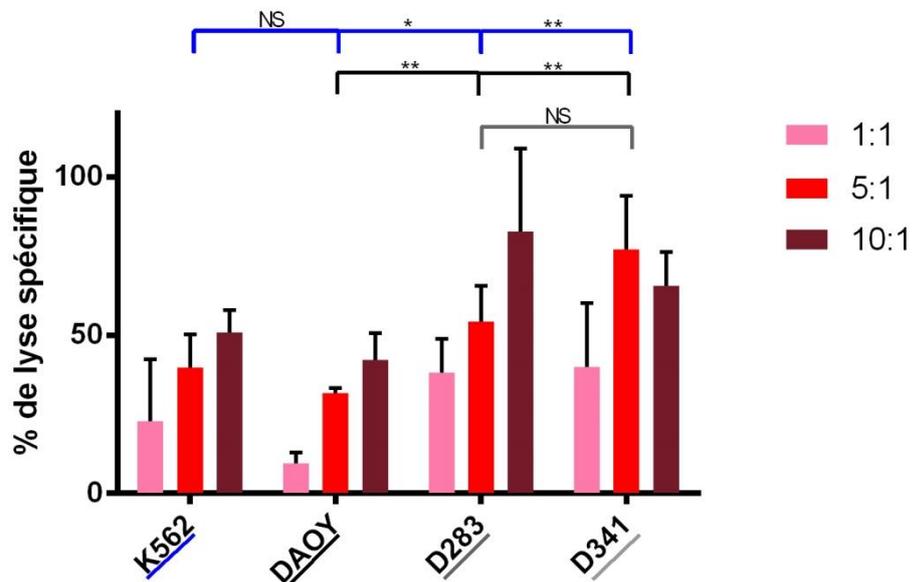


Figure 31 : Evaluation du pourcentage de lyse spécifique des cellules cibles en présences de cellules NK par quantification de l'AK libérée

Figure représentant les pourcentages moyens \pm SEM de lyse spécifique des cellules cibles incubées pendant 24 heures avec les cellules NK à différents ratios E/C et établis sur n= 6 lignées de NK.

En rose clair, valeurs moyennes obtenues au ratio 1:1, en rouge au ratio 5:1 et en rouge foncé au ratio 10:1. (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ par rapport à K562 en bleu, à DAOY en noir, entre D283 et D341 en gris)

F. Test de coculture

Le test de coculture a été réalisé afin de vérifier si le phénotype des cellules NK évolue lors d'un contact prolongé avec les cellules tumorales. L'expression de 4 récepteurs a été quantifiée après 4, 24 et 48h d'incubation : 2 récepteurs activateurs DNAM1 et NKG2D et 2 récepteurs inhibiteurs KIR2DL1 et KIR2DL5. L'expression du récepteur DNAM-1 augmente régulièrement en présence des lignées D283 et D341 et est respectivement 2,8 fois et 3,1 fois plus intense à 48h qu'à 4h. En présence de la lignée DAOY le récepteur est 19,3 fois plus exprimé à 24h qu'à 4h. Pour le récepteur NKG2D, son maximum d'expression est atteint à 48h, où il est respectivement 1,4 fois, 1.8 fois, et 1,5 fois plus exprimé qu'à 4h lors de la coculture avec les lignées DAOY, D283 et D341. Concernant les récepteurs inhibiteurs, leur expression évoluent peu voire diminuent au cours des 48h de coculture. Ainsi entre 4h et 48h d'incubation, KIR2DL1 est exprimé respectivement 1,4 fois moins, 1,2 fois plus et à ratio égal en présence des lignées DAOY, D283 et D341, alors que KIR2DL5 est exprimé respectivement 1,2 fois plus en présence de la lignée DAOY, et 1,1 fois moins en présence des 2 autres lignées D283 et D341.

Une co-culture de 48h en présence des lignées tumorales semble donc favoriser l'expression des 2 récepteurs activateurs des cellules NK étudiées. (Figure 32)

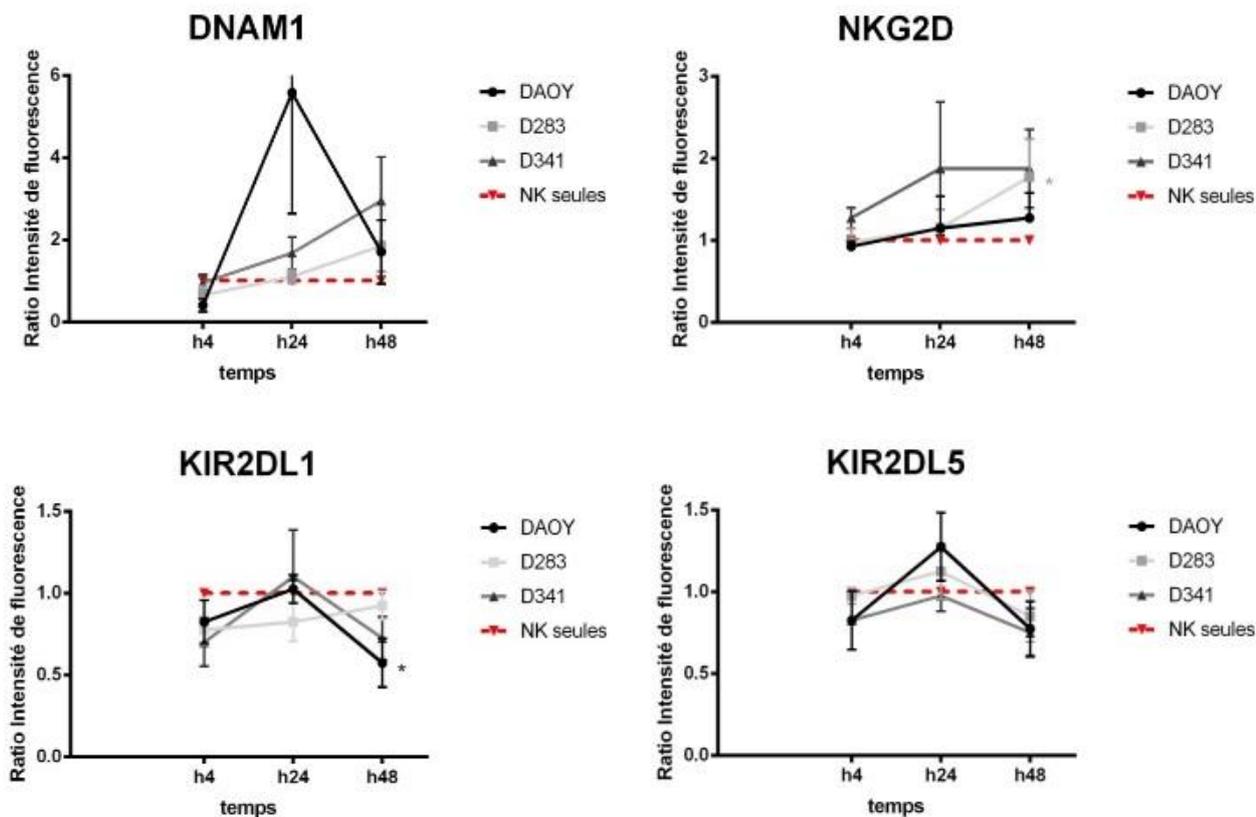


Figure 32 : Evolution de l'expression de différents récepteurs activateurs et inhibiteurs chez les cellules NK pendant 48h de coculture avec les lignées de médulloblastome

Résultats exprimés en ratio d'intensité de fluorescence moyen \pm SEM des cellules NK en présence de cellules cibles (ratio 5:1) par rapport aux cellules NK en culture seules et établis sur n=4 lignées de NK en culture.

En noir, ratios moyens obtenus lors de la coculture avec la lignée DAOY, en gris foncé avec la lignée D341, en gris clair avec la lignée D283 et en rouge lors de la culture des NK seules.

(* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ par rapport à h4)

G. Evaluation de l'impact des manipulations *ex vivo* sur la fonctionnalité des cellules NK

Au cours de notre étude, nous avons également comparé la fonctionnalité des NK ayant subi un traitement *ex vivo* (NK fraîches vs NK en culture vs NK congelées/décongelées).

La finalité de l'étude étant d'utiliser chez l'animal des cellules NK après expansion, c'est la forme qui a été privilégiée pour la réalisation des différents tests. L'avantage majeur des NK en culture est la mise à disposition d'un grand nombre de cellules. Cependant après 3 ou 4 semaines, les cultures ont tendance à s'essouffler. Nous avons donc tenté de les congeler afin de pouvoir les utiliser ultérieurement. Bien qu'en théorie très utile, ce processus a pour conséquence d'induire une forte mortalité cellulaire (rendement moyen après décongélation de $26\% \pm 9$ sur $n=6$ lignées testées).

Pour comparer l'effet des manipulations *ex vivo*, certains tests ont été répétés sur les mêmes lignées fraîches avant culture et/ou après décongélation. La réalisation de tests supplémentaires était surtout liée à la quantité de cellules disponibles (faible pour les NK fraîches) et au principe du test.

a) Test de conjugaison

Des cellules NK en culture ou décongelées ont été utilisées pour ce test et aucune différence significative sur le pourcentage de conjugaison n'a été observée quel que soit le type de NK utilisé. En revanche, une des lignées de NK a été testée avec des cellules fraîches et décongelées (lignée n°13). Pour les 4 types de cellules cancéreuses des pourcentages de conjugaison plus faibles ont été retrouvés lors de l'utilisation de NK fraîches (pourcentage lors de l'utilisation de NK fraîches vs NK décongelées respectivement avec les cellules K562, DAOY, D283, D341 : 6 vs 34%, 5 vs 15%, 2 vs 13%, 2 vs 8%). Les cellules fraîches semblent donc avoir un potentiel de conjugaison inférieur même si ne pouvons réellement tirer de conclusion sur cette comparaison réalisée chez une seule lignée de NK.

b) Test Elispot granzyme B

Pour les résultats de ce test, seules des cellules NK en culture ont été utilisées. La capacité à dégranuler des NK en culture était parfois élevée même en l'absence de stimulation, par conséquent nous n'avons pas souhaité tester avec des NK décongelées. En effet les différentes étapes de la décongélation (écart de température, centrifugation...) auraient pu activer encore plus les cellules NK ce qui aurait induit une réaction faussement positive rendant ininterprétable le test. Une lignée de NK a été testée avec des cellules fraîches et en culture (lignée n°15). Malheureusement il s'agit de la lignée avec laquelle nous avons eu les moins bons résultats puisqu'il n'y avait pas eu de différence significative entre le nombre de SFC pour 1.10^5 NK en présence de cellules D283 ou D341 et en l'absence de stimulation. En revanche on a pu observer une légère augmentation du nombre de SFC lors de l'utilisation des NK en culture par rapport au NK fraîches (57 contre 15 SFC pour 1.10^5 NK).

c) Mesure de la lyse cellulaire

Comme pour le test Elispot, seules les cellules NK en culture ont été utilisées. Le principe de ce test étant basé sur la mesure de la lyse cellulaire, nous n'avons pas souhaité utiliser de NK décongelées chez lesquelles il y aurait eu un pourcentage de mort cellulaire important lié aux cellules NK ce qui aurait faussé les résultats du test.

d) Mesure de la nécrose cellulaire

Ce test consommant peu de cellules, il a pu être facilement réalisé chez l'ensemble des lignées sous les 3 formes.

Le type de cellules NK semble influencer sur leur pouvoir cytotoxique puisque les cellules décongelées induisent significativement plus de nécrose chez les 4 lignées par rapport aux NK fraîches (67% \pm 10 contre 28% \pm 8 pour les K562, 42% \pm 4 contre 26% \pm 4 pour les DAOY, 51% \pm 5 contre 15% \pm 5 pour les D283 et 54% \pm 8 contre 22% \pm 4 pour les D341). On retrouve une cytotoxicité de supériorité variable pour les cellules décongelées par rapport aux cellules en culture et ainsi que pour les cellules en culture par rapport aux cellules fraîches en fonction de la lignée cible (pourcentage de nécrose spécifique pour les cellules NK en culture de 63% \pm 5 pour la lignée K562, 46% \pm 7 pour la lignée DAOY, 31% \pm 4 pour la lignée D283 et 21% \pm 6 pour la lignée D341)(Figure 33).

En conclusion, les cellules NK semblent avoir un potentiel cytotoxique supérieur après expansion en présence d'IL15 par rapport au NK fraîches. Cela peut être lié à une meilleure capacité à se conjuguer aux cellules cibles mais également un plus fort potentiel de dégranulation. La congélation/décongélation semble renforcer le potentiel cytotoxique mais au détriment d'une mauvaise viabilité des cellules NK. (Tableau VIII)

Tableau VIII : Avantages et inconvénients des différentes formes de NK

	NK fraîches	NK en culture avec de l'IL15	NK congelées/décongelées après expansion
Quantité	Faible : quelques millions	Importante : plusieurs dizaine de millions	Importante
Choix du moment d'utilisation	Plus ou moins limité : quelques heure après réception de sang	Limité : après au moins 2 semaines de culture	Très flexible
Viabilité	Plus ou moins limitée : jusqu'à 24h après sélection des CMN	Bonne	Faible
Potentiel cytotoxique	moyen	Bon	Bon

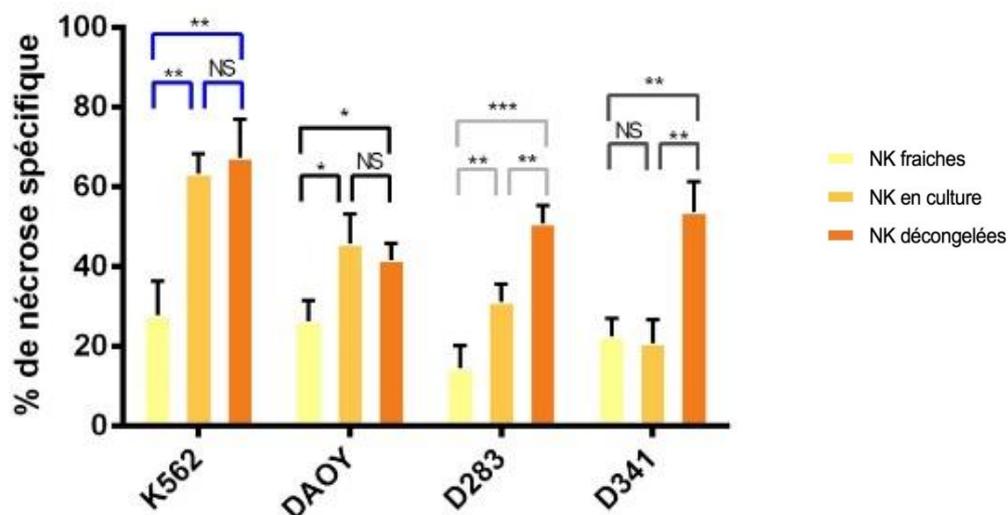


Figure 33 : Evaluation du pourcentage de nécrose spécifique des cellules cibles en présence de cellules NK sous formes fraîches, en culture ou décongelées

Pourcentage moyen \pm SEM de nécrose spécifique par lignées de cellules cibles en fonction du types de NK. En jaune clair, pourcentages moyens obtenus avec des cellules NK fraîches (n=9), en jaune foncé avec des NK après expansion en culture (n=10) et en orange avec des cellules NK décongelées (n=6). (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ par rapport à K562 en bleu, à DAOY en noir, entre D283 et D341 en gris)

V. DISCUSSION

L'ensemble des analyses réalisées *in vitro* a permis de révéler une disparité au niveau du comportement des cellules NK vis-à-vis de leur cible et ce dépendamment de la lignée de médulloblastome étudiée mais également et en fonction du donneur de cellules NK.

Etude phénotypique des cellules de médulloblastome

La première étape de notre étude a été de réaliser une analyse par cytométrie de différents marqueurs pouvant être exprimés à la surface de cellules de médulloblastomes afin d'établir un profil phénotypique de nos lignées. Seule la lignée DAOY a montré une faible expression pour le marqueur B7H3, alors que Castriconi *et al* avait retrouvé une expression moyenne chez les lignées DAOY et D283 (lignée D341 non testée). Ce marqueur est normalement retrouvé chez toutes les lignées de médulloblastome (100% des tumeurs primaires issues de biopsies de patients testées par Castriconi *et al* et Gregorio *et al* étaient positives pour ce marqueurs) et serait corrélé à un pronostic plus sombre chez les patients car cette molécule serait impliquée dans un mécanisme d'échappement tumoral aux cellules NK et LT. (Castriconi *et al.*, 2007) (Gregorio *et al.*, 2008) Cette différence peut être liée au fait que nous avons phénotypé des lignées continues en culture depuis plusieurs semaines et non soumises à la pression d'un environnement immunitaire. Le marqueur CD105 est retrouvé chez nos 3 lignées et le CD73 chez la lignée DAOY uniquement, ce qui est en accord avec l'analyse de Bonfim-Silva *et al* qui a retrouvé ces marqueurs chez 70 à 99% de ses échantillons testés (échantillons composés de lignées continues, de cultures primaires et de tumeurs primaires) (Bonfim-Silva *et al.*, 2013). Concernant les ligands activateurs, PVR, ligand du récepteur DNAM1, a montré une expression moyenne chez nos 3 lignées alors que MICA/B, ligand du récepteur NKG2D, s'est révélé faiblement exprimé uniquement chez la lignée DAOY. L'expression de ces marqueurs semble également varier entre laboratoires puisque Castriconi *et al* ont montré une expression modérée de PVR et l'absence d'expression de MICA/B chez ses 2 lignées DAOY et D283 alors que Fernandez a montré une expression faible de MICA/B chez les lignées D283, D341 et modérée chez la lignée DAOY. (Fernández *et al.*, 2013) D'autres phénotypages de ces lignées en coculture avec des cellules NK pourraient être réalisés afin d'évaluer l'impact de l'environnement sur l'expression de ces marqueurs. En effet, si une incubation prolongée des cellules NK en présence de cellules de médulloblastome est capable de faire varier l'expression de leurs récepteurs activateurs ou inhibiteurs, il n'est pas improbable que l'expression des ligands par les cellules cibles soumises à une pression immunitaire soit également modifiée. De même il est possible que l'expression de ces marqueurs soit influencée par le microenvironnement tumoral *in vivo*.

Etude du pouvoir cytotoxique des cellules NK

Au cours de notre étude, nous avons souhaité étudier les différentes étapes menant à l'effet cytotoxique des cellules NK envers différentes lignées de médulloblastome et de la lignée témoin K562 réputée comme particulièrement sensible. Cet effet cytotoxique final a été évalué par 2 tests : l'un après 4 heures d'incubation évaluant le pourcentage de cellules en phase d'apoptose tardive et de nécrose (test par cytométrie) et le second après 24 heures d'incubation (test mesurant la

libération d'adénylate kinase), évaluant le pourcentage de cellules lysées. Le second test mesurant plus spécifiquement la cytolysse, devait en théorie nous fournir des résultats plus représentatifs de nombre total de cellules détruites. A ratio cellules Effectrices/Cibles égal (5:1), nous avons effectivement retrouvé un pourcentage de mort cellulaire plus élevé avec ce test qu'avec le test en CMF pour les lignées D283 et D341 (respectivement 54% et 77% de lyse spécifique avec le test mesurant l'AK contre 31% et 21% de nécrose spécifique pour les NK en culture avec le test en CMF). En revanche, les pourcentages de mort cellulaire des lignées DAOY et K562 ont été plus élevés avec le test par CMF mesurant la nécrose spécifique (respectivement 46% et 63% de nécrose spécifique avec le test en CMF contre 32% et 40% de lyse spécifique avec le test mesurant l'AK). Nous pensons que les résultats du test mesurant l'AK ont été sous-estimés du fait d'une forte prolifération des cellules DAOY et K562 incubées seules (témoin négatif) durant le test ce qui a pu surestimer le pourcentage de lyse maximale, inversement corrélé au pourcentage de lyse spécifique. Une étude cinétique réalisée avec ce test à différents temps pourrait être intéressante afin de mieux comprendre et interpréter nos résultats.

Une évaluation de la cytotoxicité des NK envers les lignées de médulloblastome avait déjà été rapportées dans deux publications (Castriconi et al., 2007) (Fernández et al., 2013). Fernandez et al ont étudié l'effet cytolytiques induites par des CMN fraîches non triées (le pourcentage de cellules NK était ensuite évalué par technique de cytométrie en flux) stimulées ou non par de l'IL15 (pendant une nuit d'incubation) et en présence ou non de différents anticorps anti-récepteurs ou ligands activateurs/inhibiteurs envers les lignées DAOY et K562 à différents ratios E/C (de 8:1 à 1:1). La mort cellulaire a été évaluée par mesure de la lyse cellulaire par test à europium-TDA (Perkin-Elmer) après 2 heures d'incubation.

Lors de l'utilisation de cellules NK fraîches stimulées par de l'IL15 et sans utilisation d'anticorps, Fernandez *et al* retrouvent des pourcentages de lyse spécifique chez la lignée DAOY de 45%±10, 38%±10, 18%±5 au ratios respectifs de 8:1/4:1/1:1 (pourcentages de lyse pour la lignée K562 non détaillés mais supérieurs) ce qui est légèrement supérieur aux résultats retrouvés avec notre test mesurant la libération d'AK lors d'une incubation plus longue (12 heures contre 2). Cependant, Fernandez *et al* utilisent des CMN non triées ce qui peut entraîner un biais dans les résultats du fait de la présence potentielle de lymphocytes T cytotoxiques parmi les cellules. Castriconi *et al* ont étudié l'effet de cellules NK en culture avec de l'IL-2, en présence ou non de différents anticorps anti-récepteurs ou ligands activateurs/inhibiteurs envers les lignées DAOY et D283 à différents ratios E/C (de 4:1 à 1:1). La mort cellulaire a été évaluée par mesure de la cytolysse par test au Chrome 51 et 4 heures d'incubation. Sans utilisation d'anticorps, Castriconi *et al* retrouvent des pourcentages de lyse de 50% et 44% pour la lignée D283 et 81% et 49% pour la lignée DAOY aux ratios respectifs de 4:1 et 1:1 ce qui est très proche des résultats retrouvés avec notre test mesurant la libération d'AK pour la lignée D283 (respectivement au ratio 5:1 et 1:1 : 54% ± 11, 38% ± 11%) mais supérieurs à ceux retrouvés avec notre lignée DAOY (respectivement au ratio 5:1 et 1:1 : 32% ± 2, 10% ± 3). Cependant les valeurs présentées par Castriconi *et al* correspondent aux résultats d'un

test réalisé qu'une seule fois (n=1) et ne tient donc pas compte de la variabilité que nous avons retrouvé entre les différentes lignées de cellules NK.

Au regard de ces études, la lignée DAOY semble être la plus sensible à la cytotoxicité des cellules NK. L'analyse des différentes étapes menant à cette cytotoxicité tend à expliquer ce constat. En effet lors de l'analyse phénotypique, les cellules DAOY ont montré une plus forte expression des ligands activateurs NKG2D et MICA/B. Lors de l'analyse de la conjugaison, les cellules NK se sont significativement plus conjuguées aux cellules DAOY. Le bon déroulement de ces premières étapes a aussi été confirmé par une plus forte dégranulation des cellules NK évaluée lors du test Elispot Granzyme B.

Cependant même si ces différents tests tendent à montrer une plus grande sensibilité des cellules DAOY à la cytotoxicité des NK, cela reste une tendance générale pas forcément retrouvée lors de l'analyse individuelle de chaque lignée NK. En effet au cours des études de cytotoxicité par CMF, certaines lignées de NK se sont montrées très peu cytotoxiques envers la lignée DAOY alors qu'elles restaient efficaces envers les lignées D283 et D341. Même constat pour la lignée K562 qui s'est parfois montrée moins sensible que d'autres lignées de médulloblastome aux cellules NK. Il serait alors intéressant par la suite d'analyser l'expression d'un panel plus élargi de ligands/récepteurs activateurs/inhibiteurs sur les lignées de cellules NK et de médulloblastome. Castriconi *et al* et Fernandez *et al* ont recherché d'autres marqueurs notamment les molécules du CMH de classe 1 qui se fixent sur les récepteurs inhibiteurs des NK afin d'empêcher leur activation. Ils ont ainsi montré que la lignée DAOY exprimait fortement les molécules CMH de classe 1 alors que la lignée D283 les exprime faiblement, ce qui devrait conférer en théorie à la lignée DAOY une plus grande résistance aux cellules NK. Cependant cela ne tient pas compte du polymorphisme antigénique des molécules CMH de classe 1, et donc de l'histocompatibilité entre les 2 types de cellules qui doit être théoriquement la plus faible possible pour garantir une activation optimale des cellules NK. D'ailleurs dans l'étude de Castriconi *et al*, le blocage des molécules de CMH de classe 1 des cellules de médulloblastome ne semble pas beaucoup diminuer l'effet cytotoxique des cellules NK. Cela pourrait s'expliquer par une faible histocompatibilité entre les 2 types de cellules et donc un faible signal inhibiteur de base induit par les molécules CMH de classe 1 envers les cellules NK. Dans leurs études, Velardi *et al* et Ruggeri *et al* montrent d'ailleurs l'importance de l'allogénicité et de l'incompatibilité (« mismatch ») antigéniques des molécules CMH entre les cellules NK du donneur et les cellules de patients atteints de leucémie afin de garantir le succès d'un traitement par cellules NK allogéniques. (Velardi *et al.*, 2002) (Ruggeri *et al.*, 2002) Une analyse antigénique pourrait donc être intéressante afin de prédire l'effet cytotoxique des NK sur les cellules de médulloblastome d'un patient à l'autre.

Effet des manipulations *ex vivo* sur les cellules NK

Enfin nous avons souhaité évaluer l'effet de manipulations *ex vivo* sur la cytotoxicité des cellules NK (utilisées fraîches après un maximum de 24 heures d'incubation en présence d'IL-15, en expansion plusieurs semaines en présence de IL-15, après congélation/décongélation puis incubation en présence d'IL-15). Selon Mata *et al* (Mata et al., 2014) et Miller *et al* (Miller et al., 2014), la congélation des cellules NK ne semblent pas avoir d'impact sur leur capacité à lyser des cellules cibles (K562) à condition qu'elles soient incubées une nuit en présence d'interleukine (IL-2 ou IL-15) après décongélation. Miller *et al* montrent également que les cellules NK expansées en présence d'interleukine (IL-2 ou IL-15) sont plus cytotoxiques que les cellules fraîches activées une nuit avec de l'interleukine. En revanche l'expansion *ex vivo* ne semble pas avoir d'impact sur la persistance *in vivo* chez la souris après réinjection. Néanmoins l'injection régulière d'IL-15 chez l'animal semble favoriser la persistance des NK *in vivo*. Nos résultats ont montré une tendance des cellules NK à être plus cytotoxiques lorsqu'elles sont en culture avec de IL-15 par rapport aux NK fraîches comme le suggère Miller *et al*. Plus étonnement la congélation semble améliorer encore plus leur cytotoxicité, cependant cette étape a également pour conséquence une forte mortalité cellulaire (rendement moyen après décongélation de 26% ± 9) ce qui rend la technique de congélation difficilement applicable en l'état pour un usage thérapeutique. L'expansion de cellules NK en milieu de culture et en présence d'IL15 semblent donc être un bon compromis pour l'obtention d'un nombre conséquent de cellules NK et douées d'un bon potentiel cytotoxique.

VI. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Les tumeurs primitives cérébrales, bien que rares, font partie des tumeurs de plus mauvais pronostic. Du fait de leur localisation, elles sont particulièrement difficiles à traiter par les moyens thérapeutiques conventionnels. Les chercheurs et les médecins s'intéressent de plus en plus à l'utilisation de traitements plus ciblés parmi lesquels l'immunothérapie prend une place grandissante.

Cette approche visant à stimuler ou moduler le système immunitaire afin de favoriser la destruction des cellules cancéreuses s'est particulièrement développée au cours de ces dernières années, notamment avec la découverte des CAR T cell. Ces lymphocytes T, génétiquement modifiés pour reconnaître un antigène spécifique sont très efficaces en particulier dans le traitement des leucémies aiguës lymphoblastiques et des lymphomes par ciblage de l'antigène CD19. Cependant, la production de CAR T cell autologues pour un patient donné est contraignante et coûteuse, et l'utilisation de CAR T cell allogéniques se heurtent au risque d'induire une réaction du greffon contre l'hôte (GvHD) chez le patient. L'un des avantages des cellules CAR NK allogéniques est qu'elles n'induisent pas de GvHD, La création de banque de CAR NK pour une utilisation immédiate, pour n'importe quel patient serait donc possible.

De nombreux auteurs se sont intéressés à l'utilisation de cellules NK dans le traitement du plus agressif des cancers cérébraux: le glioblastome. Les essais cliniques sur l'utilisation de LAK ou cellules NK injectées en intracérébral ont prouvé que la méthode était sûre, et les études précliniques sur l'utilisation de NK CAR ont montré des résultats plutôt positifs compte tenu de l'agressivité de ce type de tumeur.

Cependant, peu d'étude se sont intéressées à l'utilisation des cellules NK comme traitement du médulloblastome. En 2018, un projet de recherche dirigé par le Professeur V. Decot en collaboration avec le Docteur C. Boura a donc été initié afin d'évaluer le potentiel cytotoxique des cellules NK envers le médulloblastome. Le but de mon travail a été d'étudier les interactions entre ces deux types cellules *in vitro*. Cela a permis de montrer que les cellules NK exerçaient un pouvoir cytotoxique envers les 3 lignées de médulloblastome testées. Une étude précise des molécules du CMH de classe 1 des différentes cellules pourrait nous aider par la suite à prédire la cytotoxicité des cellules NK envers les lignées de médulloblastomes voir de screener des donneurs afin de trouver la meilleure lignée de NK pour une cible donnée.

A la suite de ce travail, des études *in vivo* ont été réalisées chez la souris afin de mieux appréhender le comportement de nos cellules NK dans un organisme vivant. Une étude de survie évaluant la capacité des cellules NK à atteindre et détruire une tumeur est actuellement en cours et semble mettre en évidence un avantage pour les souris traitées.

BIBLIOGRAPHIE

- Adam, C., and Mokhtari, K. (2010). Tumeurs du système nerveux central. Classifications histologiques et topographiques, épidémiologie. Em-Prem.
- Ah-Pine, F., and Rousseau, A. (2018). Tumeurs primitives du système nerveux central - Classifications histologique et topographique, et épidémiologie. Em-Prem.
- Ameri, A., and Poisson, M. (2009). Chimiothérapie des tumeurs cérébrales primitives malignes.
- Ames, E., Canter, R.J., Grossenbacher, S.K., Mac, S., Chen, M., Smith, R.C., Hagino, T., Perez-Cunningham, J., Sckisel, G.D., Urayama, S., et al. (2015). NK Cells Preferentially Target Tumor Cells with a Cancer Stem Cell Phenotype. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 195, 4010–4019.
- Avril, T., Vauleon, E., Hamlat, A., Saikali, S., Etcheverry, A., Delmas, C., Diabira, S., Mosser, J., and Quillien, V. (2012). Human glioblastoma stem-like cells are more sensitive to allogeneic NK and T cell-mediated killing compared with serum-cultured glioblastoma cells. *Brain Pathol. Zurich Switz.* 22, 159–174.
- Barba, D., Saris, S.C., Holder, C., Rosenberg, S.A., and Oldfield, E.H. (1989). Intratumoral LAK cell and interleukin-2 therapy of human gliomas. *J. Neurosurg.* 70, 175–182.
- Barrow, A.D., Edeling, M.A., Trifonov, V., Luo, J., Goyal, P., Bohl, B., Bando, J.K., Kim, A.H., Walker, J., Andahazy, M., et al. (2018a). Natural Killer Cells Control Tumor Growth by Sensing a Growth Factor. *Cell* 172, 534-548.e19.
- Barrow, A.D., Edeling, M.A., Trifonov, V., Luo, J., Goyal, P., Bohl, B., Bando, J.K., Kim, A.H., Walker, J., Andahazy, M., et al. (2018b). Natural Killer Cells Control Tumor Growth by Sensing a Growth Factor. *Cell* 172, 534-548.e19.
- Benabbou, N. (2012). Implication de l'Insulin-like Growth Factor (IGF-I), secrété par le microenvironnement tumoral, dans la survie et la chimiorésistance des cellules cancéreuses. phdthesis. Université Paris Sud - Paris XI.
- Bonfim-Silva, R., Pimentel, T.V., Valera, E.T., Scrideli, C.A., Ramalho, F.S., Machado, H.R., Covas, D.T., and Fontes, A.M. (2013). Gene expression profile of long non-coding RNA EVF-2 in medulloblastoma cell lines and tissue samples. *BMC Proc.* 7, P61.
- Brandes, A.A., Bartolotti, M., Marucci, G., Ghimenton, C., Agati, R., Fioravanti, A., Mascarini, M., Volpin, L., Ammannati, F., Masotto, B., et al. (2015). New perspectives in the treatment of adult medulloblastoma in the era of molecular oncology. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 94, 348–359.
- Castriconi, R., Dondero, A., Negri, F., Bellora, F., Nozza, P., Carnemolla, B., Raso, A., Moretta, L., Moretta, A., and Bottino, C. (2007). Both CD133+ and CD133– medulloblastoma cell lines express ligands for triggering NK receptors and are susceptible to NK-mediated cytotoxicity. *Eur. J. Immunol.* 37, 3190–3196.
- Castriconi, R., Daga, A., Dondero, A., Zona, G., Poliani, P.L., Melotti, A., Griffero, F., Marubbi, D., Spaziante, R., Bellora, F., et al. (2009). NK Cells Recognize and Kill Human Glioblastoma Cells with Stem Cell-Like Properties. *J. Immunol.* 182, 3530–3539.
- Chen, C., Ai, Q.-D., Chu, S.-F., Zhang, Z., and Chen, N.-H. (2019). NK cells in cerebral ischemia. *Biomed. Pharmacother. Biomedecine Pharmacother.* 109, 547–554.
- Cheng, M., Chen, Y., Xiao, W., Sun, R., and Tian, Z. (2013). NK cell-based immunotherapy for malignant diseases. *Cell. Mol. Immunol.* 10, 230–252.

Crawford, J.R., MacDonald, T.J., and Packer, R.J. (2007). Medulloblastoma in childhood: new biological advances. *Lancet Neurol.* 6, 1073–1085.

Creative Diagnostics ® Perforin/Granzyme Apoptosis Pathway.

Curti, A., Ruggeri, L., D'Addio, A., Bontadini, A., Dan, E., Motta, M.R., Trabanelli, S., Giudice, V., Urbani, E., Martinelli, G., et al. (2011). Successful transfer of alloreactive haploidentical KIR ligand-mismatched natural killer cells after infusion in elderly high risk acute myeloid leukemia patients. *Blood* 118, 3273–3279.

Dalod, M., and Tomasello, E. (2004). Fonctions antivirales des cellules natural killer : rôle physiologique, mécanismes moléculaires et perspectives thérapeutiques. *Virologie* 8, 53–64.

Decot, V., Voillard, L., Latger-Cannard, V., Aissi-Rothé, L., Perrier, P., Stoltz, J.F., and Bensoussan, D. (2010). Natural-killer cell amplification for adoptive leukemia relapse immunotherapy: Comparison of three cytokines, IL-2, IL-15, or IL-7 and impact on NKG2D, KIR2DL1, and KIR2DL2 expression. *Exp. Hematol.* 38, 351–362.

Dillman, R.O., Duma, C.M., Schiltz, P.M., DePriest, C., Ellis, R.A., Okamoto, K., Beutel, L.D., De Leon, C., and Chico, S. (2004). Intracavitary placement of autologous lymphokine-activated killer (LAK) cells after resection of recurrent glioblastoma. *J. Immunother. Hagerstown Md* 1997 27, 398–404.

Dillman, R.O., Duma, C.M., Ellis, R.A., Cornforth, A.N., Schiltz, P.M., Sharp, S.L., and DePriest, M.C. (2009). Intralesional lymphokine-activated killer cells as adjuvant therapy for primary glioblastoma. *J. Immunother. Hagerstown Md* 1997 32, 914–919.

Dorothee, G., Thiery, J., Abouzahr, S., Richon, C., and Chouaib, S. (2004). Les cellules tueuses : voies lytiques et régulation. *Hématologie* 10, 355–364.

Fernández, L., Portugal, R., Valentín, J., Martín, R., Maxwell, H., González-Vicent, M., Díaz, MA., de Prada, I., and Pérez-Martínez, A. (2013). In vitro Natural Killer Cell Immunotherapy for Medulloblastoma. *Front. Oncol.* 3.

Fortin, D. (2004). La barrière hémato-encéphalique : un facteur clé en Neuro-oncologie. *Rev. Neurol. (Paris)* 160, 523–532.

Fujisaki, H., Kakuda, H., Shimasaki, N., Imai, C., Ma, J., Lockey, T., Eldridge, P., Leung, W.H., and Campana, D. (2009). Expansion of Highly Cytotoxic Human Natural Killer Cells for Cancer Cell Therapy. *Cancer Res.* 69, 4010–4017.

Genßler, S., Burger, M.C., Zhang, C., Oelsner, S., Mildenerger, I., Wagner, M., Steinbach, J.P., and Wels, W.S. (2016). Dual targeting of glioblastoma with chimeric antigen receptor-engineered natural killer cells overcomes heterogeneity of target antigen expression and enhances antitumor activity and survival. *Oncoimmunology* 5, e1119354.

Golán, I., Rodríguez de la Fuente, L., and Costoya, J.A. (2018). NK Cell-Based Glioblastoma Immunotherapy. *Cancers* 10.

Gregorio, A., Corrias, M.V., Castriconi, R., Dondero, A., Mosconi, M., Gambini, C., Moretta, A., Moretta, L., and Bottino, C. (2008). Small round blue cell tumours: diagnostic and prognostic usefulness of the expression of B7-H3 surface molecule. *Histopathology* 53, 73–80.

Guidelines ANOCEF (2016). Référentiel «Médulloblastome de l'adulte».

Hartmann, J., Schüßler-Lenz, M., Bondanza, A., and Buchholz, C.J. (2017). Clinical development of CAR T cells—challenges and opportunities in translating innovative treatment concepts. *EMBO Mol. Med.* 9, 1183–1197.

- Hayes, R.L., Koslow, M., Hiesiger, E.M., Hymes, K.B., Hochster, H.S., Moore, E.J., Pierz, D.M., Chen, D.K., Budzilovich, G.N., and Ransohoff, J. (1995). Improved long term survival after intracavitary interleukin-2 and lymphokine-activated killer cells for adults with recurrent malignant glioma. *Cancer* 76, 840–852.
- Höring, E., Podlech, O., Silkenstedt, B., Rota, I.A., Adamopoulou, E., and Naumann, U. (2013). The Histone Deacetylase Inhibitor Trichostatin A Promotes Apoptosis and Antitumor Immunity in Glioblastoma Cells. *Anticancer Res.* 33, 1351–1360.
- Hu, Y., Tian, Z., and Zhang, C. (2017). Chimeric antigen receptor (CAR)-transduced natural killer cells in tumor immunotherapy. *Acta Pharmacol. Sin.*
- Hubert, P. (2006). Les facteurs de croissance de la famille de l'EGF et leurs récepteurs. 8.
- Ishikawa, E., Tsuboi, K., Saijo, K., Harada, H., Takano, S., Nose, T., and Ohno, T. (2004). Autologous Natural Killer Cell Therapy for Human Recurrent Malignant Glioma. *Anticancer Res.* 24, 1861–1871.
- Ivanov, D.P., Coyle, B., Walker, D.A., and Grabowska, A.M. (2016). In vitro models of medulloblastoma: Choosing the right tool for the job. *J. Biotechnol.* 236, 10–25.
- Jacobs, S.K., Wilson, D.J., Kornblith, P.L., and Grimm, E.A. (1986). Interleukin-2 or Autologous Lymphokine-activated Killer Cell Treatment of Malignant Glioma: Phase I Trial. *Cancer Res.* 46, 2101–2104.
- Janeway, C.A., and Murphy, K. (2018). *Immunobiologie de Janeway (De Boeck Supérieur)*.
- Kaur, K., Nanut, M.P., Ko, M.-W., Safaie, T., Kos, J., and Jewett, A. (2018). Natural killer cells target and differentiate cancer stem-like cells/undifferentiated tumors: strategies to optimize their growth and expansion for effective cancer immunotherapy. *Curr. Opin. Immunol.* 51, 170–180.
- Kennis, B.A., Michel, K.A., Brugmann, W.B., Laureano, A., Tao, R.-H., Somanchi, S.S., Einstein, S.A., Bravo-Alegria, J.B., Maegawa, S., Wabha, A., et al. (2019). Monitoring of intracerebellarly-administered natural killer cells with fluorine-19 MRI. *J. Neurooncol.*
- Klein, O., Chastagner, P., Pretat, PH., Chastagner, V., Joud, A., and Marchal, JC. (2015). *Médulloblastomes de l'enfant - L'encyclopédie neurochirurgicale*.
- Klingemann, H., Boissel, L., and Toneguzzo, F. (2016). Natural Killer Cells for Immunotherapy – Advantages of the NK-92 Cell Line over Blood NK Cells. *Front. Immunol.* 7.
- Kmiecik, J., Zimmer, J., and Chekenya, M. (2014). Natural killer cells in intracranial neoplasms: presence and therapeutic efficacy against brain tumours. *J. Neurooncol.* 116, 1–9.
- Kruse, P.H., Matta, J., Ugolini, S., and Vivier, E. (2014). Natural cytotoxicity receptors and their ligands. *Immunol. Cell Biol.* 92, 221–229.
- Kumar, V., Kumar, V., McGuire, T., Coulter, D.W., Sharp, J.G., and Mahato, R.I. (2017). Challenges and Recent Advances in Medulloblastoma Therapy. *Trends Pharmacol. Sci.* 38, 1061–1084.
- Lenting, K., Verhaak, R., ter Laan, M., Wesseling, P., and Leenders, W. (2017). Glioma: experimental models and reality. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 133, 263–282.
- Li, K.K.-W., Lau, K.-M., and Ng, H.-K. (2013). Signaling pathway and molecular subgroups of medulloblastoma. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 6, 1211–1222.
- Lillehei, K.O., Mitchell, D.H., Johnson, S.D., McCleary, E.L., and Kruse, C.A. (1991). Long-term follow-up of patients with recurrent malignant gliomas treated with adjuvant adoptive immunotherapy. *Neurosurgery* 28, 16–23.

- Loiseau, H., Huchet, A., and Baldi, I. (2010). Épidémiologie des tumeurs cérébrales primitives. *Neurologie.Com* 2, 83–86.
- Louis, D.N., Perry, A., Reifenberger, G., Deimling, A. von, Figarella-Branger, D., Cavenee, W.K., Ohgaki, H., Wiestler, O.D., Kleihues, P., and Ellison, D.W. (2016). The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 131, 803–820.
- Lozzio, B.B., and Lozzio, C.B. (1979). Properties and usefulness of the original K-562 human myelogenous leukemia cell line. *Leuk. Res.* 3, 363–370.
- Luna, J.I., Grossenbacher, S.K., Murphy, W.J., and Canter, R.J. (2017). Natural Killer Cell Immunotherapy Targeting Cancer Stem Cells. *Expert Opin. Biol. Ther.* 17, 313–324.
- Mata, M.M., Mahmood, F., Sowell, R.T., and Baum, L.L. (2014). Effects of cryopreservation on effector cells for antibody dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC) and natural killer (NK) cell activity in ⁵¹Cr-release and CD107a assays. *J. Immunol. Methods* 406, 1–9.
- Mazeau-Woynar, V., and Cerf, N. (2010). *Survie attendue des patients atteints de cancers en France : état des lieux.* | Base documentaire | BDSP.
- Mehta, R.S., and Rezvani, K. (2018). Chimeric Antigen Receptor Expressing Natural Killer Cells for the Immunotherapy of Cancer. *Front. Immunol.* 9.
- Merchant, R.E., Merchant, L.H., Cook, S.H., McVicar, D.W., and Young, H.F. (1988). Intralesional infusion of lymphokine-activated killer (LAK) cells and recombinant interleukin-2 (rIL-2) for the treatment of patients with malignant brain tumor. *Neurosurgery* 23, 725–732.
- Miller, J.S. (2005). Successful adoptive transfer and in vivo expansion of human haploidentical NK cells in patients with cancer. *Blood* 105, 3051–3057.
- Miller, J.S., Rooney, C.M., Curtsinger, J., McElmurry, R., McCullar, V., Verneris, M.R., Lapteva, N., McKenna, D., Wagner, J.E., Blazar, B.R., et al. (2014). Expansion and homing of adoptively transferred human natural killer cells in immunodeficient mice varies with product preparation and in vivo cytokine administration: implications for clinical therapy. *Biol. Blood Marrow Transplant. J. Am. Soc. Blood Marrow Transplant.* 20, 1252–1257.
- Müller, N., Michen, S., Tietze, S., Töpfer, K., Schulte, A., Lamszus, K., Schmitz, M., Schackert, G., Pastan, I., and Temme, A. (2015). Engineering NK Cells Modified With an EGFRvIII-specific Chimeric Antigen Receptor to Overexpress CXCR4 Improves Immunotherapy of CXCL12/SDF-1 α -secreting Glioblastoma. *J. Immunother. Hagerstown Md* 1997 38, 197–210.
- Murakami, T., Nakazawa, T., Natsume, A., Nishimura, F., Nakamura, M., Matsuda, R., Omoto, K., Tanaka, Y., Shida, Y., Park, Y.-S., et al. (2018). Novel Human NK Cell Line Carrying CAR Targeting EGFRvIII Induces Antitumor Effects in Glioblastoma Cells. *Anticancer Res.* 38, 5049–5056.
- Neglia, J., Robinson, L., Stovall, M., and Liu, Y. New primary neoplasms of the central nervous system in survivors of childhood cancer: a report from the Childhood Cancer Survivor Study. - PubMed - NCBI.
- Nicholson, S.E., Keating, N., and Belz, G.T. (2017). Natural killer cells and anti-tumor immunity. *Mol. Immunol.*
- Northcott, P.A., Korshunov, A., Pfister, S.M., and Taylor, M.D. (2012a). The clinical implications of medulloblastoma subgroups. *Nat. Rev. Neurol.* 8, 340–351.
- Northcott, P.A., Shih, D.J.H., Remke, M., Cho, Y.-J., Kool, M., Hawkins, C., Eberhart, C.G., Dubuc, A., Guettouche, T., Cardentey, Y., et al. (2012b). Rapid, reliable, and reproducible molecular sub-grouping of clinical medulloblastoma samples. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 123, 615–626.

- Nowakowska, P., Romanski, A., Miller, N., Odendahl, M., Bonig, H., Zhang, C., Seifried, E., Wels, W.S., and Tonn, T. (2018). Clinical grade manufacturing of genetically modified, CAR-expressing NK-92 cells for the treatment of ErbB2-positive malignancies. *Cancer Immunol. Immunother. CII* 67, 25–38.
- Okamoto, Y., Shimizu, K., Tamura, K., Miyao, Y., Yamada, M., Matsui, Y., Tsuda, N., Takimoto, H., Hayakawa, T., and Mogami, H. (1988). An adoptive immunotherapy of patients with medulloblastoma by lymphokine-activated killer cells (LAK). *Acta Neurochir. (Wien)* 94, 47–52.
- Orange, J.S. (2008). Formation and function of the lytic NK-cell immunological synapse. *Nat. Rev. Immunol.* 8, 713–725.
- Ostrom, Q.T., Gittleman, H., Liao, P., Rouse, C., Chen, Y., Dowling, J., Wolinsky, Y., Kruchko, C., and Barnholtz-Sloan, J. (2014). CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2007–2011. *Neuro-Oncol.* 16, iv1–iv63.
- Pages, and Ladoire (2018). Immunothérapie : les différentes stratégies | Fondation ARC pour la recherche sur le cancer.
- Pang, L.Y., Saunders, L., and Argyle, D.J. (2017). Epidermal growth factor receptor activity is elevated in glioma cancer stem cells and is required to maintain chemotherapy and radiation resistance. *Oncotarget* 8, 72494–72512.
- Peris-Bonet, R., Martínez-García, C., Lacour, B., Petrovich, S., Giner-Ripoll, B., Navajas, A., and Steliarova-Foucher, E. (2006). Childhood central nervous system tumours – incidence and survival in Europe (1978–1997): Report from Automated Childhood Cancer Information System project. *Eur. J. Cancer* 42, 2064–2080.
- Qu, Y., and Bi, J.Z. (2018). Killing effect of Robo1 targeted Chimeric Antigen Receptor modified NK92 cells against glioma and neuroblastoma cells. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 98, 860–866.
- Richard, S., SELLE, F., Lotz, jean-pierre, Khalil, A., Gligorov, J., and Grazziotin-Soares, D. (2016). Pertuzumab and trastuzumab: The rationale way to synergy. *An. Acad. Bras. Ciênc.* 88.
- Rosenberg, S.A., Lotze, M.T., Muul, L.M., Leitman, S., Chang, A.E., Ettinghausen, S.E., Matory, Y.L., Skibber, J.M., Shiloni, E., and Vetto, J.T. (1985). Observations on the systemic administration of autologous lymphokine-activated killer cells and recombinant interleukin-2 to patients with metastatic cancer. *N. Engl. J. Med.* 313, 1485–1492.
- Ruggeri, L., Capanni, M., Urbani, E., Perruccio, K., Shlomchik, W.D., Tosti, A., Posati, S., Rogaia, D., Frassoni, F., Aversa, F., et al. (2002). Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants. *Science* 295, 2097–2100.
- Ruggeri, L., Mancusi, A., Perruccio, K., Burchielli, E., Martelli, M.F., and Velardi, A. (2005). Natural killer cell alloreactivity for leukemia therapy. *J. Immunother. Hagerstown Md* 1997 28, 175–182.
- Schwalbe, E.C., Lindsey, J.C., Nakjang, S., Crosier, S., Smith, A.J., Hicks, D., Rafiee, G., Hill, R.M., Iliasova, A., Stone, T., et al. (2017). Novel molecular subgroups for clinical classification and outcome prediction in childhood medulloblastoma: a cohort study. *Lancet Oncol.* 18, 958–971.
- Seva, C. (2001). La bêta-caténine : un acteur clé dans le développement des cancers colorectaux. *Hépatogastro Oncol. Dig.* 8, 149–154.
- Sharma, T., Schwalbe, E.C., Williamson, D., Sill, M., Hovestadt, V., Mynarek, M., Rutkowski, S., Robinson, G.W., Gajjar, A., Cavalli, F., et al. (2019). Second-generation molecular subgrouping of medulloblastoma: an international meta-analysis of Group 3 and Group 4 subtypes. *Acta Neuropathol. (Berl.)*

- Shih, D.J.H., Northcott, P.A., Remke, M., Korshunov, A., Ramaswamy, V., Kool, M., Luu, B., Yao, Y., Wang, X., Dubuc, A.M., et al. (2014). Cytogenetic prognostication within medulloblastoma subgroups. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* *32*, 886–896.
- Shimizu, K., Tamura, K., Yamada, M., Okamoto, Y., Miyao, Y., Park, K., Matsui, Y., Hayakawa, T., Takimoto, H., and Mogami, H. (1989). Adoptive immunotherapy in patients with medulloblastoma by LAK cells. *No To Shinkei* *41*, 991–995.
- Smith, C., Santi, M., Rajan, B., Rushing, E.J., Choi, M.R., Rood, B.R., Cornelison, R., MacDonald, T.J., and Vukmanovic, S. (2009). A novel role of HLA class I in the pathology of medulloblastoma. *J. Transl. Med.* *7*, 59.
- Smoll, N.R., and Drummond, K.J. (2012). The incidence of medulloblastomas and primitive neuroectodermal tumours in adults and children. *J. Clin. Neurosci.* *19*, 1541–1544.
- Stevens, A., Klöter, I., and Roggendorf, W. (1988). Inflammatory infiltrates and natural killer cell presence in human brain tumors. *Cancer* *61*, 738–743.
- Stevens, M.C.G., Cameron, A.H., Muir, K.R., Parkes, S.E., Reid, H., and Whitwell, H. (1991). Descriptive epidemiology of primary central nervous system tumours in children: A population-based study. *Clin. Oncol.* *3*, 323–329.
- Suck, G., Odendahl, M., Nowakowska, P., Seidl, C., Wels, W.S., Klingemann, H.G., and Tonn, T. (2016). NK-92: an ‘off-the-shelf therapeutic’ for adoptive natural killer cell-based cancer immunotherapy. *Cancer Immunol. Immunother.* *65*, 485–492.
- Taillandier, L., Blonski, M., Carrie, C., Bernier, V., Bonnetain, F., Bourdeaut, F., Thomas, I.-C., Chastagner, P., Dhermain, F., Doz, F., et al. (2011). Les médulloblastomes : revue générale. *Rev. Neurol. (Paris)* *167*, 431–448.
- Taylor, M.D., Northcott, P.A., Korshunov, A., Remke, M., Cho, Y.-J., Clifford, S.C., Eberhart, C.G., Parsons, D.W., Rutkowski, S., Gajjar, A., et al. (2012). Molecular subgroups of medulloblastoma: the current consensus. *Acta Neuropathol. (Berl.)* *123*, 465–472.
- Tonn, T., Schwabe, D., Klingemann, H.G., Becker, S., Esser, R., Koehl, U., Suttorp, M., Seifried, E., Ottmann, O.G., and Bug, G. (2013). Treatment of patients with advanced cancer with the natural killer cell line NK-92. *Cytotherapy* *15*, 1563–1570.
- Velardi, A., Ruggeri, L., Alessandro, Moretta, and Moretta, L. (2002). NK cells: a lesson from mismatched hematopoietic transplantation. *Trends Immunol.* *23*, 438–444.
- Wagner, J.A., Rosario, M., Romee, R., Berrien-Elliott, M.M., Schneider, S.E., Leong, J.W., Sullivan, R.P., Jewell, B.A., Becker-Hapak, M., Schappe, T., et al. (2017). CD56bright NK cells exhibit potent antitumor responses following IL-15 priming. *J. Clin. Invest.* *127*, 4042–4058.
- Watson, S., Serrate, C., and Vignot, S. (2010). Voie de signalisation Sonic Hedgehog : du développement embryonnaire aux thérapies moléculaires ciblées. *Bull. Cancer (Paris)* *97*, 1477–1483.
- Wicha, M.S., Liu, S., and Dontu, G. (2006). Cancer stem cells : An old idea - A paradigm shift. *Cancer Res.* *66*, 1883–1890; discussion 1895-1896.
- Wu, X., Northcott, P.A., Croul, S., and Taylor, M.D. (2011). Mouse models of medulloblastoma. *Chin. J. Cancer* *30*, 442–449.
- Yvon, E.S., Burga, R., Powell, A., Cruz, C.R., Fernandes, R., Barese, C., Nguyen, T., Abdel-Baki, M.S., and Bollard, C.M. (2017). Cord blood natural killer cells expressing a dominant negative TGF- β receptor: Implications for adoptive immunotherapy for glioblastoma. *Cytotherapy* *19*, 408–418.

- Zhu, L., Kalimuthu, S., Gangadaran, P., Oh, J.M., Lee, H.W., Baek, S.H., Jeong, S.Y., Lee, S.-W., Lee, J., and Ahn, B.-C. (2017). Exosomes Derived From Natural Killer Cells Exert Therapeutic Effect in Melanoma. *Theranostics* 7, 2732–2745.
- Zhu, L., Oh, J.M., Gangadaran, P., Kalimuthu, S., Baek, S.H., Jeong, S.Y., Lee, S.-W., Lee, J., and Ahn, B.-C. (2018a). Targeting and Therapy of Glioblastoma in a Mouse Model Using Exosomes Derived From Natural Killer Cells. *Front. Immunol.* 9, 824.
- Zhu, L., Gangadaran, P., Kalimuthu, S., Oh, J.M., Baek, S.H., Jeong, S.Y., Lee, S.-W., Lee, J., and Ahn, B.-C. (2018b). Novel alternatives to extracellular vesicle-based immunotherapy - exosome mimetics derived from natural killer cells. *Artif. Cells Nanomedicine Biotechnol.* 46, S166–S179.
- Zhu, L., Kalimuthu, S., Oh, J.M., Gangadaran, P., Baek, S.H., Jeong, S.Y., Lee, S.-W., Lee, J., and Ahn, B.-C. (2019). Enhancement of antitumor potency of extracellular vesicles derived from natural killer cells by IL-15 priming. *Biomaterials* 190–191, 38–50.
- Zhuang, X., Xiang, X., Grizzle, W., Sun, D., Zhang, S., Axtell, R.C., Ju, S., Mu, J., Zhang, L., Steinman, L., et al. (2011). Treatment of Brain Inflammatory Diseases by Delivering Exosome Encapsulated Anti-inflammatory Drugs From the Nasal Region to the Brain. *Mol. Ther.* 19, 1769–1779.
- Zhukova, N., Ramaswamy, V., Remke, M., Pfaff, E., Shih, D.J.H., Martin, D.C., Castelo-Branco, P., Baskin, B., Ray, P.N., Bouffet, E., et al. (2013). Subgroup-Specific Prognostic Implications of TP53 Mutation in Medulloblastoma. *J. Clin. Oncol.* 31, 2927–2935.
- Zitvogel, L., Hannani, D., and François, M. (2015). Immunothérapie des cancers au troisième millénaire (EDP Sciences).

ANNEXES

ANNEXE 1 : PROTOCOLE DETAILLE DE L'ISOLEMENT DES CELLULES NK

Des poches d'environ 300ml de sang anti-coagulé ont été collectées auprès de donneurs sains ayant donné leur consentement éclairé pour un usage non thérapeutique, par l'EFS Lorraine Champagne Ardenne. Les cellules mononucléées (CMN) ont été obtenues par séparation en gradient de densité. Le gradient de densité a été réalisé en déposant 30 ml de sang dans des tubes de 50 ml Leucosep (Greiner Bioone) préalablement remplis avec 15 ml du milieu de séparation des lymphocytes (MSL, Eurobio AbCys). Les tubes ont été centrifugés à 1000 g durant 20 minutes et à 20°C. A l'issue de la centrifugation, l'anneau des cellules mononucléées a été prélevé puis lavé 2 fois avec du tampon PBS (Phosphate Buffer Saline, Eurobio) et centrifugé à 350g, 10 minutes à 20°C. Les cellules sont ensuite reprises dans du tampon PBS/ 0.5% Albumine/0,2mM EDTA filtré (tampon MACS (Magnetic-Activated Cell Sorting) Miltenyi Biotec). Après comptage, 1×10^8 CMN ont été écartées pour le tri immunomagnétique. Les CMN restantes ont été irradiées pour servir de cellules nourricières lors de la mise en culture des cellules NK.

Les CMN contenant les cellules NK sont ensuite soumises à un tri immunomagnétique.

Les cellules NK ont été isolées de 2 manières, soit par sélection négative basée sur une déplétion des lymphocytes T CD3+ ; soit par sélection positive, basée sur la rétention des cellules NK CD56+ sur la colonne.

Dans le cas d'une sélection négative, les CMN ont été incubées avec des billes immunomagnétiques anti-CD3, tandis que dans le cas d'une sélection positive, les CMN ont été incubées avec des billes anti-CD56. Les cellules NK obtenues par sélection négative sont utilisées pour l'expansion des cellules NK en culture (Cf paragraphe Culture des cellules NK). Les cellules NK obtenues après sélection positive sont utilisées immédiatement, sans étape d'expansion.

Les cellules écartées pour le tri ont été centrifugées puis remis à la concentration de 1.10^7 cellules pour 80 µl de tampon MACS. Les cellules sont ensuite incubées 15 minutes à 4 °C en présence de 20µl de microbilles (anti-CD3 ou anti-CD56) pour 10^7 cellules (Miltenyi Biotec). Après lavage et centrifugation (10 minutes à 350g), les cellules sont resuspendues dans 400 µl de tampon MACS pour 10^8 cellules.

Une colonne de sélection immunomagnétique de type LD (sélection négative) ou LS (sélection positive) est placée dans un aimant magnétique (MidiMacs) puis équilibrée avec 2 ml de tampon MACS. La suspension cellulaire est ensuite déposée sur la colonne. Dans le cas d'un tri CD3, Les cellules marquées par les microbilles anti-CD3 (lymphocytes T) sont retenues sur la colonne, tandis que les cellules non marquées (dont les cellules NK CD3 négatives) traversent la colonne et sont récupérées. La colonne est ensuite rincée par 2 fois avec 1 ml de tampon MACS. Le retrait de la colonne du support magnétique permet de collecter les cellules retenues qui peuvent s'éluer facilement avec l'aide d'un piston (sélection positive). Les cellules CD3+ retenues sont ensuite

ajoutées aux CMN non triées, centrifugées (350g, 10 min) puis reprises dans 6 ml de milieu de culture sans sérum en flaque de 25 cm² pour être irradiées afin de servir de cellules nourricières.

Dans le cas d'un tri CD56, les cellules NK retenues sur la colonne sont récupérées après retrait de celle-ci de l'aimant à l'aide de 5 ml de tampon MACS puis numérées. La suspension cellulaire est reprise en milieu NK MACS (NK MACS Medium de Miltenyi Biotec supplémenté de 1% de NK MACS supplément de Miltenyi Biotec, 1% de glutamine, 10% de sérum AB et 1% agents antimicrobiens (Antibiotic-Antimycotic de ThermoFisher contenant de la pénicilline G, streptomycine, amphotéricine B)) et incubée à 37°C, sous 5% de CO₂ pendant la nuit en présence de 50 ng/ml d'IL15 (IL15 recombinante humaine PeProtech) afin d'être utilisée le lendemain.

La présence de NK (CD56+) et l'absence de LT (CD3+) dans les fractions utilisées sont contrôlées par CMF (CytoMétrie en Flux)(BD FACSCanto I).

ANNEXE 2 : PROTOCOLE DETAILLE DE LA TRYPSINATION DES CELLULES ADHERENTES DE MEDULLOBLASTOME

Avant utilisation, les cellules sont trypsinées par ajout de 2,5mL de trypsine (TrypLE Select de Gibco) dans la flasque après récupération de milieu usé (5mL) et rinçage par 5mL de PBS, puis incubées 5min à 37°C, 5% de CO₂. Les cellules décollées en suspension dans la trypsine sont lavées par ajout de 5mL de milieu RPMI et centrifugées (350g, 10min).

ANNEXE 3 : PROTOCOLE DETAILLE DE LA REALISATION DU TEST DE CONJUGAISON

Les cellules NK et les cellules cibles sont marquées séparément à la concentration de 2.10⁶/mL en tampon PBS/1% de SVF (Sérum Veau Fœtal), par des anticorps antiCD56 (Alexa fluor 488) et antiPVR (Alexa fluor 647) respectivement. Après 15 min d'incubation à température ambiante, les cellules sont lavées 2 fois (1er lavage en tampon PBS/SVF 1%, 2nd lavage en PBS seul) puis remises en suspension à la concentration de 2.10⁶/mL dans du milieu NK supplémenté en IL15 (50ng/mL). Les cellules NK et les cibles sont ensuite mélangées au ratio 1:1 (50µL de cellules NK + 50µL de cellules cibles par tube), centrifugées 1min à 200g afin de favoriser le contact au fond du tube et incubées 15 min à 37°C 5% de CO₂. Le mélange est bloqué par ajout de 70µL de paraformaldehyde à 4% (PFA) durant 10min à température ambiante et dans l'obscurité. Les cellules sont centrifugées une dernière fois 4min à 200g sans freinage afin d'éliminer le surnageant, remises délicatement en suspension dans du PBS puis analysées en CMF. Des tubes témoins contenant des cellules cibles ou NK seules avec ou sans anticorps sont réalisés.

ANNEXE 4 : PROTOCOLE DETAILLE DE LA REALISATION DE L'ELISPOT

GRANZYME B

Le principe de ce test est la mise en évidence, sous forme de spots, du granzymes B libérés par exocytose des cellules NK après activation.

Pour la réalisation de ce test les kits Human Granzyme B Elispot development module et Elispot Blue color module (R&D systems) et les microplaques 96 puits MultiScreen IP Filter Plate (Merck Millipore) ont été utilisés selon les recommandations des fabricants.

La veille de la mise en plaque avec les cellules, les puits sont humidifiés par 50µL d'éthanol 70% pendant 30secondes puis lavés 4 fois par 250µL de PBS. Cette étape a pour but de faciliter la fixation des anticorps.

Les puits sont ensuite « coatés » par 100µL de suspension d'anticorps antiGranzyme B (anticorps polyclonax anti granzymeB lyophilisés reconstitués dans 1mL de PBS puis redilués au 1/60 au moment du test) et incubés pendant 12heures à +4°C.

Le surnagent est éliminé et les puits sont lavés 4 fois par 250µL de PBS puis les sites non spécifiques sont bloqués par ajout de 200µL de tampon de blocage (PBS/1% BSA/5% de sucrose) et incubés 2h à température ambiante.

Le surnagent est éliminé et les puits sont lavés 6 fois par 250µL de PBS puis les cellules sont réparties dans chaque puit selon des conditions préalablement définies et incubées pendant 24h à 37°C à 5% de CO₂.

Le surnagent est éliminé et les puits sont lavés 4 fois par 250µL de tampon de lavage (PBS/0.05% Tween® 20). 100µL de la seconde suspension d'anticorps antiGranzyme (anticorps polyclonaux biotinylés anti granzymeB lyophilisés reconstitués dans 1mL de PBS/1% BSA puis redilués au 1/60 au moment du test) sont ajoutés dans chaque puit pour la révélation et incubés pendant 12h à +4°C.

Le surnagent est éliminé et les puits sont lavés 4 fois par 250µL de tampon de lavage (PBS/0.05% Tween® 20). 100µL de suspension de Steptavidine conjuguée à la phosphatase alcaline (suspension commerciale diluée au 1/60 au moment du test) sont ajoutés dans chaque puit et incubés 2h à température ambiante et à l'abri de la lumière.

Le surnagent est éliminé et les puits sont lavés 4 fois par 250µL de tampon de lavage (PBS/0.05% Tween® 20). 100µL de BCIP/NBT Chromogen (5-brom-4-chloro-3'-indolyphosphate p-toluidine salt /Nitro blue tetrazolium chloride et du BCIP en solvant organique) sont ajoutés dans chaque puit et incubés 1h à température ambiante et à l'abri de la lumière.

Le surnagent est éliminé et les puits sont lavés à l'eau distillée. La plaque est séchée à l'air libre pendant au moins 12heures avant comptage des spots par l'automate Bioreader 4000 PRO-S (BIO-SYS).

ANNEXE 5 : PROTOCOLE DETAILLE DE LA REALISATION DU TEST DE CYTOTOXICITE MESURANT LA LIBERATION D'ADENYLATE KINASE

Les cellules sont réparties dans 100µL de milieu en plaques 96 puits selon des conditions préalablement définies et incubées pendant 24h à 37°C 5% de CO₂.

Après incubation, 50µL de tampon *Tris acétate* sont ajoutés dans chaque puit (excepté ceux réservés à la mesure de la lyse maximale) et 17µL de surnagent est transféré en plaque en plaque 96 puits opaque (Lumaplate de PerkinElmer). 83µL de réactif *AK detection reagent* sont ajoutés dans chaque puit opaque. Après 5 min, la luminescence émise dans chaque puit est mesurée par le luminomètre VICTOR X4 (PerkinElmer) et exprimé en coups /minutes.

La lyse maximale est obtenue par ajout de 50µl de solution de lyse *Toxilight 100% lysis* dans les puits contenant les cellules cibles seules sans tampon *Tris acétate*. Après 15 min d'incubation à température ambiante, 17µL de surnagent est transféré en plaque opaque 83µL de réactif *AK detection reagent* est ajouté dans chaque puit. La luminescence est mesurée comme précédemment.

DEMANDE D'IMPRIMATUR

Date de soutenance : 25/06/2019

<p align="center">DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE</p> <p>présenté par : MOUGINOT Manon</p> <p><u>Sujet</u> : Place de l'immunothérapie par les cellules Natural Killer dans le traitement des tumeurs primitives cérébrales, étude in vitro du mécanisme d'action des cellules NK envers 3 lignées de médulloblastome</p> <p><u>Jury</u> :</p> <p>Président : Mme Danièle BENSOUSSAN, Professeur Directeur : Mme Véronique DECOT, Professeur Juges : M. Pascal CHASTAGNER, Professeur M. Marcelo DE CARVALHO, Professeur M. Cédric BOURA, Maître de conférences</p>	<p align="center">Vu, Nancy, le 28/05/19.</p> <p align="center">Le Président du Jury Directeur de Thèse</p> <p align="center">M.D. BENSOUSSAN M. DECOT V.</p>  
<p align="center">Vu et approuvé, Nancy, le 06.06.2019</p> <p align="center">Doyen de la Faculté de Pharmacie de l'Université de Lorraine,</p>  <p align="center">Pr. Raphaël PUVAL</p>	<p align="center">Vu, Nancy, le</p> <p align="center">Le Président de l'Université de Lorraine,</p>  <p align="center">Pierre MUTZENHARDT</p> <p align="right">N° d'enregistrement : 10755</p>

N° d'identification :

TITRE

Place de l'immunothérapie par les cellules Natural Killer dans le traitement des tumeurs primitives cérébrales, étude *in vitro* du mécanisme d'action des cellules NK envers 3 lignées de médulloblastome

Thèse soutenue le 25/06/2019

Par MOUGINOT Manon

RESUME :

Les tumeurs primitives cérébrales, bien que rares, font partie des tumeurs de plus mauvais pronostic. Du fait de leur localisation, elles sont particulièrement difficiles à traiter par les moyens thérapeutiques conventionnels. Les chercheurs et les médecins s'intéressent de plus en plus à l'utilisation de traitements plus ciblés parmi lesquels l'immunothérapie prend une place grandissante. Cette approche visant à stimuler ou moduler le système immunitaire afin de favoriser la l'élimination des cellules cancéreuses s'est particulièrement développée au cours de ces dernières années, notamment avec la découverte des CAR T cell, lymphocytes T génétiquement modifiés et capable de reconnaître spécifiquement un antigène donné. L'utilisation de cellules Natural Killer est approche différente permettant l'utilisation de cellules allogéniques, plus flexible et moins chères à produire, sans risque d'induction de GvHD chez le patient. Les cellules Natural Killer sont un sous type de lymphocyte CD3-CD56+ capables de reconnaître et détruire directement les cellules étrangères ou altérées (tumorales ou infectées) et ce en l'absence d'immunisation spécifique préalable mais grâce un répertoire varié de récepteurs activateurs et inhibiteurs capables de reconnaître un grand nombre de ligands. De nombreux auteurs se sont intéressés à l'utilisation de cellules NK dans le traitement du plus agressif des cancers cérébraux: le glioblastome. Les essais cliniques sur l'utilisation de LAK ou cellules NK injectées en intracérébral ont prouvé que la méthode était sûre, et les études précliniques sur l'utilisation de NK CAR ont montré des résultats plutôt positifs compte tenu de l'agressivité de ce type de tumeur. Cependant, peu d'étude se sont intéressées à l'utilisation des cellules NK comme traitement du médulloblastome qui est la tumeur cérébrale maligne la plus fréquente dans la population pédiatrique. Le but de notre étude expérimentale a donc été d'évaluer l'effet cytotoxique de cellules NK allogéniques envers des cellules de médulloblastome.

Les cellules NK ont été sélectionnées à partir de cellules sanguines de donneurs sains par technique immunomagnétique, puis amplifiées *ex vivo* en présence d'interleukine 15. Après expansion, le potentiel cytotoxique des cellules NK a été évalué *in vitro* par différents tests ciblant chaque étape impliquée dans le processus de lyse tumorale : l'aspect phénotypique initial des cellules tumorales par cytométrie en flux, la conjugaison par cytométrie en flux, la dégranulation des cellules NK par technique Elispot granzyme B et enfin la mort des cellules cibles, par nécrose, apoptose tardive et lyse cellulaire par cytométrie en flux et mesure de la libération d'adénylate kinase. Trois lignées établies à de médulloblastome ont été analysées : les lignées DAOY D283 et D341, et comparées à la lignée de cellules leucémiques K562, connue comme étant très sensible aux cellules NK.

Les résultats obtenus ont montré que les 3 lignées de médulloblastome étaient sensibles à la cytotoxicité des cellules NK, et particulièrement la lignée DAOY. Cependant les résultats étaient très hétérogènes d'une lignée à l'autre et dépendaient aussi du donneur de cellules NK. L'analyse de l'expression des récepteurs activateurs et inhibiteurs des cellules NK ainsi que celle des ligands correspondants sur les cellules de médulloblastome notamment les molécules du CMH de classe I permettrait de prédire cette cytotoxicité voir de screener les donneurs afin de trouver la meilleur lignée de NK pour une cible donnée. Les résultats de ce travail *in vivo* permettront par la suite de réaliser une étude *in vivo* chez l'animal.

MOTS CLES : cellules Natural Killer, tumeurs primitives cérébrales, médulloblastome, immunothérapie, cytotoxicité, interleukine 15

Directeur de thèse	Intitulé du laboratoire	Nature	
Pr Véronique DECOT	UTCT, CHRU Nancy	Expérimentale	X
		Bibliographique	□
		Thème	3

Thèmes

1 – Sciences fondamentales
3 – Médicament
5 - Biologie

2 – Hygiène/Environnement
4 – Alimentation – Nutrition
6 – Pratique professionnelle