

Creative commons : Paternité - Pas d'Utilisation Commerciale -
Pas de Modification 2.0 France (CC BY-NC-ND 2.0)



<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/2.0/fr>



Faculté de Pharmacie de Lyon

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1
FACULTE DE PHARMACIE
INSTITUT DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES ET BIOLOGIQUES

THESE n°15

THESE

pour le DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

présentée et soutenue publiquement le 03 Mars 2023 par M. PARIS Pierre

Né le 30 août 1995 à Fontainebleau

**Ciblage Immunothérapeutique des cellules de Glioblastome par des Lymphocytes T
Vgamma9Vdelta2 CAR-OAcGD2**

JURY

Président du jury : M. VIEL Sébastien, Maître de Conférences Universitaire Praticien Hospitalier

Directrice de thèse : Mme PECQUEUR Claire, Directrice de Recherche CNRS

Tutrice pédagogique : Mme MOYRET-LALLE Caroline, Professeure des Universités

Autre membre du jury : M. MEURETTE Olivier, Maître de Conférences Universitaire

En premier lieu, je tiens à remercier ma directrice de thèse la DR **Claire Pecqueur** pour m'avoir accepté comme stagiaire en Master 2 puis de diriger ma thèse d'exercice en pharmacie et ma thèse de science. Je voudrais remercier l'ensemble du jury d'avoir accepté de participer à ma soutenance de thèse : le président du jury, le MCU-PH **Sébastien Viel**, la tutrice pédagogique de ma thèse, la PR **Caroline Moyret-Lalle**, et le MCU **Olivier Meurette**.

Merci à l'ensemble de l'équipe 14 du CRCINA dirigée par le DR **François Paris** (aucun lien) pour leur accueil et leur aide au quotidien. Je remercie particulièrement les Docteurs **Ophélie Renoult** et **Pauline Thomas** pour leur aide en stage et encore aujourd'hui, c'est rassurant de commencer ma thèse de science en sachant que je peux compter sur vous ! Je remercie également le PR **Stéphane Birklé** et la MCU **Sophie Fougeray** pour leur accompagnement lors de mon stage, la MCU-PH **Catherine Gratas** pour son aide en biologie moléculaire, **Hortense** et **Clément**, parce que le stage aurait été moins drôle sans eux.

Je souhaite aussi remercier les membres de l'équipe 1 avec qui j'ai eu la chance de collaborer, notamment le DR **Emmanuel Scotet** et la CR **Béatrice Clémenceau**, sans qui je n'aurais pas pu avoir les lymphocytes T CAR qui ont servi pour la réalisation de ces travaux. Merci également à **Chirine**, **Jocelyn**, **Laura** et **Régine** pour leur aide avec la manipulation des lymphocytes sus-mentionnés.

Cette thèse signant la fin de mes études à l'ISPB de Lyon, je souhaite saluer mes amis de fac sans qui ces années n'auraient pas été les mêmes : **Alexandre**, **Aubin**, **Chloé**, **Clémence**, **Ezechiël**, **Inès**, **Laure-Anne**, **Lucas**, **Maxime**, **Perrine** et **Victor**. Et **Arthur**.

Enfin, je dédie la dernière partie de ces remerciements à ma famille pour m'avoir soutenu lors de ces infinies années d'études et au-delà : mes **parents**, mes **grands-parents**, mon bouffon de petit frère **Bastien** et mon grand frère **Quentin** ainsi qu'à sa petite famille.

Table des matières

Liste des tableaux et figures	5
Liste des abréviations.....	6
Introduction	8
Rappel historique et bibliographique.....	10
1) Glioblastome	10
1. Définition et épidémiologie	10
2. Protocole thérapeutique du GBM.....	11
<i>i. Prise en charge des tumeurs primaires : Protocole de Stupp.....</i>	<i>11</i>
<i>ii. Prise en charge des récives.....</i>	<i>14</i>
3. Limites du traitement du glioblastome	15
<i>i. La Barrière Hémato-Encéphalique.....</i>	<i>15</i>
<i>ii. Une forte hétérogénéité tumorale.....</i>	<i>15</i>
<i>iii. Un microenvironnement immunosuppressif.....</i>	<i>17</i>
4. Modèles précliniques actuels et leurs limites	19
2) Immunothérapie et glioblastome	21
1. Différentes approches immunothérapeutiques dans le glioblastome	21
<i>i. Anticorps</i>	<i>22</i>
<i>ii. Vaccins</i>	<i>23</i>
<i>iii. Virothérapie oncolytique</i>	<i>23</i>
<i>iv. Transfert adoptif de lymphocytes T CAR</i>	<i>24</i>
2. Etat des lieux du transfert adoptif des LT CAR contre le GBM en clinique.....	29
<i>i. Cibles explorées</i>	<i>29</i>
<i>ii. Effets cliniques</i>	<i>30</i>
<i>iii. Modalités d'administration.....</i>	<i>30</i>
<i>iv. Association thérapeutique.....</i>	<i>31</i>

v. <i>Effecteurs</i>	32
3) Proposition d'une approche immunothérapeutique originale avec des LT Vγ9Vδ2 ciblant un ganglioside	34
1. Une cible atypique, le ganglioside GD2 O-acétylé	34
i. <i>Structure et synthèse des gangliosides</i>	34
ii. <i>Fonction des gangliosides</i>	37
iii. <i>GD2/OAcGD2 et cancers</i>	38
iv. <i>Ciblage du GD2/OAcGD2 par immunothérapie</i>	38
2. Des effecteurs immunitaires singuliers, les LT V γ 9V δ 2	39
i. <i>Définition</i>	39
ii. <i>Immunoréactivité des LT Vγ9Vδ2</i>	40
iii. <i>Intérêt en immunothérapie anticancéreuse</i>	43
3. Quel futur avec les LT V γ 9V δ 2 ?	46
i. <i>Avantages et limites</i>	46
ii. <i>Combinaison thérapeutique</i>	47
iii. <i>Ingénierie Lymphocytes T Vγ9Vδ2 CAR</i>	49
Matériels et Méthodes	50
Résultats	56
Discussion	72
Conclusions générales	79
Bibliographie	80

Liste des tableaux et figures

Figure 1 : Représentation schématique de la stratégie de ciblage testée dans ces travaux

Figure 2 : Visualisation d'un cerveau présentant un glioblastome

Figure 3 : Schéma du protocole de Stupp et des gains de survie associés

Figure 4 : Représentation schématique des différents modèles pouvant être obtenus à l'aide de culture primaire

Figure 5 : Représentation des différentes approches immunothérapeutiques dans le glioblastome

Figure 6 : Représentation schématique des différentes parties composant un CAR fonctionnel

Figure 7 : Structure des différentes générations de CAR

Figure 8 : Gangliosides séparés par chromatographie sur couche mince haute performance

Figure 9 : Structure et voies impliquées dans la synthèse du OAcGD2

Figure 10 : Modèle actuel des principales voies de reconnaissance des cellules tumorales par les LT V γ 9V δ 2

Figure 11 : Analyse de l'expression du GD2 et du OAcGD2 par cytométrie de flux

Figure 12 : Expression du CD107a par les LT V γ 9V δ 2 en fonction du milieu

Figure 13 : Activation des LT V γ 9V δ 2 par les cultures primaires de sous-type moléculaire CPN

Figure 14 : Activation des LT V γ 9V δ 2 par les cultures primaires de sous-type moléculaire MES

Figure 15 : Activation des LT en présence d'inhibiteurs des voies d'activation spécifiques aux LT V γ 9V δ 2

Figure 16 : Activation des LT V γ 9V δ 2 DO240 transduits après blocage de la reconnaissance CAR-dépendante

Figure 17 : Impact du KO GD2 synthase (B4GALNT1) sur l'expression du OAcGD2 et sur l'activité des LT V γ 9V δ 2 CAR-OAcGD2

Figure 18 : Cytotoxicité des LT V γ 9V δ 2 DO240 transduits ou non avec le CAR anti-OAcGD2

Tableau I : Liste des Ac utilisés, avec leur cible et le type d'expérience dans la(les)quelle(s) ils ont été utilisés.

Liste des abréviations

Ac : Anticorps

Ag : Antigène

ANOVA : test d'analyse de la variance

B4GALNT1 : Beta 4 N-acetyl-galactosyltransférase I

BHE : Barrière Hémato-Encéphalique

BrHPP : Bromohydrin Pyrophosphate

BSA : Bovine Serum Albumin (Albumine de Sérum de Bovin)

BTN : Butyrophiline

BTN3i : inhibiteur de BTN3

CAR : Chimeric Antigen Receptor (Récepteur Chimérique à l'Antigène)

CAR-OAcGD2 : CAR dirigé contre le GD2 O-Acétylé

CASD1 : Cas 1 domain containing 9(7)-O-Acetyl transférase

CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité

CPN : Sous-types moléculaires Classique et Proneural

CSC : Cellule Souche Cancéreuse

CSE : Cellule Souche Embryonnaire

CSG : Cellule Souche de Glioblastome

CSN : Cellule Souche Neurale

CTLA-4 : Cytotoxic T Lymphocyte Associated Protein 4

Δ CAR : CAR tronqué de la partie CD3 ζ

DAMP : Danger Associated Molecular Pattern (Motif Moléculaire Associé à un Danger)

DMEM : Dulbecco's Modified Eagle Medium

EGF : Epidermal Growth Factor (facteur de croissance épidermique)

EGFR : récepteur à l'EGF

EGFRvIII : variant III du récepteur à l'EGF

Fc : Fraction constante

GBM : Glioblastome

GD2 : disialoganglioside 2

GD3 : disialoganglioside 3

ICI : Inhibiteur de point de Contrôle Immunitaire

IgG : Immunoglobuline de type G

IL-2 : Interleukine 2
 IPP : Isopentenyl-5-pyrophosphate
 LNK : Lymphocyte Natural Killer
 LT : Lymphocyte T
 LT CAR : Lymphocytes T modifié pour exprimer un Récepteur Chimérique à l'Antigène
 MES : Sous-type moléculaire Mésenchymal
 MGMT : O⁶-methylguanine-DNA-methyltransferase
 NKG2Di : inhibiteur du récepteur NKG2D
 NT : Non Transduit
 OAcGD2 : GD2 O-acétylé
 PBS : Phosphate Buffer Saline (Tampon Phosphate Salin)
 PD-1 : Programmed cell Death-1
 PN : sous-type moléculaire ProNeural
 RPMI : Roswell Park Memorial Institute medium
 ScFv : Single chain fragment variable
 SVF : Sérum de veau foetal
 SH : Sérum Humain
 SNC : Système Nerveux Central
 SRC : Syndrome de Relargage des Cytokines
 TAA : Tumor Associated Antigen (Antigène Associé à la Tumeur)
 TAM : Tumor Associated Macrophage (Macrophage Associé à la Tumeur)
 TCR : T Cell Receptor (Récepteur à l'antigène des lymphocytes T)
 TGF- β : Transcription Growth Factor beta
 TIL : Tumor Infiltrating Lymphocytes (Lymphocytes Infiltrant la Tumeur)
 TIM-3 : T-cell Immunoglobulin and Mucin-domain containing-3
 TMZ : Témazolomide
 TNF- α : Tumor Necrosis Factor alpha (Facteur de Nécrose Tumorale alpha)
 Zol : Zoledronate

Introduction

Le glioblastome (GBM) est la tumeur cérébrale primaire la plus fréquente et la plus agressive chez l'adulte. Il est associé à un pronostic sombre, malgré la stratégie thérapeutique agressive mise en place associant une chirurgie, une radiothérapie et une chimiothérapie. Ce mauvais pronostic est dû aux récurrences systématiques des GBM chez les patients traités, sur lesquelles aucun traitement n'est actuellement indiqué. La recherche de nouvelles approches thérapeutiques pour améliorer la prise en charge des patients est donc primordiale. Parmi ces stratégies, l'immunothérapie basée sur le transfert adoptif de lymphocytes T (LT) tient une place prépondérante. En effet, l'équipe dans laquelle mes travaux ont été réalisés a précédemment montré qu'une sous-population de LT, les LT V γ 9V δ 2, présentent une efficacité anti tumorale spontanée importante envers une sous-population de cellules tumorales de GBM, les cellules de sous-type mésenchymal (MES) (1,2). En parallèle, l'équipe a identifié un antigène tumoral exprimé par les cellules tumorales d'origine neurale comme le Neuroblastome, le ganglioside GD2 O-acétylé (OAcGD2). De manière intéressante, ce ganglioside est également exprimé par certaines sous-populations de GBM (3). Il constitue donc un antigène tumoral pertinent à cibler dans le cadre des GBM en utilisant des LT génétiquement modifiés et exprimant un récepteur chimérique à l'antigène (CAR) qui permettrait la reconnaissance et l'élimination des cellules exprimant l'OAcGD2.

Le but de mes travaux était de déterminer si des LT V γ 9V δ 2 génétiquement modifiés pour exprimer le CAR-OAcGD2 étaient capables de reconnaître et tuer toutes les cellules de GBM, c'est-à-dire les cellules tumorales MES par leur reconnaissance spontanée mais également les autres sous-populations via le CAR-OAcGD2 (Figure 1). Ce projet permettrait d'apporter une preuve de concept solide pour le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques dans la prise en charge des patients atteints de GBM.

Après un rappel bibliographique détaillé justifiant de la place de cette approche immunothérapeutique dans la recherche de nouveaux traitements contre le GBM, je présenterai les résultats expérimentaux que j'ai obtenus avec 3 grandes questions :

- 1) Identifier les sous-populations de GBM exprimant l'OAcGD2
- 2) Déterminer l'impact de la transduction CAR-OAcGD2 sur l'immunoréactivité spontanée des LT V γ 9V δ 2 contre les cellules tumorales MES
- 3) Déterminer l'efficacité des LT V γ 9V δ 2 CAR-OAcGD2 contre les cellules tumorales exprimant le ganglioside.

A partir des résultats précliniques obtenus, je discuterai dans une 3^{ème} partie la pertinence scientifique de cette approche.

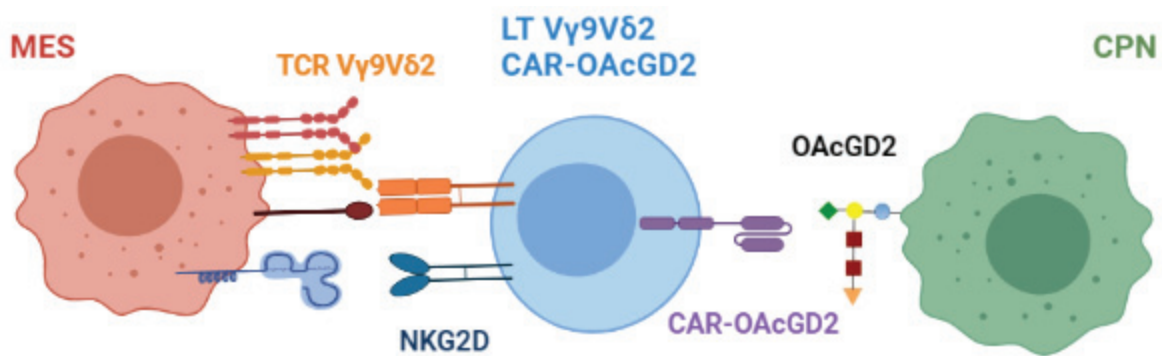


Figure 1 : Représentation schématique de la stratégie de ciblage testée dans ces travaux : les LT V γ 9V δ 2 CAR-OAcGD2 reconnaissent les cellules de GBM de sous-type MES grâce à leur TCR endogène, et les cellules de sous-type CPN grâce au CAR dirigé contre le OAcGD2 induit à leur surface.

Rappel historique et bibliographique

1) Glioblastome

1. Définition et épidémiologie

Les gliomes diffus de l'adulte représentent 81% des tumeurs cérébrales malignes, formant ainsi le groupe de tumeur cérébrale le plus fréquent (4). Ils dérivent de la prolifération anormale d'un groupe de cellules de soutien du système nerveux central (SNC) que l'on appelle les cellules gliales, composées des oligodendrocytes, des cellules microgliales, des cellules épendymaires et des astrocytes. Ces derniers sont les cellules majoritaires de l'encéphale et jouent un rôle majeur dans le maintien de l'homéostasie du milieu extracellulaire. D'après la dernière classification de l'organisation mondiale de la santé, les gliomes sont divisés en 3 catégories : les oligodendrogliomes, les astrocytomes et les glioblastomes (GBM). Ces deux derniers groupes correspondent tous les deux à une prolifération anormale des astrocytes. Du fait de son agressivité, le GBM est associé au grade de gravité 4 d'emblée (5).

Le GBM est la tumeur cérébrale primaire maligne la plus fréquente et la plus agressive chez l'adulte. A lui seul, il représente 14% des tumeurs du système nerveux central, 49% des tumeurs cérébrales malignes primaires et 58% des gliomes. Son incidence est estimée à 2-3 nouveaux cas pour 100 000 habitants/an aux Etats-Unis. Il touche davantage les personnes âgées, l'âge médian au diagnostic étant estimé à 64 ans ; les hommes, avec en moyenne 1,6 homme pour 1 femme ; les populations caucasiennes (4). Le risque d'apparition d'un GBM est également plus fort chez des patients qui ont des antécédents d'exposition à des radiations pendant l'enfance. Il n'existe pas d'autres facteurs de risque clairement établis, bien que des soupçons pèsent sur l'exposition prolongée aux pesticides, aux champs électromagnétiques et au téléphone portable (6). Le pronostic associé au GBM est sombre, la récurrence de la tumeur étant systématique et survenant en moyenne 12 mois après la chirurgie. La survie à 5 ans des patients est ainsi estimée à 6,8%, et la survie globale à la rechute est estimée à 6 mois (4).

Le patient peut présenter des symptômes variés et peu spécifiques, en fonction des zones cérébrales atteintes, rendant le diagnostic initial du GBM tardif. On retrouve communément des troubles cognitifs, visuels, moteurs et/ou sensitifs, des épilepsies et un syndrome d'hypertension intracrânienne. Le GBM est identifié à l'aide d'imagerie par résonance magnétique ce qui permet de déterminer la localisation tumorale (Figure 2). Il correspond à une masse tumorale

volumineuse et hautement invasive initialement localisée au niveau d'un hémisphère cérébral mais qui peut ensuite diffuser à l'autre hémisphère (7).

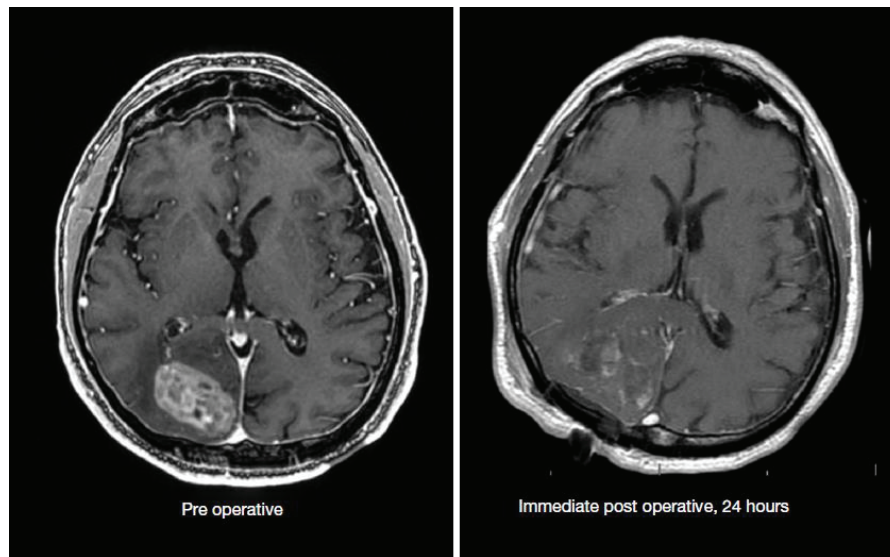


Figure 2 : Visualisation par imagerie par résonnance magnétique, en coupe axiale, d'un cerveau présentant un GBM avant résection (gauche) et 24h après (droite). Images pondérées en T1 (7).

Le diagnostic est réalisé par des analyses anatomo-pathologiques et moléculaires sur l'exérèse tumorale. Au niveau histologique, il sera recherché une prolifération microvasculaire, une nécrose cellulaire ainsi qu'un polymorphisme cellulaire important. Sur le plan moléculaire et génétique, le GBM peut présenter de nombreuses altérations comme la mutation du promoteur de la transcriptase inverse de la télomérase, l'amplification du récepteur à l'EGF (EGFR) et de son variant III (EGFRvIII) ou encore le gain d'une copie entière du chromosome 7 combinée à la perte entière d'une copie du chromosome 10 (+7/-10). La présence d'au moins une de ces altérations est suffisante pour associer le GBM au grade 4 et sont par conséquent systématiquement recherchées lors du diagnostic (5).

2. Protocole thérapeutique du GBM

i. Prise en charge des tumeurs primaires : Protocole de Stupp

La stratégie thérapeutique préconisée lors d'un GBM associe une chirurgie réductrice suivie d'une combinaison concomitante puis adjuvante de radiothérapie et de chimiothérapie à base de témozolomide (TMZ). Le TMZ est un agent alkylant de l'ADN qui favorise la mort des cellules tumorales induite par radiothérapie. Ce protocole standard, dit protocole de Stupp est

basé sur l'essai clinique de phase III (EORTC – NCIC trial) (8,9), par la suite conforté par de nombreuses études réalisées dans différents pays qui ont montré une augmentation significative de la survie médiane globale et du taux de patients longs survivants avec ce traitement comparé à la combinaison chirurgie et radiothérapie (Figure 3) (9).

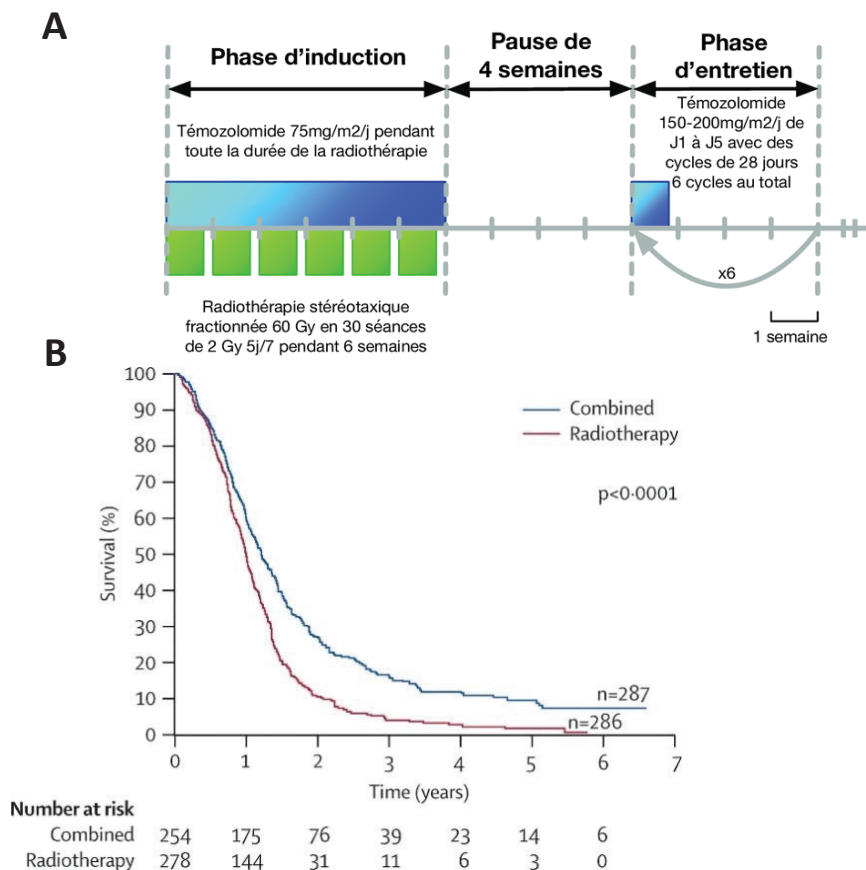


Figure 3 : (A) Illustration du protocole de Stupp (10) (B) Survie des patients atteints de GBM primaire suivant un traitement combiné radiothérapie et chimiothérapie (courbe bleue) ou une radiothérapie seule après chirurgie (courbe rouge) (8).

La chirurgie permet de réduire au maximum le volume tumoral pour améliorer la survie des patients, tout en réduisant autant que possible les complications neurologiques post-opératoires et limiter l'impact sur leur qualité de vie. L'étendue de la résection tumorale impacte directement la survie des patients et leur qualité de vie. Un bénéfice significatif sur la survie est observé à partir de 70% de résection du volume tumoral, avec toutefois des variations de 70 à 98% de résection du volume tumoral en fonction des études (11–13). Une résection supramaximale, au-delà des limites de la tumeur en imagerie, a été testée pour éliminer les

cellules les plus infiltrantes, qui a toutefois été rapidement abandonnée du fait d'une morbidité plus importante provoquée par une résection de parties saines plus importantes (14,15). En outre, on observe aucun bénéfice en termes de survie chez les personnes âgées qui ont subi une chirurgie réduisant de plus 90 % le volume tumoral, ce qui illustre qu'une chirurgie lourde n'est pas adapté chez des patients fragiles (11). Des développements technologiques de chirurgie permettant de limiter l'atteinte des tissus sains sont aujourd'hui davantage recherchés. C'est le cas de la craniotomie sur patient éveillé, qui permet d'une part une anesthésie locale du patient et non générale, et d'autre part de limiter l'exérèse de zones cérébrales cruciales à la qualité de vie du patient et ainsi de mieux prévenir le risque de complications postopératoires. Cette approche chirurgicale montre une faible proportion de patients présentant des complications tardives (1,4%) tout en réalisant une exérèse tumorale de plus de 75% (16).

La résection de toutes les cellules de GBM est par conséquent impossible du fait de leur localisation combinée à leur forte infiltration. Il est par conséquent indispensable de la combiner à d'autres protocoles thérapeutiques, notamment la radiothérapie. Le protocole de radiothérapie est appliqué, un mois après la chirurgie, par dose fractionnée de 2 Gy par jour, 5 jours par semaine pendant 6 semaines, pour une dose totale de 60 Gy (8). Celui-ci peut être adapté en faisant varier la dose totale administrée et/ou le temps de traitement selon l'état du patient : une dose plus faible moins efficace peut être proposée pour réduire les effets secondaires de la radiothérapie chez les personnes âgées alors qu'une dose plus forte, plus efficace mais associée à une toxicité plus importante peut être proposée chez des patients plus jeunes (17). Pour certains patients trop fragiles pour suivre un protocole de 6 semaines de radiothérapie, comme les personnes âgées, un protocole dit hypofractionné peut être proposé, correspondant à des doses de radiothérapie plus élevées par séance sur un délai plus court (18). Par exemple, l'administration d'une dose totale de 40 Gy par fractions de 2,67 Gy sur 3 semaines permet d'obtenir un gain de survie similaire au schéma classique chez des patients âgés de plus de 60 ans (19).

L'addition de chimiothérapie avec la radiothérapie a permis une amélioration significative de la survie des patients, la médiane de survie passant de 12,1 mois (chirurgie et radiothérapie seule) à 14,6 mois (chirurgie, radiothérapie et chimiothérapie). La chimiothérapie repose sur l'utilisation de TMZ (témodal®), qui appartient à la classe des agents alkylants de l'ADN et qui va induire la mort cellulaire en créant des lésions cytotoxiques suite à l'alkylation des bases guanine. Il est administré quotidiennement par voie orale, à raison de 75 mg/m², pendant la

radiothérapie puis de manière adjuvante pendant 6 cycles de 5 jours tous les 28 jours, à raison de 150-200 mg/m² par jour. Il faut toutefois noter que le TMZ présente des effets indésirables importants : fatigue, alopecie, troubles digestifs, céphalées, anorexie et toxicités hématologiques (leucopénie, thrombocytopénie, anémie, neutropénie) (8). De plus, une résistance à cette chimiothérapie a été observée chez certains patients, aucun effet du TMZ n'ayant été observé chez les patients présentant des tumeurs exprimant l'enzyme O⁶-methylguanine-DNA-methyltransferase (MGMT). L'expression de cette protéine, modulée au niveau épigénétique, est impliquée dans la réparation des lésions de l'ADN induites par les agents alkylants. La méthylation de son promoteur, classiquement retrouvé dans les cellules tumorales de GBM, est associée à une absence d'expression de la MGMT alors que sa déméthylation entrainera sa réexpression, et par conséquent une réparation des dommages causées par le TMZ et une résistance des patients à ce traitement. De fait, le statut de méthylation/déméthylation du promoteur de la MGMT est aujourd'hui considéré comme un facteur pronostic de la réponse au traitement chez les patients atteints de GBM et est recherché au même titre que les autres biomarqueurs moléculaires lors du diagnostic. Il est à noter que le protocole de Stupp, incluant le TMZ, est systématiquement proposé aux patients quel que soit leur statut de méthylation du promoteur de la MGMT. De plus, une résistance aux traitements a également été observée dans des tumeurs n'exprimant pas la MGMT à nouveau, suggérant l'importance d'autres mécanismes moléculaires impliqués dans la résistance aux traitements (20).

ii. Prise en charge des récidives

Malgré ce protocole thérapeutique très agressif, la récurrence de la tumeur est systématique dans l'année qui suit la chirurgie. Aujourd'hui, aucun traitement standard n'est indiqué dans la prise en charge des rechutes (21). Le choix du traitement est décidé en réunion de conseil pluridisciplinaire, composé de différents médecins et pharmaciens, selon la caractérisation moléculaire de la tumeur, les traitements déjà suivis et l'état du patient. Il peut consister en une 2^e irradiation de la tumeur, à des doses plus faibles (30-36 Gy maximum), et/ou une nouvelle cure de chimiothérapie, pouvant utiliser d'autres molécules que le TMZ, selon le niveau d'expression de la MGMT, comme l'etoposide (un inhibiteur de la topoisomérase II) ou la carmustine (un autre agent alkylant). Une nouvelle résection chirurgicale est parfois réalisée mais elle reste rare car le volume retiré lors de la première chirurgie est déjà suffisamment important. Des thérapies ciblées sont aussi utilisées dans des études cliniques de phase I/II,

pouvant utiliser des anticorps thérapeutiques ciblant des marqueurs moléculaires surexprimés par les cellules tumorales, comme le cetuximab qui cible l'EGFR (22). Toutefois, aucun traitement n'a clairement montré de bénéfice en termes de survie de patients.

3. Limites du traitement du glioblastome

Plusieurs raisons peuvent expliquer les échecs thérapeutiques rencontrés lors du traitement du GBM par ces traitements conventionnels. Tout d'abord, comme évoqué précédemment, le caractère fortement invasif de cette tumeur combinée à sa localisation cérébrale limite fortement l'exérèse chirurgicale. Cependant, d'autres facteurs, présentés ci-dessous, ont un impact significatif sur ce mauvais pronostic.

i. La Barrière Hémato-Encéphalique

La localisation du GBM au sein du SNC limite grandement son accès au traitement. En effet, le cerveau est protégé par la Barrière Hémato-Encéphalique (BHE) qui limite les échanges entre le sang et le SNC afin de préserver son intégrité. Seules de petites molécules hydrophobes (< 500 Da), le glucose, ou certaines cellules comme celles de l'immunité (macrophages, cellules dendritiques, lymphocytes T) vont pouvoir traverser cette barrière. Ainsi, cette barrière limite l'accès au site tumoral des traitements pharmacologiques et immunologiques et donc leur efficacité (23).

Pour contourner ce problème, différentes stratégies d'application des traitements sont à l'étude. Ainsi, une administration des traitements en intra-tumoral plutôt qu'en intraveineux, afin que le traitement arrive directement au niveau des cellules à traiter, peut-être envisagée (24). Une autre approche en cours d'étude est le développement de nanoparticules, des petites sphères lipidiques présentant une surface hydrophobe et un cœur hydrophile permettant l'intégration et le transport de molécules au niveau du site tumoral, qui pourrait favoriser le passage de la BHE (25). Cette stratégie est encore en cours d'optimisation, mais des études précliniques montrent que ces nanoparticules traversent la BHE et sont retrouvées au niveau du site tumoral (26,27).

ii. Une forte hétérogénéité tumorale

Les GBM présentent une forte hétérogénéité génétique inter-tumorale. Ainsi, certaines mutations génétiques sont retrouvées dans certains GBM et impacter directement la réponse aux traitements. C'est le cas du statut de la méthylation du promoteur de la MGMT (voir §I.2.i) ou de l'EGFRvIII, qui est exprimé dans 30% des GBM et dont l'expression conditionne

l'efficacité d'une thérapie ciblée contre l'EGFRvIII, ou encore de la perte ou la mutation de la protéine p53 impliquée dans les mécanismes de réparation de l'ADN et de la mort cellulaire (28,29).

En plus de ces différences inter-tumorales, les GBM présentent une complexité cellulaire, moléculaire et spatiale très importante au sein d'une même tumeur. Une sous-population de cellules tumorales présentant des caractéristiques communes avec les cellules souches neurales, nommées Cellules Souches de Glioblastome (CSG), jouerait un rôle de réservoir permettant à la tumeur de se maintenir et de se renouveler. Ces CSG sont capables d'auto-renouvellement et de division asymétrique, alimentant ainsi continuellement cette hétérogénéité cellulaire. Ces cellules sont également très résistantes aux traitements conventionnels, notamment la radiothérapie, grâce à leur fort potentiel de réparation de l'ADN (30). Différents marqueurs exprimés par les cellules souches neurales sont utilisés pour identifier cette sous-population de CSG comme CD133, Sox2, Nestine, LGR5, B23 et GPD1 (31,32). Bien qu'aucun de ces marqueurs ne soit spécifique, la co-expression de plusieurs de ces marqueurs permet une identification relative de ces cellules au sein de la population tumorale (31,32).

En plus de son hétérogénéité cellulaire, le GBM présente une forte hétérogénéité moléculaire, dont la classification clinique actuelle de l'OMS ne tient pas compte. En effet, le développement de technique d'analyse de l'expression génique à grande échelle, comme les puces à ADN, le séquençage à haut débit de tumeur ou sur cellule unique, a permis l'identification de plusieurs sous-types moléculaire à partir de l'expression de plus de 500 gènes et de la réponse clinique des patients (33,34). Ces différentes études ont permis d'identifier 3 grands groupes moléculaires, les cellules tumorales de sous-type mésenchymateux (MES), et celles de sous-type classique et proneural (PN) (35–37). Au sein de chaque tumeur, les 3 sous-types seront plus ou moins représentés ce qui permet de classer grossièrement ces tumeurs en fonction du sous-type majoritaire. Il a ainsi été montré qu'une forte proportion en sous-type MES est associé à un plus sombre pronostic alors que le sous-type PN est associé à une meilleure réponse aux traitements (33). De manière générale, une proportion plus importante du sous-type MES est observée à la récurrence (37). Si les mécanismes exacts à l'origine de ce caractère MES des GBM à la récurrence n'est pas encore élucidés, deux hypothèses, non exclusives, sont actuellement en cours d'étude. D'une part, le sous-type MES présente une plus grande résistance aux traitements et est localisé dans des zones hypoxiques (38). D'autre part, une transition moléculaire du sous-type proneural vers le sous-type MES a été mise en évidence lors de différents stress et

notamment l'exposition aux irradiations (39). Au vu des résultats de l'équipe (2,40), nous avons regroupé les 2 sous-types classique et proneural en un seul que nous avons appelé CPN (Classique, ProNeural).

Enfin, la prolifération très rapide des GBM requièrent le développement de nouveaux vaisseaux. La sécrétion exagérée de VEGF par les cellules tumorales va aboutir à une prolifération microvasculaire aberrante résultant dans la formation de vaisseaux fragiles par manque de cellules de soutien (les péricytes) et d'une membrane plus fine des cellules endothéliales (41). Ce développement anarchique va ainsi conduire à une perfusion en oxygène hétérogène dans la tumeur, pouvant résulter en la création de niches péri-vasculaires et hypoxiques et de phases d'hypoxie alternant avec des phases de réoxygénation ; ce second phénomène est connu sous le nom d'hypoxie cyclique (42). Cette hypoxie favorise le passage vers un état quiescent et moins différenciées des cellules tumorales, ce dont témoigne la surexpression de marqueurs des CSG dans ces niches hypoxiques (43). Ceci rend les cellules plus résistantes à la radiothérapie et à la chimiothérapie, car ces thérapies tuent préférentiellement les cellules présentant une prolifération rapide. De plus, elles se situent dans des zones présentant moins de vaisseaux sanguins et sont de ce fait moins accessibles aux cellules immunitaires censées les éliminer (41).

Ainsi, le développement de traitements éliminant les CSG et/ou les cellules MES, en combinaison des thérapies standards, pourrait permettre de s'attaquer au réservoir de cellules dont émane la rechute du GBM. Outre un ciblage direct de ces cellules, il pourrait être également pertinent de s'attaquer aux facteurs qui favorisent l'émergence de ces sous-populations, tel que l'hypoxie (31).

iii. Un microenvironnement immunosuppresseur

Le SNC était historiquement considéré comme un organe immuno-privilegié, dépourvu de drainage lymphatique et donc capable de tolérer des antigènes normalement reconnus par le système immunitaire. Cependant, il a été montré depuis la présence de vaisseaux lymphatiques permettant le passage et la surveillance de cellules immunitaires dans le SNC (44). De plus, de nombreuses cellules myéloïdes dérivant des cellules de la microglie résident dans le SNC. Selon les stimuli (cytokines, interférons, agents, microbiens ...), ces macrophages engagent des programmes d'activation (45). Les macrophages M1, pro-inflammatoires, sont activés par des signaux de danger associés à des pathogènes ou des cellules cancéreuses, ou des cytokines pro-inflammatoires (IFN- γ). Ces macrophages sont impliqués dans le développement de

l'inflammation en phagocytant ces cellules reconnues comme dangereuses et en sécrétant de nombreuses cytokines inflammatoires (TNF- α , IL-6). A l'inverse, les macrophages M2, anti-inflammatoires, jouent un rôle important dans la protection de l'hôte en diminuant l'inflammation et en favorisant la réparation des tissus. Ils sont activés par des cytokines anti-inflammatoires (TGF- β , IL-4) et produisent essentiellement des facteurs inhibant les cellules immunitaires (TGF- β , IL-10) ou des facteurs proangiogéniques comme le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF).

Les cellules de GBM sécrètent de nombreuses cytokines et chimiokines, facteurs solubles qui attirent les cellules du système immunitaire, qui vont contribuer à la mise en place d'un microenvironnement tumoral particulièrement immunosuppresseur (46). En effet, d'une part, ces cellules produisent de grandes quantités de CCL2 permettant le recrutement de macrophages circulants au niveau du site tumoral (TAM), en surcroît des macrophages dérivés des cellules microgliales (47). D'autre part, les cellules tumorales produisent d'importantes quantités d'IL-10 et de TGF- β , activant l'ensemble des macrophages, dérivés de la microglie et associés aux tumeurs, vers un phénotype M2 anti-inflammatoire.

La production de ces cytokines immunosuppressives va également inhiber les cellules de l'immunité normalement responsable de l'élimination des cellules cancéreuses comme les lymphocytes T CD8⁺ (LT). En plus d'inhiber leur activité cytotoxique, l'exposition des LT au TGF- β va entraîner leur différenciation en LT régulateurs, caractérisés par l'expression du marqueur extracellulaire FoxP3, et ainsi bloquer l'activité des autres LT (48). Une forte infiltration immunitaire de LT régulateurs est associée dans le GBM à un moins bon pronostic (49). Cette immunosuppression est renforcée par l'expression de marqueurs extracellulaires par les cellules cancéreuses, tels que PD-L1 ou TIM-3, qui permettent leur échappement immunitaire. L'expression de ces marqueurs est associée à une moins bonne survie des patients (50,51).

4. Modèles précliniques actuels et leurs limites

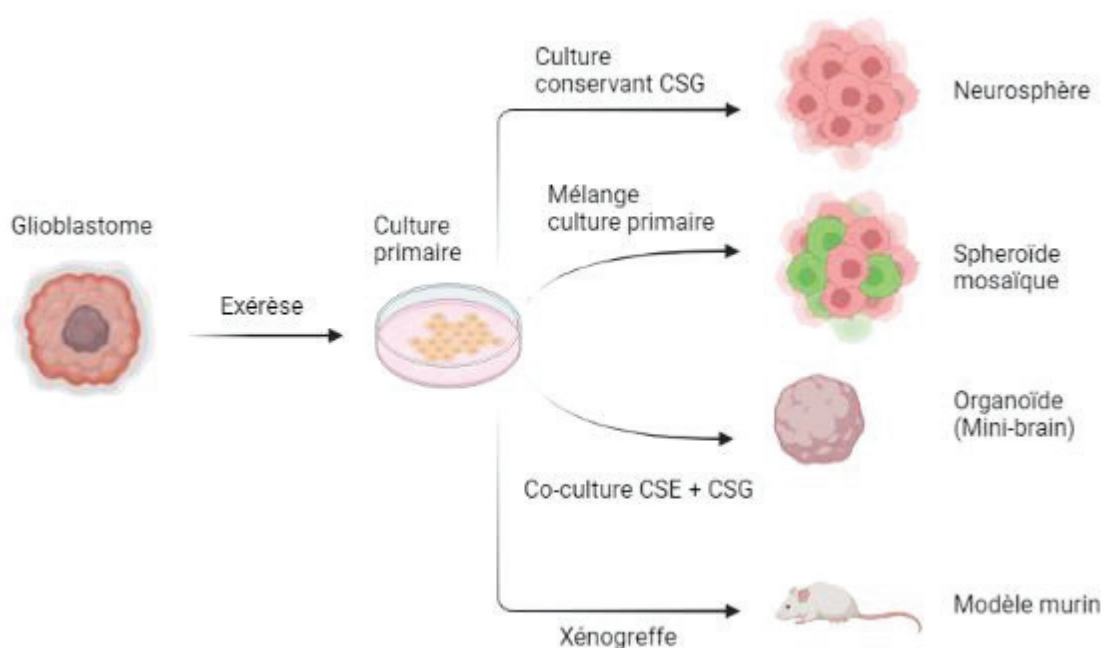


Figure 4 : Représentation schématique des différents modèles pouvant être obtenus à l'aide de culture primaire : une culture en milieu NSC permet le maintien des CSG et une organisation en neurosphère, un modèle pouvant associer plusieurs sous-types moléculaires afin d'obtenir un sphéroïde mosaïque, des organoïdes en cas de coculture des cellules souches embryonnaires (CSE) avec les CSG, et un modèle de xénogreffe dérivée de patient en cas de greffe chez une souris NSG.

Plusieurs modèles cellulaires de GBM sont utilisés pour des études précliniques, bien qu'aucun ne recrée parfaitement le devenir dans un organisme humain (Figure 4). Le plus simple est d'utiliser des lignées cellulaires humaines telles que les cellules U251 et U87 (52). Cependant, ces modèles ne sont représentatifs ni de l'hétérogénéité tumorale ni de la masse tumorale que l'on retrouve normalement chez un patient. Ils ne permettent pas non plus de recréer les différentes interactions des cellules tumorales entre elles. Il est également possible d'utiliser des cultures primaires de GBM, qui sont des cultures cellulaires dérivées de morceaux de tumeurs de patients récupérés lors de la résection chirurgicale et dissociés de manière mécanique. Ces cultures recréent l'hétérogénéité cellulaire observée dans le GBM, en présentant différents types cellulaires impliqués dans la croissance tumorale, dont les CSG. Ces cultures poussent naturellement sous forme de sphères dans un milieu de culture permettant le maintien des CSG (53). Il est donc facile d'obtenir des sphéroïdes à partir de ces cultures

permettant de caractériser le mécanisme d'élimination d'une masse tumorale, ce que ne permet pas une simple coculture avec des cellules dissociées. Elles permettent également de caractériser l'hétérogénéité moléculaire du GBM car elles présentent des cellules de signatures moléculaires différentes, pouvant être associées aux sous-types CPN ou MES (54). Cependant, ces cultures représentent majoritairement un sous-type, selon la localisation de la pièce tumorale récupérée par chirurgie, ce qui n'est pas représentatif de la répartition hétérogène des différents sous-types que l'on retrouve normalement dans la tumeur globale d'un patient. Une coculture de cultures primaires différentes pourraient permettre d'obtenir des sphéroïdes mosaïques, où cette association entre les sous-types MES + CPN serait recréée artificiellement. Néanmoins, ces cultures n'étant composées que de cellules tumorales, elles ne permettent pas de recréer le microenvironnement tumoral qui est normalement plus complexe.

Différents modèles d'organoïdes peuvent être développés à partir de coculture de tumeurs de patients et des cellules souches embryonnaires (55,56), de cellules pluripotentes induites ou de cellules souches adultes dérivés du cerveau (57,58). Ceci permet d'obtenir un modèle 3D plus complexe qu'un simple sphéroïde, associant des cellules saines à des cellules tumorales. Ce type de modèle donne un meilleur aperçu de la spécificité d'un traitement testé pour les cellules tumorales qu'un modèle 3D simple, et permet de mieux recréer le microenvironnement tumoral. Afin de complexifier davantage ce type de modèle, des études cherchent à rajouter une vascularisation par des cellules endothéliales, qui jouent un rôle important dans la composition du microenvironnement tumoral. Ceci peut par exemple être obtenu en mettant en coculture des cellules humaines endothéliales au début de la formation de l'organoïde et en rajoutant du VEGF dans le milieu de culture (59). Ces modèles ne permettent toutefois pas d'évaluer le devenir d'un traitement dans un organisme vivant, que ce soit pour sa circulation dans l'organisme ou son élimination par celui-ci.

Enfin, il est possible de réaliser des greffes de cellules cancéreuses sur des souris, afin d'obtenir un modèle murin permettant l'évaluation d'un traitement anti tumoral *in vivo*. Cette greffe peut être réalisée en sous-cutané, afin d'être facilement accessible pour la mesure du volume tumoral, ou en orthotopique, à la localisation habituelle de la tumeur, afin de mieux recréer l'environnement habituel de la tumeur. Différents modèles murins peuvent être générés, selon le type de souris recevant la greffe et l'origine des cellules greffées. Afin de maintenir au mieux les caractéristiques et l'environnement de la tumeur évaluée, le modèle le plus adapté est de réaliser une xénogreffe dérivée de l'exérèse de la tumeur d'un patient sur une souris. Si les

cellules greffées ne sont pas d'origine murine, la souris hôte doit être immunodéprimée afin d'éviter le rejet de la greffe. Il faut toutefois noter que la souris hôte étant dépourvue de système immunitaire, ce modèle est peu adapté pour l'évaluation d'une immunothérapie car elle ne permet pas d'évaluer l'impact du système immunitaire de l'hôte sur le traitement administré (60). Un modèle syngénique peut être mis en place en utilisant des cellules d'origine murine, ce qui permet d'utiliser un animal hôte immunocompétent. Toutefois, aucun modèle murin ne permet de reproduire exactement ce qu'il se passerait dans un organisme humain. De plus, le nombre d'animaux testés est souvent faibles, celui-ci étant généralement réduit au maximum pour des raisons éthiques et économiques, ce qui rend les conclusions sur de tels modèles sujettes à précaution.

Ainsi, le manque de modèle permettant une évaluation fiable de l'efficacité des traitements sur le GBM peut expliquer la mauvaise transition vers la clinique de thérapie pourtant prometteuse lors d'études précliniques. Ceci peut expliquer le manque de progrès thérapeutique réalisé dans le GBM ces dernières années.

2) Immunothérapie et glioblastome

Le manque de prise en charge efficace des patients à la récurrence nécessite le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques. Compte tenu de l'essor et de l'efficacité de l'immunothérapie dans d'autres cancers, elle constitue une nouvelle piste pour mettre au point des traitements efficaces sur le GBM.

1. Différentes approches immunothérapeutiques dans le glioblastome

On distingue deux grands types d'immunothérapie (Figure 5) : l'immunothérapie active, cherchant à stimuler directement le système immunitaire du patient (vaccin, inhibiteur de point de contrôle immunitaire), et l'immunothérapie passive, qui va introduire chez le patient les effecteurs immunitaires directement responsables de l'activité recherchée (transfert cellulaire adoptif d'effecteurs immunitaires, anticorps thérapeutiques, virus oncolytiques).

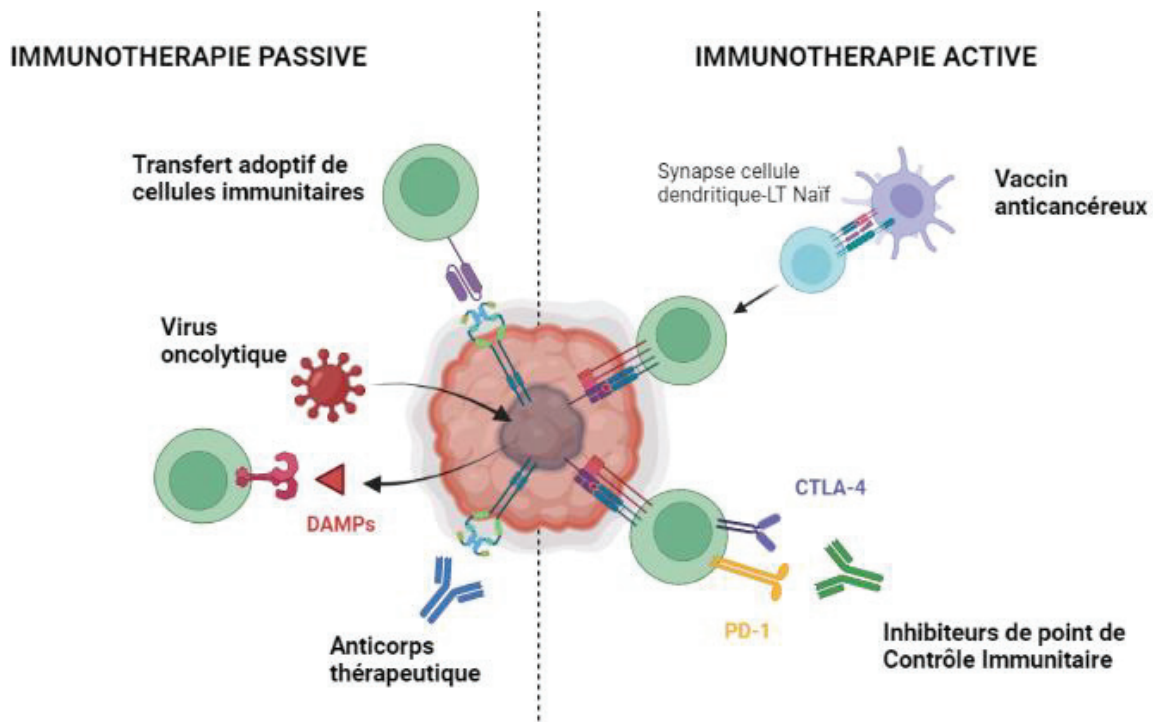


Figure 5 : Représentation des différentes approches immunothérapeutiques dans le GBM. D'un côté l'immunothérapie passive comprenant le transfert adoptif de cellules immunitaires (notamment de LT CAR) et d'anticorps thérapeutique reconnaissant directement une cible désignée (ici l'EGFR), et l'administration de virus oncolytique se répliquant dans les cellules tumorales et libérant des signaux de danger (DAMP) permettant le recrutement de cellules immunitaires. De l'autre côté, l'immunothérapie active comprend la vaccination anticancéreuse, utilisant des cellules dendritiques pour présenter un antigène d'intérêt au LT Naïf leur permettant ensuite de reconnaître et d'éliminer les cellules tumorales, et les inhibiteurs de checkpoint immunitaire, qui permettent de bloquer des récepteurs ou des ligands aboutissant à l'épuisement des cellules immunitaires éliminant les cellules cancéreuses.

i. Anticorps

Il existe 2 catégories d'anticorps utilisables en immunothérapie :

- Les anticorps thérapeutiques, ciblant un antigène présent sur les cellules tumorales et pouvant induire leur mort directement ou par une cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps (ADCC). Dans le GBM, des anticorps dirigés contre l'EGFR et son variant EGFRvIII ont été évalué en clinique. (61,62)
- Les Inhibiteurs de point de Contrôle Immunitaires (ICI), qui sont des anticorps cherchant à bloquer les voies de signalisation à l'origine d'une suppression de l'activité

des effecteurs immunitaires et surexprimées dans le GBM. On retrouve notamment ceux dirigé contre la protéine PD-1 (Programmed cell Death-1) et la protéine CTLA-4 (Cytotoxic T-Lymphocyte Associated protein-4), des checkpoints inhibiteurs des LT responsables de l'élimination des cellules tumorales par le système immunitaire. Seule une étude clinique a publié des résultats utilisant un anti-PD-1, le pembrolizumab, mais d'autres sont en cours portant sur des anti-PD-1 et des anti-CTLA-4. (63–65)

Toutefois, ces catégories sont toutes deux limitées par le faible infiltrat immunitaire que l'on retrouve dans le GBM, et qui est nécessaire à leur action. De plus, les anticorps passent généralement peu la BHE, ce qui réduit leur présence au site tumoral.

ii. Vaccins

L'objectif de la vaccination anti-cancéreuse est de rendre le système immunitaire d'un patient capable de reconnaître les cellules tumorales afin d'induire une réponse immunitaire endogène spécifique de ces cellules. Cette vaccination peut être obtenue en introduisant un peptide exprimé spécifiquement par la tumeur, à l'aide de cellules dendritiques chargées d'un antigène tumoral et capables de le présenter aux cellules du système immunitaire. L'injection d'ADN ou d'ARN permettant de produire la protéine d'intérêt peut également être envisagée. Différents essais cliniques utilisant ces différentes stratégies ont été réalisés avec des patients présentant des GBM. Ils montrent un profil de tolérance correct, mais aucune amélioration de survie globale des patients n'a pu être mise en évidence (66,67). Cette absence d'effet peut être expliquée par une expression hétérogène ou une perte d'expression de la cible par les cellules tumorales résultant en une faible efficacité thérapeutique (68). D'autres études sont actuellement en cours utilisant des vaccins dirigés contre plusieurs cibles ou basées sur les cellules du patient traité, permettant de dépasser ce problème d'hétérogénéité tumorale.

iii. Virothérapie oncolytique

La virothérapie est l'utilisation de virus se répliquant et tuant spécifiquement les cellules tumorales. Ce phénomène va s'accompagner de la libération de signaux moléculaires associés à un danger (DAMP) qui vont être reconnus par le système immunitaire et agir comme un stimulus suffisamment fort pour recruter davantage de cellules effectrices et induire une réponse immunitaire anti tumorale efficace. Différents virus sont utilisables, selon leur faible pathogénicité pour les cellules saines et leur tropisme naturel pour les cellules tumorales et/ou

pour le SNC (69). Ils peuvent également faire l'objet de modifications génétiques, afin d'améliorer leur reconnaissance des cellules tumorales ou de leur faire produire des cytokines pour stimuler davantage le système immunitaire. Plusieurs études cliniques sur des patients atteints de GBM montrent que les effets indésirables graves sont très rares avec ces virus, et des réponses complètes et durables ont pu être mises en évidence (70,71).

iv. Transfert adoptif de lymphocytes T CAR

1. Transfert de lymphocytes T

Compte tenu de l'association positive existant entre survie globale des patients et infiltration lymphocytaire intratumorale, une approche thérapeutique récente développée en immunothérapie anticancéreuse consiste en un transfert cellulaire adoptif de LT chez un patient afin d'exploiter la spécificité naturelle de ces cellules immunitaires et de potentialiser leur efficacité. Son processus implique l'isolement de LT exprimant à leur surface des récepteurs reconnaissant des antigènes exprimés par les cellules tumorales, suivi de leur expansion in vitro, leur conditionnement et leur réinjection chez le patient. Leur efficacité varie en fonction de leur différenciation en LT cytotoxiques qui capables d'induire la mort des cellules exprimant l'antigène. Toutes ces propriétés sont remplies par les LT infiltrant la tumeur (TIL). Cependant, une simple injection de LT chez un patient n'est pas suffisante pour induire une réponse anticancéreuse, principalement due à une faible affinité des TCR exprimés par les TIL pour les antigènes tumoraux. En effet, cette reconnaissance implique la présentation de l'antigène par les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH), une costimulation par les cellules présentatrices d'antigène et un environnement cytokinique favorable à la différenciation en LT cytotoxiques. Cependant, les cellules tumorales mettent en place différents mécanismes leur permettant d'échapper à ces différents processus, par la perte d'expression de molécules du CMH ou la sécrétion de cytokines anti-inflammatoires par exemple, et ainsi échapper à leur reconnaissance et leur lyse par les LT. Si quelques études cliniques ont rapporté l'intérêt d'un transfert adoptif de TIL dans le traitement des GBM, le fort caractère immunosuppresseur des GBM a rapidement souligné les limites de tels traitements (72).

2. Lymphocytes T CAR

Plusieurs approches sont actuellement développées dans le but d'améliorer cette reconnaissance, en particulier, le développement de LT modifié pour exprimer un Récepteur Chimérique à l'Antigène (CAR). Ces LT sont génétiquement modifiés pour exprimer à leur

surface un récepteur dérivé d'un anticorps permettant leur activation spécifiquement après reconnaissance de l'antigène tumoral ciblé, sans avoir à engager les molécules du CMH. Les LT CAR sont produits à partir de LT isolés par leucophérèse de sang de patient. Les LT ainsi récupérés sont amplifiés *in vitro* à l'aide de cellules nourricières et d'interleukine-2 (IL-2), puis transduits avec un vecteur rétroviral porteur du transgène CAR. Après transduction, les LT CAR sont sélectionnés puis amplifiés pour obtenir la quantité de LT CAR nécessaire à la transfusion chez le patient.

Ce type de récepteur, structure chimérique entre un anticorps et un TCR, a été décrit pour la première fois en 1989 et était initialement constitué des parties suivantes (Figure 6) (73) :

- Une partie extracellulaire reconnaissant l'antigène cible, appelée fragment variable à simple chaîne (scFv). Celle-ci est dérivée des fractions légères et lourdes du segment hypervariable d'un anticorps reconnaissant l'antigène et reliées entre elles par une section de liaison, dite *linker*.
- Une section charnière, dite *hinge*, reliant la partie extracellulaire à la partie transmembranaire.
- Une partie transmembranaire constituée d'une hélice alpha hydrophobe dérivant de certains récepteurs constitutifs des LT (CD28, CD3, CD8).
- Une partie intracellulaire comprenant un ou plusieurs modules d'activation construit à partir de la chaîne ζ du CD3, la partie fonctionnelle du TCR composée de motifs d'activation immuns dépendant de la tyrosine (ITAM). Par la suite, des modules de costimulation (CD28 ou 4-1BB) dérivés de la partie fonctionnelle des récepteurs activateurs a été ajouté à la partie intracellulaire du CAR dans le but améliorer la survie et l'activation des LT CAR (74).

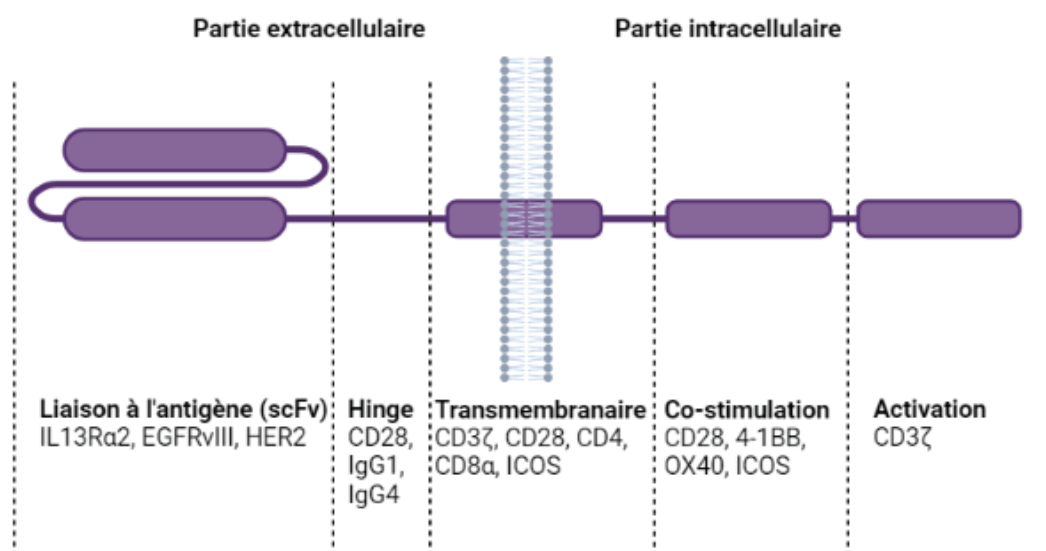


Figure 6 : Représentation schématique des différentes parties composant un CAR fonctionnel. Pour chaque domaine, les différentes possibilités de modulation possibles sont indiquées. Adapté de Rafiq et al (75).

Les LT CAR ont montré des résultats impressionnants dans le traitement de certains cancers d'origine hématologique, notamment de leucémies lymphoïdes et de lymphomes à cellules B. En effet, des LT CAR ciblant le CD19, un marqueur aberrant des lymphocytes B exprimé par toutes les cellules tumorales des 2 cancers susmentionnés, ont montré une rémission importante chez les patients traités. Le bénéfice clinique obtenu est cependant limité par un effet indésirable important, le syndrome de relargage cytokinique (CRS). Ce syndrome provoqué par une libération massive de médiateurs de la réaction immunitaire suite à l'activation trop importante des LT CAR injectées, peut entraîner différentes défaillances d'organes, voire causer la mort du patient traité (76–78). Ces résultats prometteurs ont cependant permis d'obtenir 2 autorisations de mise sur le marché des LT CAR-CD19, en 2019 et en 2020, en 3^e ligne dans le traitement de ces cancers, avec une amélioration de service médical rendu considéré comme mineure à modérée par la haute autorité de santé (79,80). En conséquence, de nombreuses études cherchent à exporter ces résultats à d'autres cancers, et notamment le GBM.

3. Evolution de l'ingénierie des CAR

La conception des CAR a énormément évolué depuis 1989 donnant naissance à plusieurs générations de CAR qui vont principalement différer par la structure de leur domaine intracellulaire (Figure 6). En effet, les CAR peuvent être optimisés pour augmenter leur

efficacité thérapeutique tout en minimisant leurs effets indésirables en jouant sur leur spécificité, leur survie et leur adressage. Ainsi, si l'antigène tumoral est particulier, chaque partie du CAR décrite plus haut peut varier en fonction des domaines protéiques dont elle dérive, ce qui permet de nombreuses combinaisons dans leur construction. Le choix des modules intracellulaires utilisés conditionne la capacité de prolifération et d'épuisement des LT CAR correspondants, et par conséquent leur efficacité thérapeutique.

La 1^{re} génération de CAR (Figure 7) ne comprenait que la partie fonctionnelle du domaine CD3ζ entraînant une faible activation lymphocytaire suite à la reconnaissance de la cible. Puisque l'addition d'interleukine IL-2 augmente l'activation des LT CAR (81), un domaine de costimulation (initialement CD28) permettant la production d'IL-2 a été ajouté au CAR (82). Ces CAR de 2^e génération ont été les premiers à démontrer une réelle efficacité clinique et sont utilisés aujourd'hui dans la production des LT CAR en clinique (77,78). La 3^e génération de CAR est caractérisée par l'introduction d'un 2^{ème} domaine de costimulation dans le but d'augmenter l'activation des LT CAR. L'addition d'un domaine permettant la sécrétion de cytokines ou de chimiokines qui vont jouer un rôle d'« armure » en rendant l'environnement tumoral moins hostile à l'activité des LT CAR est à l'origine de la 4^{ème} génération de CAR (83). Une 5^e génération est actuellement décrite avec l'ajout de domaine intracellulaire permettant l'expression de récepteurs à cytokines, qui va créer un signal supplémentaire pour permettre une bonne prolifération et activation des LT CAR (84).

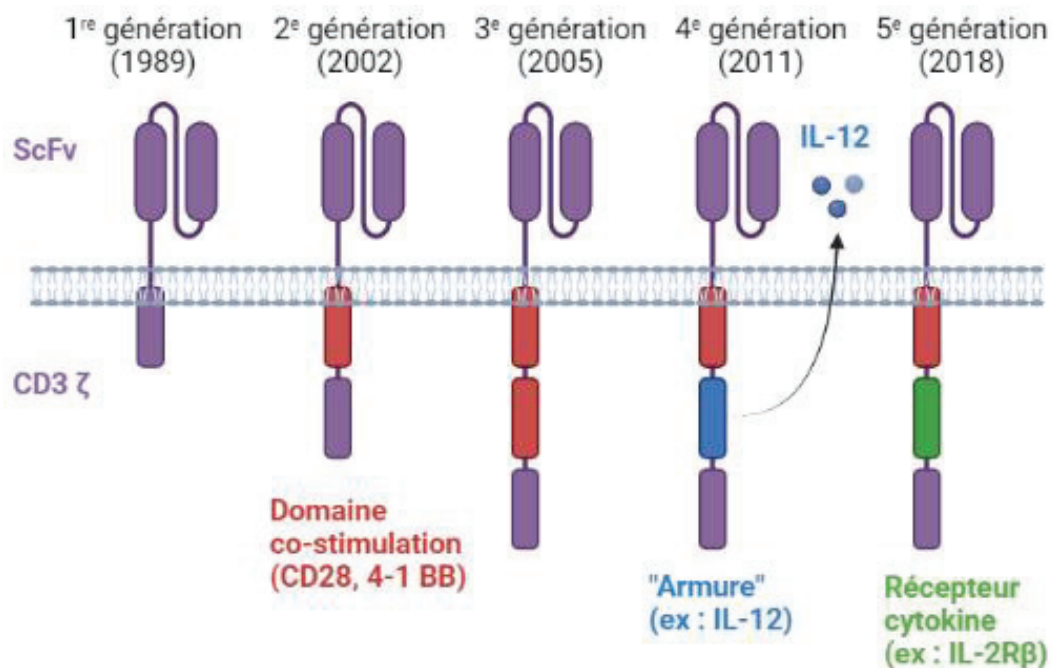


Figure 7 : Structure des différentes générations de CAR. Chaque génération est indiquée avec la date de leur première utilisation préclinique, et avec les différents domaines intracellulaires caractéristiques de leur structure.

Les essais ayant utilisé des LT CAR chez des patients atteints de GBM ne ciblaient qu'une partie des cellules tumorales. Une solution à ce problème peut être d'utiliser des CAR dits multi spécifiques, capables de reconnaître 2 ou 3 antigènes différents et de s'activer suite à la reconnaissance de l'un d'entre eux. Les études utilisant ce type de CAR sur des modèles de GBM murin montrent une meilleure survie des souris, particulièrement à moyen terme, ce qui peut s'expliquer par un échappement moins important des cellules tumorales à la reconnaissance des LT injectés du fait de la reconnaissance de plusieurs épitopes présents sur les cellules cibles (85).

Outre l'optimisation du CAR lui-même, il est également possible de créer des récepteurs Notch synthétiques, qui sont des récepteurs jouant un rôle d'interrupteurs on/off. Ils sont construits à partir du domaine fonctionnel du récepteur Notch, qui est normalement impliqué dans la différenciation cellulaire, et d'une partie synthétique extracellulaire reconnaissant un antigène d'intérêt, qui est généralement une cible exprimée spécifiquement par les cellules tumorales. Ce récepteur va induire l'expression d'un CAR reconnaissant une cible fortement exprimée par

ces mêmes cellules suite à l'activation du récepteur Notch (75,86). Ceci permet de contrôler l'expression d'un CAR peu spécifique des cellules tumorales par les LT administrés à des zones exprimant un antigène spécifique de ces cellules (87). Pour pouvoir contrôler davantage l'activité des LT CAR, on peut aussi leur ajouter un système de gène suicide, qui va permettre d'induire la mort des LT CAR injectées chez le patient si elles sont exposées à une certaine molécule. Par exemple, on peut introduire un gène de sensibilité au ganciclovir, afin d'induire la mort des LT CAR en utilisant ce traitement, qui est un antiviral particulièrement bien toléré, pour stopper une activation massive des LT et ainsi éviter des effets indésirables trop importants chez le patient traité. (88)

2. Etat des lieux du transfert adoptif des LT CAR contre le GBM en clinique

Plusieurs essais cliniques utilisant des LT CAR ont été réalisés chez des patients atteints de GBM récidivant. Ces essais étaient de phase I/II, dont le but a été de déterminer la faisabilité et l'absence de toxicité importante du traitement testé et d'avoir un premier aperçu de l'efficacité de ces traitements une fois introduit chez le patient.

i. Cibles explorées

Plusieurs cibles ont été explorées, soit en raison de leur spécificité d'expression par les cellules de GBM, soit parce qu'elles sont très surexprimées par celles-ci et peu exprimées par les cellules saines :

- Le premier essai clinique à certifier la faisabilité et la sécurité de l'administration de LT CAR chez patients atteints de GBM a été publié en 2015 et ciblait le récepteur $\alpha 2$ à l'IL-13 (IL13R $\alpha 2$), qui est surexprimé par 50% des cellules de GBM, chez les CSG et les cellules plus différenciées, et n'est pas exprimé par les cellules saines (89).
- EGFRvIII, un variant du récepteur à l'EGF fréquemment surexprimé par les cellules de GBM (environ 30% des cas nouvellement diagnostiqués) (90).
- HER2, qui est retrouvé surexprimé par 80% des cellules de GBM mais pas par les cellules gliales saines. En revanche, on peut le retrouver exprimé à de faibles niveaux au niveau cardiaque, et le trastuzumab, un anticorps ciblant HER2 utilisé dans le traitement du cancer du sein, est connu pour causer des atteintes cardiaques (91).

- EphA2, un récepteur impliqué dans la mobilité cellulaire et l'angiogénèse, qui n'est pas retrouvé normalement dans le cerveau mais est exprimé par les cellules de GBM et dans le poumon (92).

ii. Effets cliniques

Les différents essais cliniques réalisés sur quelques patients (entre 1 et 17 en fonction des études) ont, dans l'ensemble, montré des résultats encourageants avec une augmentation de la survie globale des patients pouvant aller de 8 à 14 mois. Ces résultats nécessitent toutefois d'être confirmée par des études comparatives avec un plus grand nombre de patients. Il est à noter que lors du traitement avec les LT-CAR anti-IL13R α 2, une métastase a été observée chez l'un des patients (89). De plus, une perte d'expression de l'antigène cible par les cellules tumorales a été observée (89,91). Si ces résultats soulignent l'activité antitumorale spécifique des LT CAR, ils révèlent également l'une des principales limites de l'efficacité de cette approche.

L'apparition d'effets indésirables et de toxicités potentielles était le point d'intérêt principal de ces études. Ceux-ci ont essentiellement consisté en des maux de tête et des symptômes neurologiques (tremblements, langue déviée, épilepsie), qui étaient attendus du fait de la localisation de la tumeur dans le SNC. Le SRC, surveillé par un dosage sérique de cytokines pro-inflammatoires, notamment l'IL-6 et l'IFN- γ , pu être mis en évidence chez quelques patients. Enfin, des toxicités induites par l'expression de la cible par des cellules non tumorales, effets qualifiés de « on-target, off-tumor », ont pu être observé en fonction des cibles. Par exemple, 2 patients sur les 3 traités avec les LT CAR anti-EphA2 ont présenté des œdèmes pulmonaires, du fait de l'expression de EphA2 par les cellules pulmonaires (92). Ces effets indésirables ont tous pu être pris en charge avec un traitement par la dexaméthasone, un anti-inflammatoire de la classe des corticostéroïdes communément utilisé en clinique. Les données montrent une survie globale pouvant aller de 8 à 14 mois, ce qui est un bénéfice encourageant par rapport à la survie globale observée normalement lors des rechutes.

iii. Modalités d'administration

Les doses injectées dans les différents essais cliniques sont en général du même ordre de grandeur, de $10 \cdot 10^6$ LT CAR par injection à $100 \cdot 10^6$. Ils diffèrent davantage sur le mode d'administration et leur fréquence, avec une dose unique ou plusieurs doses. Parmi les différentes voies d'administration, la plus utilisée dans ces essais est la voie intraveineuse (IV).

Cependant, l'infiltration des LT au niveau du site tumoral par cette voie est limitée, en particulier dans le cadre des GBM où le cerveau est protégé par la BHE. Ainsi, l'administration en IV de LT CAR anti-EGFRvIII est associée à une très faible infiltration tumorale des LT CAR, la majorité d'entre eux restant dans le sang périphérique chez la plupart des patients traités. Si l'augmentation du nombre de LT CAR injectée pourrait à priori permettre une plus grande infiltration tumorale et par conséquent une plus grande efficacité, cette stratégie exposerait le patient à un risque accru de CRS. De plus, une toxicité « off tumor » plus importante pourrait être observée, particulièrement si la cible est exprimée par des cellules saines qui peuvent alors être reconnues par les LT CAR circulant dans le sang périphérique. Dans le cadre du GBM, l'administration des LT CAR peut également être réalisée par voie intracérébrale. Ce mode d'administration nécessite la pose d'un cathéter de Rickham lors de la résection tumorale, qui va permettre d'injecter les LT directement au niveau du site tumoral et de manière répétée si besoin. Cette voie, utilisée dans l'essai réalisé par Brown et al. pour l'injection des LT CAR anti-IL13R α 2, a permis d'augmenter le nombre de LT CAR présents dans la tumeur pour un même nombre de LT injectés (89). De manière importante, l'injection des LT CAR par voie intracérébrale semble bien tolérée.

iv. Association thérapeutique

La radiothérapie, qui tient une place prépondérante dans le protocole thérapeutique actuel contre le GBM, agit en endommageant l'ADN des cellules tumorales, ce qui peut induire une mort directe des cellules mais peut aussi affecter l'expression de nombreuses molécules exprimées par les cellules tumorales suite à la réparation de l'ADN endommagé. Elle est notamment connue pour augmenter l'expression des ligands du récepteur NKG2D (93) et de molécules du CMH de classe I (94), pouvant augmenter la reconnaissance des cellules tumorales par les LT. La réparation de l'ADN peut aussi conduire à des mutations génétiques aboutissant à l'expression d'antigènes aberrants, appelés néo-antigènes tumoraux (95). Ceux-ci sont spécifiques des cellules tumorales, ce qui en fait des cibles potentielles intéressantes pour une immunothérapie ciblée. Il faut toutefois noter qu'ils sont spécifiques d'un individu, ce qui complique la production d'une thérapie ciblée car il est difficile d'anticiper l'apparition de ces néo-antigènes (96). L'élimination des cellules tumorales mourantes par le système immunitaire va également activer la voie cGAS-STING, qui va induire une production d'interféron de type I et de chimiokines permettant le recrutement de cellules immunitaires au niveau du site tumoral (97). Cette capacité d'induire une réponse immunitaire antitumorale loin du site irradiée,

appelée effet abscopal, pourrait être exploitée dans un contexte de transfert adoptif de LT CAR. En effet, la radiothérapie pourrait permettre d'augmenter l'efficacité thérapeutique de cette approche en augmentant le recrutement, l'infiltration et l'activation des LT CAR sur le site tumoral. Il faut toutefois noter que la radiothérapie peut aussi être associée à l'augmentation de facteurs considérés comme immunosuppresseurs, comme l'induction d'une hypoxie ou de cytokines anti-inflammatoires (TGF- β) (97). L'optimisation de la dose et de son fractionnement semble jouer un rôle important dans cette balance : alors qu'une dose de 8 Gy sur 3 séances consécutives peut stimuler la réponse immunitaire innée, une seule dose de 20 Gy ne permet pas d'obtenir cet effet (98).

L'association d'un transfert de LT CAR avec d'autres types d'immunothérapie sont également à l'étude. Par exemple, une combinaison avec les Inhibiteurs de point de Contrôle Immunitaires (ICI), qui s'opposent aux mécanismes d'épuisement des LT, permettrait d'augmenter l'activité cytotoxique des LT CAR dans le temps (99). Cette stratégie est actuellement évaluée actuellement en clinique contre le GBM, en associant des LT CAR anti-IL13R α 2 avec du nivolumab et/ou de l'ipilimumab (100), respectivement inhibiteurs de PD-1 et de CTLA-4. L'injection combinée de LT CAR avec des virus oncolytiques, qui ont la capacité d'augmenter le recrutement des TIL grâce à la libération de signaux de danger et d'antigènes associés à la tumeur suite à leur action oncolytique, constitue également une piste intéressante à explorer (69). En effet, cette combinaison permettrait d'améliorer la migration et la persistance des LT CAR dans les tumeurs et ainsi d'augmenter l'efficacité thérapeutique des LT CAR (101).

v. Effecteurs

Les LT CAR développés dans ces essais sont produits à partir de LT présentant le marqueur CD8 (LT CD8⁺), qui exercent un rôle de cellules tueuses grâce à leur effet cytotoxique. Cependant, ces lymphocytes présentent naturellement un TCR qui reconnaît les molécules du CMH présents à la surface de toutes les cellules du corps humain et permettant de discerner les cellules de l'organisme. En l'absence de compatibilité entre les LT et les autres cellules, ces dernières seront reconnues comme n'appartenant pas au soi et seront éliminées par les LT. En conséquence, les LT CD8⁺ sont limités à des contextes de greffe autologue, c'est-à-dire que l'on utilise les LT d'un patient pour traiter uniquement ce patient, afin d'éviter les risques de rejet de greffon contre l'hôte, qui peuvent entraîner une défaillance multiviscérale pouvant être fatale.

Dans l'optique d'un transfert de LT CAR allogénique, c'est-à-dire entre 2 individus, plusieurs stratégies sont possibles. Tout d'abord, il est possible de modifier les LT pour éteindre l'expression de leur TCR natif. Cependant, cette stratégie requiert une étape supplémentaire lourde dans la production des LT CAR. Il est également possible d'utiliser d'autres effecteurs immunitaires cytotoxiques pour la production de LT CAR qui ne reconnaissent pas les molécules du CMH. C'est le cas des lymphocytes Natural Killer (LNK), qui possèdent une cytotoxicité naturelle basée sur la reconnaissance de motifs exprimés par des cellules infectées ou tumorales, et indépendante d'une première exposition à un antigène présent sur les cellules cibles. La reconnaissance de ces motifs entraîne l'activation des LNK, s'ils sont reconnus par un récepteur activateur comme le NKG2D, ou leur inhibition, s'ils sont reconnus par un récepteur inhibiteur comme NKG2A. L'effet thérapeutique des LNK dépendra donc de l'équilibre entre les signaux activateurs et inhibiteurs (102). Bien que ces cellules apparaissent comme une plateforme intéressante pour l'introduction d'un CAR, les LNK sont difficiles à cultiver et présentent un temps de doublement faible. Il est par conséquent difficile d'en obtenir un nombre suffisant dans le cadre d'un traitement que ce soit à partir d'un patient ou d'un donneur sain. Toutes les études pré-cliniques réalisées aujourd'hui sont effectuées avec une lignée cellulaire de LNK dérivée d'un patient atteint d'un lymphome non Hodgkinien à cellules NK, la lignée NK-92. Si cette lignée présente le double avantage d'une prolifération rapide et de l'absence d'expression du récepteur inhibiteur KIR (103), elle interroge sur l'éthique et la sécurité d'une administration de LNK d'origine tumorale chez un patient. Des essais cliniques utilisant des cellules NK-92 pour traiter des tumeurs solides (sarcomes) ou hématologiques (leucémie, lymphome) ont été menés. Bien qu'elles ne révèlent aucun effet indésirable à court terme d'une administration de cette lignée, aucune de ces études ne permet de conclure sur la persistance ou de risques à long terme de cette lignée dans l'organisme (104,105). D'autres effecteurs immunitaires cytotoxiques présentent des caractéristiques similaires aux LNK, notamment une reconnaissance directe des motifs présents à la surface de cellules stressées sans présentation des molécules du CMH, les LT $\gamma\delta$. Ces cellules seront présentées plus en détail dans une prochaine partie (§3.2).

L'ensemble de ces résultats est prometteur pour l'utilisation de LT CAR dans le traitement des GBM et pose les premières bases. Ainsi, s'il est aujourd'hui encore difficile d'identifier le protocole immunothérapeutique le plus efficace, l'administration en intracérébrale semble la plus efficace et devrait être à privilégier dans les futurs essais cliniques utilisant les LT CAR

dans le traitement des GBM. Enfin, il est important de noter que les effets indésirables observés sont potentiellement minorés par l'activité transitoire des LT CAR sur les tumeurs ciblées. En effet, une efficacité antitumorale plus importante pourrait s'accompagner d'une plus grande toxicité, notamment la formation d'œdème cérébral qui peut s'avérer fatal pour les patients.

3) Proposition d'une approche immunothérapeutique originale avec des LT V γ 9V δ 2 ciblant un ganglioside

1. Une cible atypique, le ganglioside GD2 O-acétylé

i. Structure et synthèse des gangliosides

Les gangliosides sont des lipides complexes liés à des sucres qui appartiennent à la famille des glycosphingolipides. Ces molécules sont composées d'un sphingolipide particulier, le céramide, lié par une liaison éther à des résidus glucose et galactose (Figure 9). Ces sucres sont eux-mêmes liés à un ou plusieurs acides sialiques dont la nature, le nombre et le site permet d'identifier l'espèce de ganglioside considéré. Ainsi, d'après cette nomenclature, le GD2 est un Ganglioside composé de 2 acides sialiques (Disialoganglioside) et qui migre en 2eme position sur chromatographie en coupe mince (Figure 8).

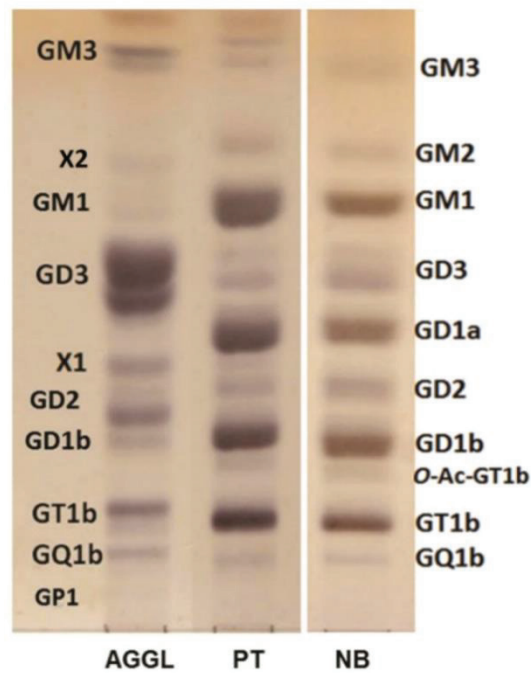
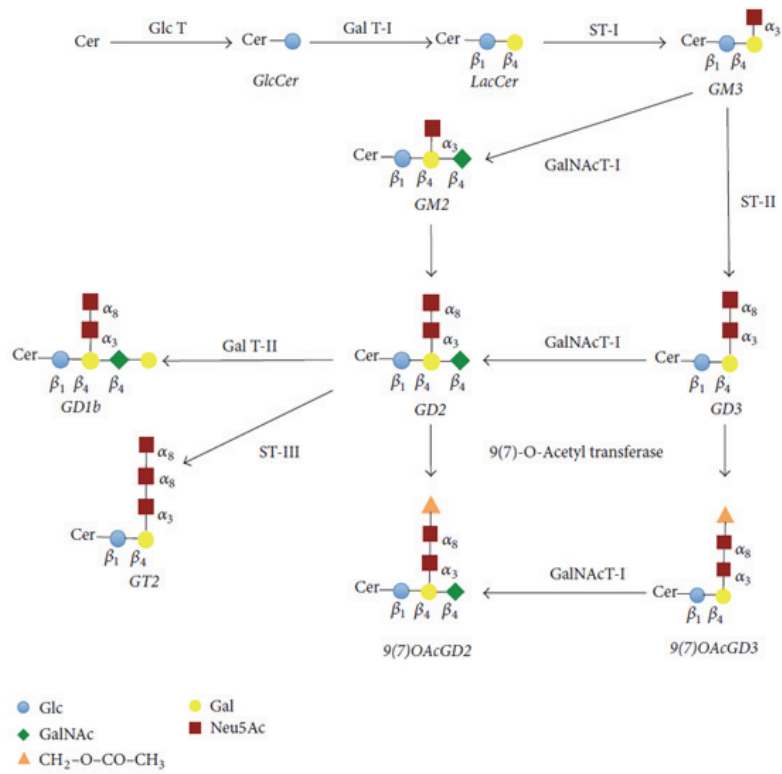


Figure 8 : Gangliosides séparés par chromatographie sur couche mince haute performance, suivie d'une coloration au resorcinol. Isolés à partir de gangliogliome anaplasique (AGGL), tissu péri tumoral (PT) ou de tissu cérébral sain (NB) (106).

Plus précisément, les 2 acides sialiques sont ajoutés successivement par les sialyltransferase I et II sur le résidu galactose du GD2 (Figure 9A). A ce galactose, un galactose supplémentaire est ajouté puis N-acétylé par la N-acetyl-galactosyltransferase I (B4GALNT1), aussi appelé GD2 synthase (Figure 9A). Enfin, une O-acétylation du résidu sialique $\alpha 8$ du GD2, en position 7 ou 9, permettra la synthèse de l'OAcGD2 (Figure 9B). L'enzyme impliquée dans cette O-acétylation n'a pas encore été clairement identifiée, mais des faisceaux d'arguments suggèrent l'implication de l'enzyme CASD1 (Cas 1 domain containing 9(7)-O-Acetyl transferase) (107).

A



B

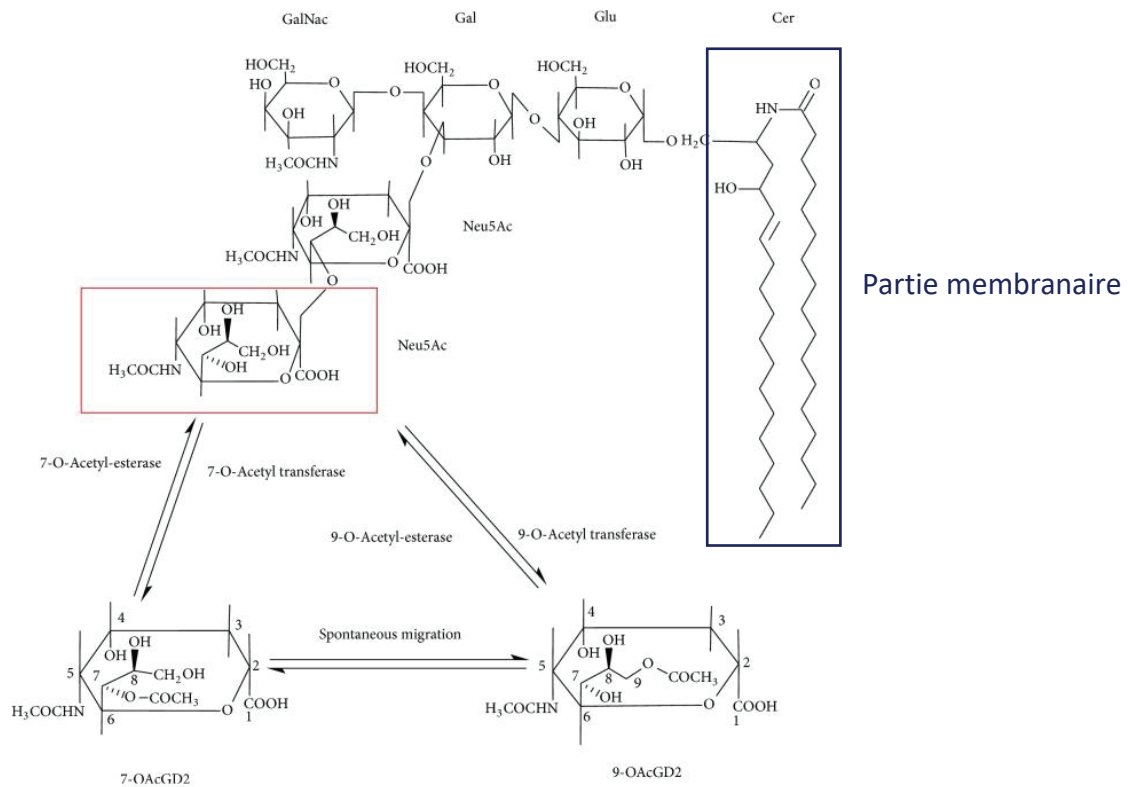


Figure 9 : (A) Représentation schématique des voies impliquées dans la synthèse du OAcGD2 (108). (B) Structure du GD2 O-Acétyle. Le céramide (Cer) permet l'adhésion à la membrane plasmique, tandis que l'autre partie du OAcGD2 est extracellulaire. La O-acétylation a lieu sur le résidu $\alpha 8$ (encadré en rouge) en position 7 ou 9, et pouvant migrer spontanément d'une position à l'autre.

L'expression des différents gangliosides est très souvent corrélée à l'expression des enzymes glycosyltransférases impliquées, elles-mêmes régulées principalement de manière transcriptionnelle (109). En effet, ces enzymes sont exprimées uniquement dans certaines cellules et/ou tissus et à certains stades de développement embryonnaire. Des régulations épigénétiques, passant par l'acétylation des histones, et traductionnelles, notamment de N-glycosylation et de phosphorylation des enzymes responsables de la synthèse des gangliosides, ont également été mises en évidence (110,111).

ii. Fonction des gangliosides

Les gangliosides sont généralement exprimés sur le feuillet externe de la membrane plasmique des cellules, leur base céramide étant intramembranaire tandis que la partie glycosylée plus hydrophile se situe au niveau extracellulaire (Figure 9B). Leurs interactions avec d'autres molécules, tel que des phospholipides, le cholestérol ainsi que des protéines transmembranaires spécifiques ont été décrites. Les gangliosides peuvent ainsi former des rafts lipidiques où ils jouent un rôle important en modulant certains récepteurs à la tyrosine kinase. Par exemple, une forte expression du GD3 peut activer le récepteur au facteur de croissance, résultant en une plus grande croissance des cellules tumorales. Ils peuvent aussi intervenir dans la mobilité cellulaire, le GD2 jouant un rôle dans l'adhésion de la membrane cellulaire à des protéines d'adhésion, telles que le collagène ou la fibronectine, en permettant une interaction électrostatique entre la membrane et ces protéines grâce aux résidus sialiques du GD2 (112). Enfin, les gangliosides peuvent aussi jouer un rôle dans la différenciation cellulaire (113).

La modulation des fonctions des gangliosides par la O-acétylation est encore peu comprise. Les gangliosides O-acétylés sont généralement associés à des processus d'adhésion cellulaire et de prolifération. Par exemple, le ciblage du OAcGD2 à l'aide de l'anticorps monoclonal 8B6 inhibe la prolifération cellulaire. De plus, la O-acétylation du GD2 accroît également la migration et l'invasion de cellules de cancer du sein (109).

iii. GD2/OAcGD2 et cancers

Le profil d'expression des gangliosides varie selon l'origine cellulaire ainsi qu'au cours du développement embryonnaire. Les gangliosides monosialiques sont exprimés par tous les tissus adultes sains, là où l'expression des gangliosides disialiques (particulièrement GD2 et GD3) est faible et restreinte au cerveau, au système nerveux périphérique et aux mélanocytes (114). Les gangliosides disialiques sont toutefois particulièrement exprimés lors du développement embryonnaire du cerveau. De nombreux cancers d'origine neuroectodermique, tels que le GBM, le neuroblastome ou le cancer du sein, présente un profil d'expression aberrant dans lequel on peut retrouver une surexpression des gangliosides disialiques. De nombreux gangliosides sont ainsi considérés comme un antigène associé à la tumeur (TAA), du fait de leur expression aberrante dans ces cancers. A titre d'exemple, le GD2 et le GD3 sont des marqueurs de gliome, et leur expression est associée à un moins bon pronostic (115). Les gangliosides O-acétylés sont quant à eux généralement retrouvés dans les tissus à des stades de développement embryonnaire et tumoraux (116). Le rôle exact de la O-acétylation des gangliosides dans les cancers n'est cependant pas élucidé. La détection des gangliosides O-acétylés nécessite des techniques spécifiques pour la préparation et l'analyse des échantillons, du fait de la labilité du groupement O-acétylé. Ceci rend difficile la discrimination entre forme non acétylée et acétylée d'un même ganglioside, ce qui explique le manque d'information concernant le rôle des gangliosides O-acétylés dans la cancérogénèse (117).

iv. Ciblage du GD2/OAcGD2 par immunothérapie

Le GD2 étant un TAA intéressant à cibler pour une immunothérapie ciblant des cancers d'origine neuro-ectodermique, un anticorps monoclonal le ciblant, le dinutuximab, a été mis au point. Celui-ci montre un effet antitumoral intéressant dans le traitement du neuroblastome, et est ainsi associé à une amélioration du service médical rendu mineure par la commission de transparence de la haute autorité de santé en 2018 (118). Malheureusement, il présente des effets indésirables importants, notamment de neuropathie, car le GD2 est aussi exprimé par les cellules saines du système nerveux périphérique, bien qu'en plus faible quantité que dans les cellules du SNC (119). Des LT CAR ciblant le GD2 pour cibler le GBM ont également été développés, et montrent une efficacité préclinique sur des modèles de GBM intéressante (120). L'utilisation en clinique de LT CAR-GD2 peuvent toutefois faire craindre des effets indésirables pour des raisons similaires au dinutuximab, et des encéphalites fatales ont pu être

prises en évidence en préclinique (121). Il est toutefois intéressant de noter qu'une administration intracérébrale de LT CAR anti-GD2 chez 4 patients atteints de glioblastome pédiatrique ne montre pas de toxicité justifiant de l'impossibilité d'une telle approche (122).

Le OAcGD2 étant un TAA plus spécifique des cellules tumorales, il est intéressant de le cibler pour limiter les toxicités rencontrées avec le dinutuximab. De plus, un anticorps monoclonal ciblant le OAcGD2, le 8B6, montre un effet antitumoral *in vitro* comparable à celui du dinutuximab sur des cellules de neuroblastome (123). Il est par conséquent possible de développer un scFv à partir de cet anticorps pour former un CAR anti-OAcGD2 qui serait pertinent pour développer des LT CAR ciblant le GBM. L'expression du OAcGD2 par les cellules de GBM est néanmoins variable : bien qu'on semble le retrouver à la surface de toutes les cellules de GBM, certaines l'expriment davantage (3).

2. Des effecteurs immunitaires singuliers, les LT V γ 9V δ 2

i. Définition

Les lymphocytes T $\gamma\delta$ (LT $\gamma\delta$) sont les premiers lymphocytes à se développer chez l'homme, alors que les LT $\alpha\beta$ conventionnels et les cellules présentatrices d'antigène ne sont pas encore fonctionnels (124). Tout au long de la vie, leur fonction est de surveiller l'environnement et médier les réponses immunitaires de l'organisme contre les infections bactériennes et virales, les transformations cellulaires et les dommages tissulaires (125). Les LT $\gamma\delta$ sont capables de reconnaître les modifications phénotypiques d'une cellule stressée, infectée ou transformée, qui ne sont pas toujours perçues par les autres cellules du système immunitaire comme des signaux de danger. Bien qu'incapables d'éliminer totalement ces cellules modifiées, les LT $\gamma\delta$ ont la capacité d'initier rapidement une réponse immunitaire, sans passer par les phases d'expansion et de différenciation requises pour les LT $\alpha\beta$, de sécréter un large panel de cytokines et chimiokines pro-inflammatoires et de collaborer et/ou activer les autres cellules du système immunitaire. L'ensemble de ces caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles place les LT $\gamma\delta$ à l'interface entre immunité innée et immunité adaptative.

S'ils se distinguent des LT $\alpha\beta$ par l'absence d'expression des marqueurs CD4 et CD8, les LT $\gamma\delta$ expriment également des récepteurs spécifiques des antigènes. Ce TCR est composé d'une chaîne γ et d'une chaîne δ du CD3 qui sont obtenues par réarrangement des segments géniques V, D, J et C pour la chaîne γ , et V, D et J pour la chaîne δ aboutissant à une variété de combinaisons possibles (V δ 1, V δ 2, V δ 3, V δ 5 et V γ 2, V γ 3, V γ 4, V γ 5, V γ 8, V γ 9 chez l'Homme)

qui vont s'associer entre elles de manière préférentielle (126). Deux grandes sous-populations de lymphocytes LT $\gamma\delta$ peuvent être distingués en fonction de la structure de la chaîne δ du TCR. La sous-population la plus abondante dans le sang périphérique, et par conséquent la mieux caractérisée, exprime la chaîne V δ 2, généralement en combinaison avec la chaîne V γ 9 (127). L'autre grande sous-population n'exprime pas la chaîne V δ 2 mais l'une des autres chaînes V δ (V δ 1, V δ 3 ou V δ 5). Ces deux grandes sous-populations ont non seulement des localisations différentes, mais aussi des ligands et des fonctions bien distinctes. Ainsi, les LT V γ 9V δ 2 sont majoritairement retrouvés dans le sang, les amygdales et le foie, et répondent rapidement à des antigènes non peptidiques exprimés par les agents infectieux. Par contraste, les autres LT $\gamma\delta$ sont principalement retrouvés dans le thymus, la rate, la peau, le tube digestif et en de plus faibles proportions dans le sang périphérique, et réagissent au stress cellulaire (128).

Dans notre étude, et au vu de nos travaux préliminaires que nous présenterons dans le chapitre 3.3.1, je concentrerai mon discours sur les LT V γ 9V δ 2.

ii. Immunoréactivité des LT V γ 9V δ 2

1. Reconnaissance des phosphoantigènes

Les LT V γ 9V δ 2 sont capables de reconnaître des cellules présentant une concentration importante de phosphoantigènes (pAg), petites molécules non peptidiques phosphorylées. Issus des voies de synthèse des isoprénoïdes, ces molécules sont essentielles à la synthèse de nombreux lipides et aux modifications post-traductionnelles des protéines. Parmi les pAg naturels, l'IPP (Isopentanyl-5-pyrophosphate) est un métabolite intermédiaire de la voie du mévalonate dont la synthèse est fortement dérégulée dans les cellules cancéreuses (129). Si la reconnaissance des pAg n'est pas restreinte par les molécules du CMH, le mécanisme de reconnaissance exact par le TCR V γ 9V δ 2 est encore peu compris. La nécessité d'un contact cellulaire entre cellule cible et LT a rapidement exclu une reconnaissance directe entre les pAg et le TCR des LT V γ 9V δ 2 (130,131). Différentes études ont tenté d'identifier la ou les molécules impliquées dans la présentation du pAg. Une avancée décisive a été la démonstration par l'utilisation d'anticorps monoclonaux de l'implication dans ce mécanisme de la butyrophiline BTN3A1, une glycoprotéine de type 1 exprimée à la surface des cellules cibles et structuellement proche de la famille des protéines de costimulation B7 (132,133). Plus récemment, plusieurs études ont montré que BTN3A1 était nécessaire mais insuffisante à l'activation du TCR (134,135). Ces études ont ainsi mis en évidence la nécessité d'un complexe

entre BTN3A1 et une autre butyrophiline, BTN2A1, cette dernière se liant à la chaîne V γ 9 du TCR, pour y parvenir (134,136). Enfin, le mode de reconnaissance du pAg est également débattu, mettant en jeu soit un modèle de présentation antigénique « classique » avec une exposition des pAg par BTN3A1, soit un modèle allostérique dans lequel les pAg endogènes ou internalisés induiraient des modifications conformationnelles de BTN3A1 qui seront reconnues par le TCR entraînant son activation. La fixation du pAg sur la partie intracellulaire de BTN3A1, B30.2, va à l'encontre d'une reconnaissance par le TCR V γ 9V δ 2 suite à une présentation par BTN3A1 et le modèle actuel suggère qu'une augmentation de la concentration intracellulaire des pAg dans les cellules cibles induit un changement de conformation de BTN3A1, entraînant la liaison du complexe BTN3A1/BTN2A1 avec la chaîne V γ 9 du TCR et la reconnaissance par le TCR au niveau de son domaine de liaison CDR3 d'un ligand, CDR3L (134,137). Bien que ce modèle réponde aux observations précédentes, le ligand CDR3L ainsi que son recrutement ne sont pas encore identifiés à ce jour.

Des analogues synthétiques des IPP ont été développés et commercialisés pour augmenter la concentration intracellulaire de pAg dans les cellules cibles. Parmi eux, on peut trouver le BrHPP (bromoHydrin IPP) qui présente une bioactivité naturelle plus de 500 fois supérieure à celle de l'IPP (138). Parallèlement à ces pAg synthétiques, d'autres molécules sont capables d'inhiber spécifiquement certaines enzymes impliquées dans la synthèse des isoprénoïdes et ainsi moduler la synthèse de pAg. Parmi ces molécules, le zoledronate inhibe la Famesyl-pyrophosphate synthase, une enzyme de la voie du mévalonate qui utilise l'IPP comme substrat. L'exposition de cellules tumorales au zoledronate va ainsi augmenter leur concentration intracellulaire en IPP et donc stimuler leur reconnaissance et leur élimination par les LT (129). L'ensemble de ces molécules peuvent être utilisé *in vitro* pour amplifier et activer les LT V γ 9V δ 2.

2. Autres molécules impliquées dans l'activation des LT V γ 9V δ 2

En plus du TCR, les LT V γ 9V δ 2 présentent des récepteurs activateurs ou inhibiteurs des LNK, respectivement NKG2D ou NKG2A. Parmi les ligands de NKG2D, on retrouve les molécules du CMH de classe I non classiques comme MICA/B et des molécules dont l'expression est induite par un stress cellulaire comme les protéines de la famille ULBP (139) (Figure 10). Cette voie secondaire d'activation agit comme un signal de costimulation qui va consolider l'activation des LT V γ 9V δ 2 (140). Les molécules du CMH non classiques HLA-E sont les

principaux ligands des récepteurs inhibiteurs NKG2A. L'interaction entre ces différents récepteurs et leurs ligands respectifs permettra l'élaboration d'une réponse immunitaire V γ 9V δ 2 finement régulée.

Enfin, l'activité des LT V γ 9V δ 2 est constamment régulée par le microenvironnement. Cette régulation peut se faire par l'action de cytokines, l'IL-2 pouvant activer les LT V γ 9V δ 2 et induire leur expansion. On peut aussi noter que suite à l'exposition de facteurs anti-inflammatoires, comme le TGF- β , ces LT V γ 9V δ 2 peuvent présenter un phénotype régulateur, et ainsi sécréter des cytokines immunosuppressives (TGF- β) et du VEGF, bien qu'il s'agisse d'un phénotype davantage associé aux LT V δ 1 (141). La régulation de l'activité des LT V γ 9V δ 2 peut aussi se faire par des facteurs métaboliques, ces derniers présentant une activité cytotoxique plus faible dans un milieu hypoxique (142).

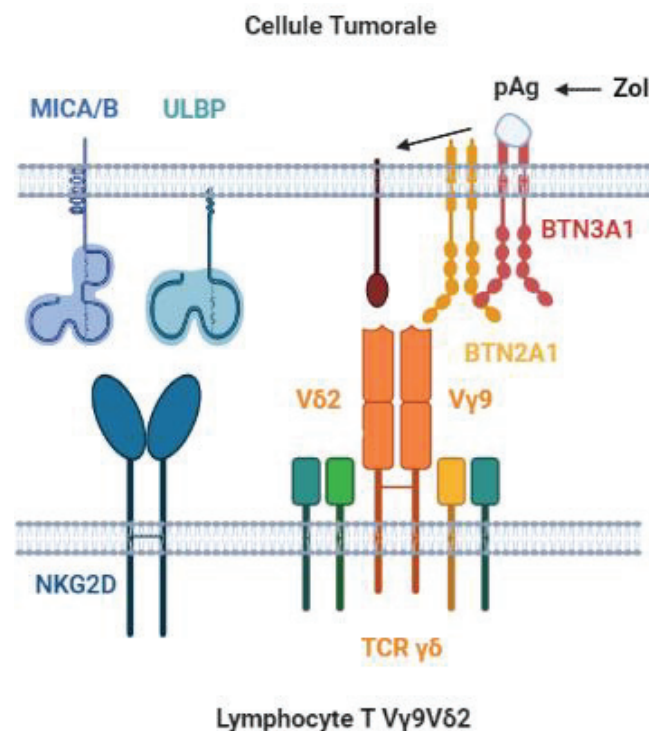


Figure 10 : Modèle actuel des principales voies de reconnaissance des cellules tumorales par les LT V γ 9V δ 2 : la voie du TCR, qui passe par la reconnaissance d'un ligand putatif à la surface des cellules tumorales en présence de pAg et présenté par un hétéromère constitué par BTN2A1 et BTN3A1, et la voie NKG2D, qui reconnaît différents ligands activateurs, notamment MICA/B et ULBP.

3. Activation et signalisation intracellulaire

Une fois leur cible reconnue, les LT V γ 9V δ 2 vont activer différents mécanismes d'action. Ils peuvent avoir une action cytotoxique similaire à celle des LT $\alpha\beta$ en sécrétant des médiateurs chimiques comme la perforine et les granzymes. La perforine entraîne la création de pores dans la membrane des cellules cibles permettant l'entrée des molécules de granzymes qui induiront l'apoptose des cellules cibles (143). Une fois activés, les LT V γ 9V δ 2 sécrètent également des cytokines pro-inflammatoires cytotoxiques, comme le TNF- α (Tumor necrosis factor) et l'IFN- γ (Interféron gamma). Une dernière voie pouvant être mise en place consiste à présenter le ligand du récepteur Fas (FAS-L) par les LT V γ 9V δ 2, un signal induisant la mort de la cellule cible par apoptose après la liaison du ligand à son récepteur situé sur les cellules cibles (144). Ces activités cytotoxiques peuvent être renforcées par la sécrétion de différentes cytokines cytotoxiques combinées à celles d'autres effecteurs immunitaires, comme par exemple l'IL-17 impliquer dans le recrutement de polynucléaires neutrophiles (125).

Suite à cette activation, les LT V γ 9V δ 2 sont capables de mettre en place une population dite mémoire, qui permettra une réponse plus rapide et plus efficace lors d'une deuxième exposition au même pathogène. Ils peuvent aussi endosser un rôle de cellules présentatrices d'antigène aux cellules dendritiques immatures et aux LT $\alpha\beta$ naïfs, en exprimant différents marqueurs moléculaires classiques des cellules présentatrices d'antigène (CMH de classe II, CD80, CD86, CD69, CD25), ce qui leur permet d'engager une réponse immunitaire adaptative plus spécifique et plus robuste contre le pathogène reconnu (145,146). Pour ces raisons, les LT V γ 9V δ 2 sont considérés à la croisée des chemins entre immunité innée et adaptative (125,147).

iii. Intérêt en immunothérapie anticancéreuse

Du fait de leur tropisme naturel pour les cellules cancéreuses, les LT V γ 9V δ 2 sont des effecteurs intéressant à considérer en immunothérapie. De plus ces effecteurs immunitaires ont montré une réactivité antitumorale intéressante dans différents modèles précliniques de cancer : on retrouve par exemple un effet antitumoral pertinent des LT V γ 9V δ 2 sur des modèles de cancer de l'ovaire, où leur association avec une chimiothérapie permet d'améliorer la survie des souris testées (148).

1. Efficacité préclinique des LT V γ 9V δ 2 sur le GBM

Dans le GBM, l'administration intracérébrale de $20 \cdot 10^6$ LT V γ 9V δ 2 permet de contrôler le développement d'une culture primaire de GBM humain greffé chez des souris NSG, si ils sont associés avec du zoledronate (1). Bien que cette activité soit intéressante, le zoledronate passe mal la BHE et sa demi-vie en cas d'injection IV est de 15 minutes. De plus, une administration locale pourrait s'avérer toxique pour le tissu sain environnant, ce qui limite grandement son utilisation potentielle dans ce cadre (149). Une meilleure compréhension de la reconnaissance des cellules tumorales par les LT V γ 9V δ 2 pourrait aussi permettre d'optimiser l'activité des LT V γ 9V δ 2. Les cellules tumorales de sous-type MES expriment davantage de ligand de NKG2D, particulièrement MICA, MICB et ULBP2, ce qui peut induire une reconnaissance et une élimination plus importante par les LT V γ 9V δ 2 de ces cellules (2). L'activité des LT V γ 9V δ 2 contre les cellules de sous-type MES peut également être augmentée en les stimulant ex vivo à l'aide d'IL-21 avant de les administrer chez les souris testées par voie intracérébrale (150).

La xénogreffe de tumeurs issues de patient de GBM sur des souris immunodéprimées, essentiellement des souris diabétiques non obèses et présentant un déficit immunitaire combiné sévère gamma (NSG), suivie de l'injection des LT V γ 9V δ 2 issus de donneurs humains est le modèle in vivo le plus utilisé pour évaluer une immunothérapie basée sur les LT V γ 9V δ 2 contre le GBM. Cependant, ce modèle est peu adapté à l'évaluation de l'efficacité d'une immunothérapie du fait que les souris hôtes soient immunodéprimées ; il permet donc seulement d'apprécier la migration des LT vers le site tumoral (151). En ce sens, un modèle orthotopique, c'est-à-dire où la tumeur est greffée à son emplacement habituel (ici au niveau du cerveau des souris) est à favoriser plutôt qu'un modèle où la tumeur est greffée en sous-cutané. Un modèle animal adapté à l'évaluation d'une immunothérapie doit être immunocompétent, afin de pouvoir caractériser l'interaction entre l'immunothérapie administrée et le système immunitaire de l'organisme receveur (151). Cependant, il faut noter que les LT V γ 9V δ 2 sensibles aux pAg ne sont pas présents chez la souris, ceux-ci étant retrouvés chez l'homme, le primate non humain et l'alpaca, ce qui rend impossible le développement de modèle murin syngénique pour l'évaluation in vivo des LT V γ 9V δ 2 (152,153). L'utilisation de primate pour développer un tel modèle n'est quant à elle pas envisageable pour l'évaluation préclinique d'une immunothérapie anti-cancéreuse pour des raisons économiques et éthiques. Ces résultats constituent néanmoins un rationnel suffisamment robuste pour explorer davantage l'application

de l'immunoréactivité des LT V γ 9V δ 2 comme thérapie anti-cancéreuse dans le GBM, et particulièrement d'arriver à augmenter leur réactivité à tous les sous-types de GBM.

2. *Transfert adoptif de LT V γ 9V δ 2 chez l'homme*

a. Non GBM

Les essais cliniques utilisant les LT V γ 9V δ 2 qui ont été conduits sur d'autres tumeurs solides (myélome, neuroblastome, cancer du sein, carcinome) ont principalement cherché à étendre spécifiquement la population V γ 9V δ 2 chez les patients, dans le but d'augmenter leur réactivité anti tumorale. Pour y parvenir, ces essais ont utilisé des molécules stimulant les LT V γ 9V δ 2, particulièrement des bisphosphonates comme le zoledronate en combinaison d'IL-2 (154–157), soit directement chez le patient soit sur une population de LT V γ 9V δ 2 d'un patient ex vivo avant de les administrer à nouveau chez le patient traité, en général en allogreffe (158–161). Bien que ces essais arrivent à augmenter la population V γ 9V δ 2 chez les patients traités, cette expansion polyclonale s'amenuise au fur et à mesure des cycles de traitement. Ces essais, essentiellement de phase I, n'ont pas montré un bénéfice clinique suffisamment pertinent pour être poursuivis, malgré la faisabilité et l'absence de toxicité importante due à ce traitement. Il est cependant intéressant de noter que la récupération et l'expansion ex vivo de LT V γ 9V δ 2 pour obtenir un nombre de cellules suffisant pour traiter est faisable, malgré le faible nombre présent normalement dans le sang périphérique.

Plusieurs explications peuvent être apportées à ces échecs : tout d'abord, la diversité fonctionnelle des différentes sous-populations de LT V γ 9V δ 2 n'est pas prise en compte. Comme certaines sous-populations sont plus réactives que d'autres, la sélection d'une population plus active pourrait améliorer l'efficacité anti tumorale de la greffe de LT. Cependant, cette sélection hypothétique nécessite d'abord d'identifier la raison de cette augmentation d'activité. Une meilleure compréhension des mécanismes conduisant à la réduction de l'activité anti tumorale des LT V γ 9V δ 2 permettrait aussi de diminuer l'échappement tumoral. Il reste donc encore beaucoup de travaux à réaliser pour mieux comprendre la réactivité des LT V γ 9V δ 2 et comment l'optimiser pour améliorer l'efficacité des immunothérapies cherchant à les utiliser.

b. GBM

On dénombre actuellement un seul essai utilisant des LT V γ 9V δ 2 chez des patients atteints de GBM. Le but de cet essai est d'évaluer la sécurité de l'administration intra tumorale de ces LT en combinaison avec le temozolomide (TMZ) (162). Les cellules utilisées dans cette étude sont des LT V γ 9V δ 2 modifiés pour exprimer la O⁶-méthylguanine-DNA méthyl-transférase (MGMT), une protéine permettant de réparer les dégâts causés à l'ADN par le TMZ qui induisent ensuite la mort des cellules traitées. Les lymphocytes obtenus sont donc résistants au TMZ, ce qui permet de les administrer en combinaison en intra tumoral par le même cathéter.

Les patients recrutés subiront une résection chirurgicale de leur tumeur et un cathéter de Rickham sera placé au niveau du site tumoral. Ils auront ensuite une aphérèse afin de récupérer les cellules mononuclées du sang, et notamment les LT V γ 9V δ 2 qui seront modifiés et amplifiés avant d'être réintroduits chez les patients. Ceux-ci seront transfusés après traitement standard (6 semaines TMZ + radiothérapie) et 6 cycles de TMZ, et recevront entre 1 et 3 doses de LT selon le groupe dans lequel les patients ont été attribués.

Etant un essai de phase I, l'objectif principal de cette étude est d'évaluer la sécurité de l'administration intra tumorale de LT V γ 9V δ 2 suite au traitement standard du GBM, ainsi que la dose maximale tolérée. Afin d'avoir un premier indicateur de l'efficacité de ce traitement, la survie globale et la survie sans progression des patients seront évaluées. L'activité biologique des LT sera également caractérisée par analyse du sérum des patients, principalement en dosant les cytokines libérées par les LT. Cet essai permettra d'avoir un indicateur sur la faisabilité de l'administration des LT V γ 9V δ 2 dans le cadre du GBM, notamment sur le nombre de cellules utilisables et à quelle vitesse les obtenir, ainsi que sur les toxicités potentielles de ce traitement.

3. Quel futur avec les LT V γ 9V δ 2 ?

i. Avantages et limites

Un mécanisme d'échappement immunitaire pouvant être mis en place par les cellules tumorales est la perte d'expression de molécules du CMH de classe I, ce qui empêche la présentation d'antigène aux LT CD8⁺ qui ne reconnaissent alors plus la cellule tumorale à éliminer (163). Comme les LT V γ 9V δ 2 reconnaissent directement et spontanément leur cible sans présentation de l'Ag par le CMH, une perte d'expression de molécule du CMH de classe I par les cellules

tumorales ne constitue donc pas un mécanisme d'échappement immunitaire à leur élimination par les LT V γ 9V δ 2.

Cette reconnaissance CMH-indépendante peut aussi être mise à profit dans un contexte d'allogreffe, c'est-à-dire de greffe de cellules d'un patient vers un autre patient, car le risque de syndrome de rejet du greffon contre l'hôte est inexistant (164). Par rapport à l'autogreffe, une stratégie de transfusion allogénique permettrait d'établir des banques de LT pouvant être utilisables rapidement, en nombre suffisant et avec d'éventuelles modifications génétiques, ainsi que d'avoir des cellules de meilleure qualité (165). La faisabilité et la sécurité clinique d'une telle approche doivent cependant être confirmées, les LT transfusés présentant eux-mêmes des molécules du CMH du donneur, ce qui peut induire leur élimination prématurée par le système immunitaire du receveur. Dans le cadre d'une thérapie utilisant les LT V γ 9V δ 2, ceci permettrait aussi de sélectionner une population plus réactive pour maximiser l'efficacité anti tumorale. En effet, nous observons une activité anti tumorale des LT V γ 9V δ 2 variable en fonction des donneurs (2). Au sein même de ces populations actives, on peut isoler différents clones qui présentent une réactivité naturelle plus ou moins importante sur des cultures primaires de GBM de sous-type MES. Des résultats similaires ont pu être observés sur une lignée cellulaire de lymphome de Burkitt (137). Cependant, si on séquence les TCR V γ 9V δ 2 de ces clones réactifs, on ne met pas en évidence de TCR expliquant cette activité plus importante (2). De plus, la transduction d'un TCR V γ 9V δ 2 d'un clone réactif sur un LT $\alpha\beta$ ne permet pas d'obtenir une activité anti tumorale comparable à celle du clone parent (137). Bien que les LT V γ 9V δ 2 hautement réactifs expriment davantage de récepteurs NKG2D, le blocage de ces récepteurs réduit autant la cytotoxicité des LT hautement réactifs que des LT peu réactifs. Ceci ne permet donc pas non plus de conclure que cette augmentation de réactivité est due à une reconnaissance plus importante des ligands de NKG2D par une expression augmentée de récepteurs NKG2D par la population de LT V γ 9V δ 2 hautement réactifs (2).

ii. Combinaison thérapeutique

Différentes stratégies sont en cours d'étude pour optimiser une immunothérapie avec des LT V γ 9V δ 2. Leur action cytotoxique pouvant être négativement impacté par les conditions hypoxiques classiquement retrouvés dans les tumeurs cérébrales, dont le GBM, il peut être proposé de les rendre moins sensibles à l'hypoxie du micro environnement tumoral (142,166). En effet, si on combine les LT V γ 9V δ 2 à des molécules pouvant rétablir une normoxie, tel que

la metformine, ils peuvent récupérer une meilleure activité cytotoxique (142). Ceci permet aussi de réduire le phénotype immunosuppresseur que peuvent acquérir les LT V γ 9V δ 2 en hypoxie, en réduisant l'apoptose des LT CD8⁺ qu'ils peuvent induire. Ces deux effets permettent d'obtenir une meilleure survie de modèles murins de gliomes de haut grade traités avec une combinaison de LT V γ 9V δ 2 et de metformine.

D'autres molécules pourraient permettre d'améliorer l'efficacité des LT V γ 9V δ 2 s'ils sont utilisés en combinaison. Les cellules tumorales surexpriment certains checkpoints inhibiteurs, comme PD-1 et CTLA-4, qui inhibent l'activation des LT et bloquent ainsi leurs effets cytotoxiques. L'association à des inhibiteurs de checkpoints inhibiteurs pourrait empêcher ce blocage et ainsi assurer que les LT V γ 9V δ 2 fonctionnent normalement. Cependant, les checkpoints inhibiteurs des LT V γ 9V δ 2 ne sont pas nécessairement les mêmes que ceux mis en place avec les LT $\alpha\beta$: CTLA-4 agit en interférant avec le signal d'activation secondaire CD28-CD80/86 des LT CD8⁺ que les LT V γ 9V δ 2 ne présentent pas et le rôle de PD-1 dans la suppression de l'activation des LT V γ 9V δ 2 reste discuté (167). Dans certains cancers comme celui du colon, il est retrouvé une proportion plus importante de LT V γ 9V δ 2 exprimant TIM-3 (T-cell Immunoglobulin and Mucin-domain containing-3) et que cette expression est liée à une plus faible cytotoxicité des LT V γ 9V δ 2 (168). Toutefois, si ces inhibiteurs sont des anticorps, ils doivent d'abord montrer qu'ils sont capables de passer la BHE afin de pouvoir agir dans le contexte du GBM.

A l'instar de l'introduction du gène de la MGMT dans les LT V γ 9V δ 2 pour les rendre résistants à la chimiothérapie par le TMZ proposée par l'étude clinique présentée plus haut, plusieurs modifications génétiques des LT V γ 9V δ 2 sont actuellement explorées pour améliorer leur efficacité. Par exemple, il a été montré qu'une délétion des checkpoints immunitaires sur des LT $\alpha\beta$ permet d'améliorer leurs effets anti tumoraux sur des cellules de GBM (169). Il peut donc être envisagé la même stratégie avec les LT V γ 9V δ 2 au lieu de les utiliser en combinaison avec des ICI. L'un des intérêts des LT V γ 9V δ 2 étant leur possible utilisation en allogreffe, une autre modification génétique possible serait d'induire une délétion de molécules du CMH de classe 1 des LT V γ 9V δ 2. Ceci permettrait de réduire l'élimination des LT lorsqu'ils sont utilisés en allogreffe, et donc d'augmenter leur persistance dans l'organisme greffé.

iii. Ingénierie Lymphocytes T $V\gamma 9V\delta 2$ CAR

Afin d'améliorer la reconnaissance des cellules tumorales par les LT, et dans l'espoir de transposer les résultats obtenus par les LT CAR dans les tumeurs hématologiques aux tumeurs solides, on retrouve ainsi des essais de LT CAR utilisant comme effecteurs des LT $V\gamma 9V\delta 2$ au lieu de LT $\alpha\beta$ afin d'améliorer la réactivité des LT $V\gamma 9V\delta 2$. Il est intéressant de noter que les LT $V\gamma 9V\delta 2$ conservent leur capacité d'endosser le rôle de cellule présentatrice d'antigène une fois modifiée pour exprimer un CAR anti-GD2 sur des cellules de GBM in vitro et qu'ils sont capables de présenter le GD2 à des cellules dendritiques naïves et de les activer après une première mise en contact avec les cellules cibles, qui pourront à leur tour stimuler le système immunitaire du receveur théorique (170). C'est donc un atout qui peut renforcer l'efficacité d'une immunothérapie chez un patient immunocompétent, mais qui sera difficile à évaluer lors d'études précliniques puisqu'il faudrait un modèle in vivo immunocompétent et présentant des LT $V\gamma 9V\delta 2$ pour estimer l'impact de cet effet sur la croissance tumorale.

L'option de transduire un CAR sur des LT $V\gamma 9V\delta 2$ s'est encore peu transposée en clinique, on ne dénombre que 3 essais utilisant des LT CAR $V\gamma 9V\delta 2$ comme immunothérapie anticancéreuse et aucune n'a encore publié de résultats à ce jour. Parmi eux, 2 essais sont en cours de recrutement, l'un avec un CAR anti-CD20 pour le traitement de leucémie lymphoïde B, l'autre avec un CAR anti-CD7 pour le traitement de leucémie lymphoïde T (171,172). Ceux-ci cherchent essentiellement à exploiter l'absence de reconnaissance de molécules du CMH de classe I des LT $V\gamma 9V\delta 2$ afin de développer des LT CAR utilisables en allogreffe. Un 3^e essai est mené sur divers tumeurs solides en utilisant un CAR ciblant les ligands de NKG2D, l'idée étant de renforcer le signal d'activation secondaire des LT $V\gamma 9V\delta 2$, normalement médié par les récepteurs activateurs NKG2D, via le CAR (173). Là encore, ces études seront intéressantes pour visualiser d'éventuelles toxicités de cette approche, notamment sur les risques de SRC qui accompagnent fréquemment les thérapies utilisant des LT CAR.

Le but de mes travaux était de déterminer si des LT $V\gamma 9V\delta 2$ CAR-OAcGD2 étaient capables de reconnaître et tuer toutes les cellules de GBM. Maintenant que l'idée de cette approche a été replacée dans le contexte de la recherche de nouvelles approches thérapeutiques dans le GBM, l'objectif des parties suivantes est de présenter la caractérisation de l'expression du OAcGD2 par les cellules de GBM ainsi que l'immunoréactivité des LT $V\gamma 9V\delta 2$ CAR-OAcGD2 contre ces cellules.

Matériels et Méthodes

Cultures primaires de GBM humain

Les cultures primaires de GBM ont été obtenus par dissociation mécanique d'échantillons de tumeurs de patients. Toutes les procédures impliquant des humains respectaient les standards d'éthique, et le consentement informé de tous les patients ayant participé a été obtenu.

Les cellules sont maintenues en culture pendant 2 mois maximum après décongélation. Elles sont cultivées à 37°C dans une atmosphère humide à 5% de CO₂ dans le milieu utilisé pour les cellules souches neurales (CSN) composé de DMEM/F12 (Gibco 21331-020) complémenté avec 2 mM de L-Glutamine (Gibco 25030081), des antibiotiques (Streptomycine 100µg/mL et Pénicilline 100 U/mL (Gibco 15140-122)), des facteurs de croissance (B27 (Gibco 17502-048), N2 (Gibco ref 17504-044), βFGF 25ng/mL, EGF 20ng/mL), et de l'héparine 2 µg/mL. Le milieu de culture est renouvelé au 2/3, 3 fois par semaine après centrifugation des cellules (5 minutes, 1500 rpm). Des tests de détection de mycoplasme par RT-PCR sont réalisés 1 fois/mois, afin de s'assurer d'une absence de contamination. Les cultures sont nommées selon leur signature moléculaire : les cultures de type Mésenchymateuse sont appelées MES-1, MES-2 et les cultures Classique/Proneurale (CPN) sont appelées CPN-1, CPN-2, CPN-3, CPN-4. Lors de chaque expérience, les cultures cellulaires proliférant sous forme de sphères, sont comptées après dissociation enzymatique ou mécanique avant d'êtreensemencées. La dissociation enzymatique est réalisée en incubant les cellules avec de l'acutase (400-600 UI/mL ; Sigma A6964) pendant 5 minutes à 37°C. L'arrêt de la réaction enzymatique est réalisé par l'élimination de l'enzyme après centrifugation. Le comptage cellulaire est réalisé sous microscope sur une cellule de Mallassez à partir d'un échantillon de culture cellulaire (10 µL) en présence d'un marqueur d'exclusion des cellules mortes (éosine à 0,15%).

Cultures primaires de lymphocytes T Vγ9Vδ2 humains

Les LT Vγ9Vδ2 ont été obtenus à partir de poches de cellules mononuclées de sang périphérique de donneurs sains consentants fournies par l'Etablissement Français du Sang (EFS). Les lymphocytes T Vγ9Vδ2 ont été amplifiés spécifiquement en présence de Zoledronate (5 µM ; Sigma-Aldrich 165800-06-6) et d'IL-2 humaine recombinante (100 UI/mL) puis stockés dans l'azote liquide. Dans nos expériences, les lymphocytes T Vγ9Vδ2 utilisés sont issus de 2 donneurs différents, DO240 et DO3791, préalablement caractérisés pour leur immunoréactivité (2). Après décongélation, les LT Vγ9Vδ2 sont cultivés dans du milieu RPMI 1640 (Gibco

31870), complétement avec du Sérum Humain (8%), du GlutaMAX (2 mM ; Gibco, 35050-038), des antibiotiques (Streptomycine 100µg/mL et Pénicilline 100 U/mL (Gibco 15140-122)) et de l'IL-2 humaine recombinante (100 UI/mL ; ProleukinR, Clinigen), puis amplifiés au zoledronate (5 µM). Lors des expériences de mesures d'immunoréactivité, les LT Vγ9Vδ2 sont utilisés une fois entrés en quiescence, c'est-à-dire entre J20 et J40 après amplification au zoledronate. A partir de la population de LT Vγ9Vδ2 initiale, trois sous-populations sont générées et testées pour leur immunoréactivité : la population initiale non transduite (NT), les LT Vγ9Vδ2 transduits avec le CAR contre le OAcGD2 (CAR-OAcGD2), et les LT Vγ9Vδ2 transduits avec le CAR tronqué de sa partie CD3-ζ fonctionnelle (ΔCAR) (Figure 11).

Construction des lymphocytes T CAR Vγ9Vδ2

Le scFv du CAR est dérivé des parties variables de l'Anticorps monoclonal 8B6 dirigé contre le OAcGD2. La partie intramembranaire est composée des domaines transmembranaire et intramembranaire du récepteur de costimulation CD28, et du domaine fonctionnel de la fraction ζ du CD3. La section Hinge liant le scFv au domaine transmembranaire est dérivée de la fraction constante d'une IgG1 humaine.

Avant transduction, les LT Vγ9Vδ2 sont amplifiés en présence de cellules nourricières (mélange de 10⁶ lymphocytes B et de 10⁶ cellules mononuclées du sang provenant de donneurs différents) et de PHA-L pendant 4 jours. Les LT Vγ9Vδ2 sont ensuite mis en contact des particules rétrovirales produites par les cellules HEK293T par spinoculation, afin d'améliorer le rendement de la transduction. L'efficacité de la transduction est mesurée par cytométrie en flux après une incubation d'une heure avec un fragment F(ab')₂ d'anticorps de chèvre dirigé contre la fraction constante de l'IgG humaine et couplé au fluorophore AlexaFluor647, permettant de détecter le CAR. Les cellules sont ensuite triées sur leur expression du CAR à l'aide de ce même anticorps par cytométrie en flux.

Production des particules virales par les cellules HEK293T

Des cellules HEK293T de la lignée Phoenix-Amphotrope sont cultivées dans un milieu DMEM (Gibco 21969035) complétement à 5% du volume final par du Sérum de Veau Fœtal décomplémenté (SVF ; Eurobio, CVFSVF00-01), 2 mM de L-glutamine (Gibco 25030081) et des antibiotiques (Streptomycine 100 µg/mL et Pénicilline 100 UI/mL (Gibco 15140-122)). Pour la production de particules virales, les cellules sont transfectées en présence de phosphate

de calcium (Invitrogen, K2780-01) ou par lipofection (lipofectamine 2000, invitrogen 11668019) avec les plasmides contenant les constructions d'intérêt (CAR anti-OAcGD2 complet ou tronqué, CRISPR/Cas9), ainsi que deux autres plasmides permettant la production des particules virales. Le deuxième plasmide, MD2 (Addgene, Plasmide#20864), permet la production des particules rétrovirales par les cellules HEK293T. Le troisième plasmide, psPAX2 (Addgene, Plasmide#12260), permet l'emballage du CRISPR dans la particule rétrovirale. Après 6h d'incubation à 37°C des cellules HEK293T et du mélange plasmides + lipofectamine 2000 dans 5 mL de milieu opti-MEM (Gibco 31985070), ce milieu est changé par du milieu DMEM-SVF 5% et les cellules restent à incubation pendant 48h. Le surnageant de ces cellules est alors récupéré et filtré avant d'être ajouté au milieu des cellules CPN-2. Une sélection des cellules transduites est obtenue par l'ajout de 2 µg/mL de puromycine dans le milieu sur 1 semaine.

Inactivation B4GALNT1/CASD1 dans les cultures CPN-2

L'extinction du gène codant B4GALNT1 ou CASD1 est réalisée par la technologie CRISPR/Cas9 après transduction de particules lentivirales codant l'endonuclease Cas9 et une séquence guide spécifique. La séquence guide spécifique du gène à éteindre a été introduite dans le plasmide par clonage (CASD1 KO 1 5'-CACCGTCAACCACTACTTCAGCGTG-3', CASD1 KO 2 5'-CACCGTCCATGACAACAGTGCGCGG-3', B4GALNT1 KO 1 5'-CACCGCGTCCCCGGGTGCTCGCGTAC-3', B4GALNT1 KO 2 5'-CACCGCCGGCTACCTCTTGCGCCGT-3'). Le plasmide est produit après transformation et sélection des bactéries compétentes Stbl3 dans du milieu Lysogenv Broth contenant de l'ampicilline (100 µg/mL).

Expression des gangliosides GD2/OAcGD2

L'expression des gangliosides GD2 et OAcGD2 est analysée par cytométrie en flux. Après dissociation et comptages, les cellules sontensemencées à raison de 200 000 cellules/puits dans des Plaques 96 puits à fond conique (Dutscher 055142). Après un lavage au PBS puis au PBS/BSA 1%, les cellules sont incubées avec un anticorps primaire dilué dans du PBS/BSA 1% pendant 45 minutes à 4°C (anti-GD2 : 14G2a, anti-OAcGD2 : 8B6, isotype : DOTA ; Tableau I). Après 2 lavages au PBS/BSA 1%, les cellules sont ensuite incubées pendant 45 min à 4°C sous agitation avec un anticorps secondaire de chèvre anti-Fc de souris couplé au fluorochrome FITC (Jackson Immunology, AB_2338589) dilué dans du PBS/BSA 1%. Après

2 lavages supplémentaires (PBS/BSA 1% puis PBS), les cellules sont récupérées puis analysées en cytométrie en flux (Accuri C6 Plus) en mesurant la fluorescence FITC ($\lambda_{\text{excitation}} = 488 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{filtre}} = 533/30$). Le niveau d'expression relatif des gangliosides est déterminé en calculant le rapport de fluorescence (RFI) entre la moyenne de fluorescence spécifique liée au 1^{er} anticorps et celle obtenue avec l'isotype.

Essai de dégranulation des lymphocytes T

L'expression du marqueur de dégranulation CD107a à la surface des LT V γ 9V δ 2 est mesurée par cytométrie en flux afin d'évaluer l'activation des LT suite à la reconnaissance de la cible. Les cellules cibles sontensemencées à 100 000 cellules/100 μL /puits en plaque 96 puits fond rond (Dutscher 055434) puis cultivées pendant 4h en présence des LT dans du milieu RPMI 1640 (Gibco 31870) complémenté à 10% de SVF (Eurobio, CVFSVF00-01), 2 mM de L-Glutamine, de la Penicilline (100 UI/mL) et de la streptomycine (100 $\mu\text{g/mL}$), à 37°C à un ratio cible : effecteur de 1 : 1. Cette coculture cellules cibles/LT est réalisée en présence d'un Ac dirigé contre le CD107a couplé au fluorophore Alexa Fluor 647 (Biolegend 121610) et de monensine (5 μM ; Sigma M5273) pour bloquer toute réinternalisation du marqueur de dégranulation. Un Ac anti-V δ 2 couple FITC (voir tableau I) est ensuite ajouté à la coculture. L'acquisition des fluorescences respectives ($\lambda_{\text{excitation}} = 640 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{filtre}} = 675/25$ pour l'Alexa Fluor 647) est réalisée en cytométrie de flux avec un Accuri C6 puis analysé avec le logiciel FlowJo software 10. Une activation des LT V γ 9V δ 2 au BrHPP (Innate Pharma IPH 1101) et un prétraitement des cellules cibles sur la nuit avec du zoledronate (20 μM ; Sigma-Aldrich 165800-06-6) en amont de la coculture sont réalisés lors de chaque expérience pour s'assurer de la fonctionnalité immunitaire des LT V γ 9V δ 2. Pour caractériser respectivement l'immunoréactivité médiée par le TCR $\gamma\delta$ de celle médiée par le CAR, les expériences de coculture ont été réalisées après une pré-incubation de 15 minutes avec un Ac spécifique à une concentration de 10 $\mu\text{g/mL}$. Si l'antigène ciblé est exprimé par les LT V γ 9V δ 2 (NKG2Di, F(ab')₂), les LT sont incubés avec l'Ac avant la coculture alors que si l'antigène ciblé est exprimé par les cellules tumorales. (BTN3A1, GD2, OAcGD2), l'Ac est ajouté aux cellules tumorales.

Essai de cytotoxicité par mesure de relargage du ^{51}Cr

Cet essai permet de mesurer la capacité des LT à lyser les cellules cibles en déterminant la proportion de cellules cibles lysées. Après avoir ensemencé les cellules cibles (500 000 cellules/puits d'une plaque de 96 puits) dans un puits à fond conique, les cellules sont centrifugées (1 minute, 2500 RPM) puis incubées pendant une heure à 37°C dans du milieu RPMI/SVF 10% contenant du ^{51}Cr (2,77 mCi/ 10^6 cellules). Après 4 lavages successifs avec du milieu RPMI/SVF 10%, les cellules cibles sont ensuite ensemencées dans une plaque 96 puits à fond plat à raison de 3000 cellules par puits. Les LT V γ 9V δ 2 sont alors ajoutés à la suspension cellulaire au ratio effecteurs:cibles indiqué (30:1, 10:1, 3:1, 1:1). Des puits contenant les cellules cibles seules en présence ou non de Triton 0,5% sont réalisés pour déterminer respectivement la lyse maximale et la lyse spontanée. Après une incubation de 4h à 37°C, les suspensions cellulaires sont transférées dans une plaque à fond conique puis centrifugées 1 minute à 2500 RPM. Le surnageant (25 μL sur un volume final de 50 μL) est transféré dans une nouvelle plaque (Perkin Elmer 1450-401) et 100 μL /puits de scintillant est ajouté. La plaque est ensuite fermée hermétiquement (sealer ; Perkin Elmer 1450-461), vortexée puis la radioactivité mesurée avec un compteur détectant les particules beta. Le pourcentage de lyse est calculé par la formule suivante :

$$\% \text{ lyse} = 100 * (\text{relargage puits test} - \text{relargage minimum}) / (\text{relargage maximum} - \text{relargage minimum}).$$

Analyses statistiques

Les données sont présentées sous la forme moyenne +/- écart-type et analysées grâce au logiciel GraphPad Prism 7 (GraphPad Software, Inc.). Les différences entre les groupes ont été analysé à l'aide de test d'analyse de la variance (ANOVA) et de test de comparaisons multiples de Tukey (ns = non significatif, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$).

Tableau I : Liste des Ac primaires utilisés, avec leur cible et le type d'expérience dans la(les)quelle(s) ils ont été utilisés.

Cible	Anticorps	Concentration utilisée	Expérience	Référence
GD2	14G2a : IgG2a de souris anti-GD2	10 µg/mL	Expression GD2 et Blocage activation LT	BE0318 BioXCell
OAcGD2	8B6 : IgG2a de souris anti-OAcGD2	10 µg/mL	Expression OAcGD2 et Blocage activation LT	(3,174)
Isotype	DOTA	10 µg/mL	Contrôle	(3,174)
NKG2D	NKG2Di : IgG1 de souris anti-CD314 humain	10 µg/mL	Blocage activation LT	320814 Biolegend
BTN3A1	103.2 : IgG de souris anti-BTN3A1 humain (BTN3i)	10 µg/mL	Blocage activation LT	(175)
CAR	Fragment F(ab) ₂ d'une IgG de chèvre couplé AlexaFluor 647 nm anti-IgG-Fc humain	10 µg/mL	Expression CAR et blocage activation LT	397302 Biolegend
TCR Vδ2	IgG1 de souris anti-TCR Vδ2 humain	2,5 µg/mL	Essai de dégranulation LT : détection des LT	331406 Biolegend
CD107a	IgG1 de souris anti-CD107a humain couplé AlexFluor 647 nm	3,3 µg/mL	Essai de dégranulation LT : mesure activation	328612 Biolegend

Résultats

Expression du ganglioside OAcGD2 restreinte aux cultures de GBM de sous-type CPN

Les travaux précédents de l'équipe ont montré que si le ganglioside GD2 était exprimé par toutes les cellules tumorales, l'expression de son dérivé OAcGD2 est variable selon les cellules de GBM (3). Dans le but d'identifier quelles cellules tumorales expriment le OAcGD2, cible du CAR utilisé dans notre étude, nous avons mesuré son expression, ainsi que celle de son précurseur le GD2, dans différentes cultures primaires de GBM, de sous-type moléculaire mésenchymal (MES) ou Classique/Proneural (CPN) par cytométrie en flux (Figure 11). Comme attendu, nous avons observé une forte expression du GD2 dans toutes les cultures de GBM testées (Figure 11C). En revanche, son dérivé OAcGD2 n'est exprimé que par 4 cultures primaires de GBM sur 6 (Figure 11D). Les cultures primaires utilisées ayant été caractérisées pour leur signature moléculaire, nous avons pu déterminer que les 2 MES ne l'expriment pas ($\text{RFI} = 1,08 \pm 0,003$ pour MES-1, $\text{RFI} = 1,33 \pm 0,03$ pour MES-2), contrairement aux CPN qui l'expriment toutes. Il est à noter que le niveau d'expression de l'OAcGD2 est très variable dans les CPN, puisque 2 cultures CPN l'expriment très faiblement ($\text{RFI} = 1,68 \pm 0,04$ pour CPN-1, $1,84 \pm 0,13$ pour CPN-3) et 2 cultures CPN l'expriment fortement ($\text{RFI} = 17,78 \pm 1,05$ pour CPN-2, $\text{RFI} = 9,70 \pm 0,20$ pour CPN-4).

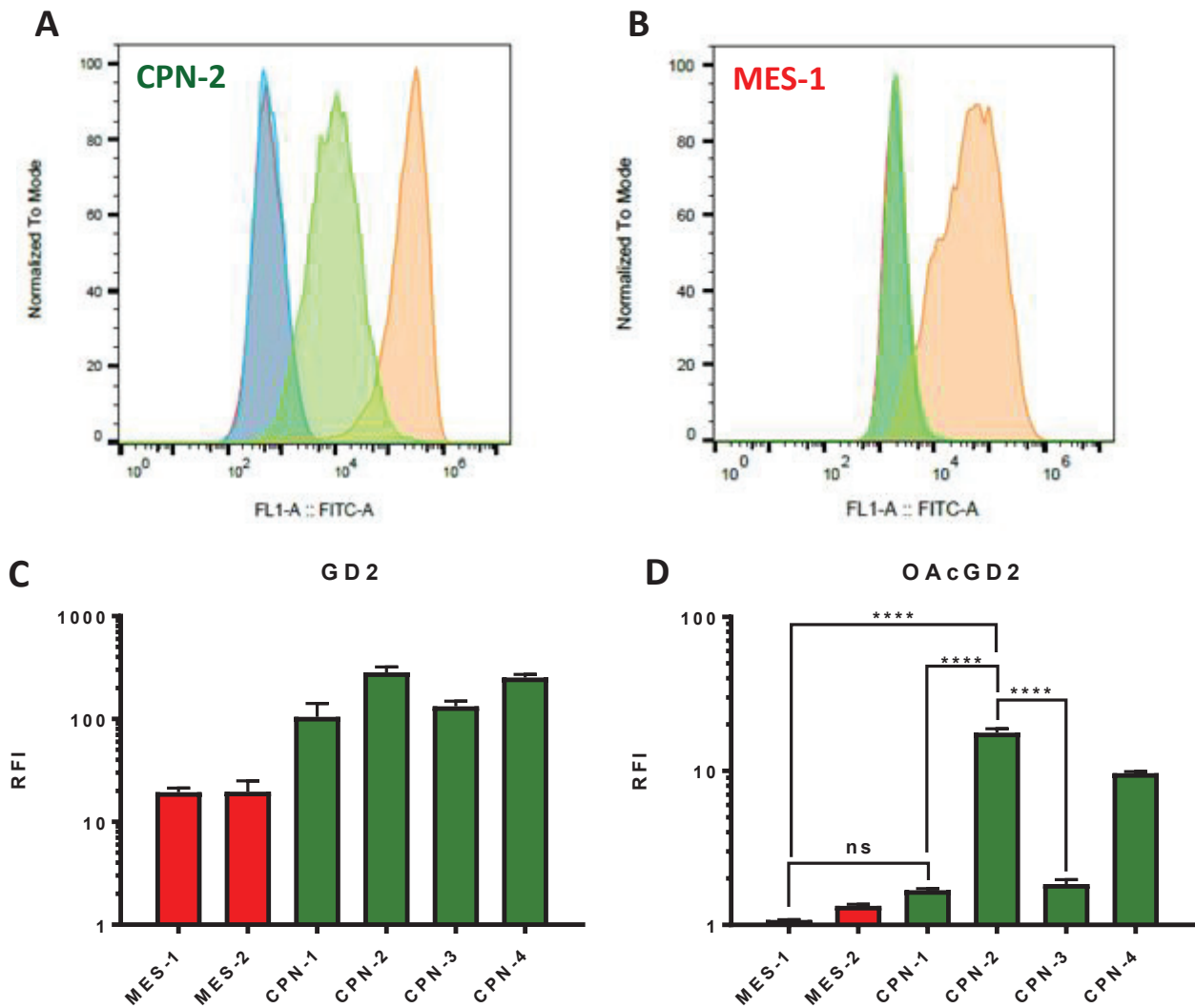


Figure 11 : Analyse de l'expression du GD2 et OAcGD2 par cytométrie de flux (N = 3) Les cellules sont incubées avec un Ac primaire reconnaissant spécifiquement le GD2, l'OAcGD2 ou un Ac isotypique, puis avec un Ac secondaire couplé au FITC. (A-B) Histogramme représentatif de l'expression des gangliosides dans une culture primaire CPN (A) et MES (B). Les cellules non marquées sont indiquées en rouge, marquées avec l'AC isotypique en bleu, l'AC anti-GD2 en orange et l'Ac anti-OAcGD2 en vert. (C) Expression du GD2 dans les cellules de GBM. Les résultats sont présentés en ratio de fluorescence (RFI) du GD2 calculée par rapport à l'isotype du 14G2a (moyenne $\pm$ SD). (D) Expression de l'OAcGD2 dans les cellules de GBM. Les résultats sont présentés en ratio de fluorescence (RFI) de l'OAcGD2 calculée par rapport à l'isotype du 8B6 (moyenne $\pm$ SD).

Nous avons ensuite caractérisé la capacité d'activation des 3 populations de lymphocytes T V γ 9V δ 2 générées à partir d'un même donneur (D0240), à savoir les LT V γ 9V δ 2 non transduits (NT), les LT V γ 9V δ 2 transduits avec un CAR tronqué du domaine d'activation CD3 ζ (Δ CAR) et les LT V γ 9V δ 2 transduits avec un CAR complet (CAR-OAcGD2) (Figure 11A). L'activation respective des différentes populations est mesurée par le % de LT V γ 9V δ 2 exprimant le marqueur d'activation CD107a après addition du phosphoantigène synthétique, le BrHPP (Figure 11B). Comme attendu, nous avons observé une très forte activation des 3 populations de LT V γ 9V δ 2 par le BrHPP puisque plus de 80% des LT exprimaient le CD107a après addition de BrHPP (Figure 12C-E). Cependant, nous avons également noté une auto-activation importante des LT V γ 9V δ 2 CAR-OAcGD2 en absence de signal d'activation au BrHPP (31,08 +/- 1,03 % de LT CD107a positif) ce qui n'est pas observé avec les LT non transduits ou transduits avec le CAR tronqué (<5% pour les NT et les Δ CAR). Compte tenu de l'immunoréactivité spontanée des LT V γ 9V δ 2 qui existe contre les cellules tumorales de sous type MES, il était indispensable d'identifier des conditions de culture dans lesquelles les LT V γ 9V δ 2 CAR-OAcGD2 ne présentent pas d'auto-activation. Dans ce but, l'auto-activation des LT V γ 9V δ 2 CAR-OAcGD2 a été testée dans différentes conditions de culture (CSN, RPMI, addition de SVF, d'albumine de sérum de bovin (BSA) ou de Sérum Humain (SH)) (Figure 12F). Une auto-activation de plus de 30% des LT V γ 9V δ 2 CAR-OAcGD2 a été observé lorsqu'ils sont cultivés en milieu CSN (milieu de culture des cellules cibles) ou en RPMI (milieu de culture des LT) sans différence significative dans ces 2 conditions. Nous avons observé que cette auto-activation était inversement proportionnelle au pourcentage de SVF ou BSA ajouté dans le milieu de culture (Figure 12F). En effet, en présence de 10% de SVF ou de SH, moins de 5% de LT V γ 9V δ 2 CAR-OAcGD2 étaient activés. Ces résultats soulignent que la pression oncotique joue un rôle dans l'activation spontanée des LT CAR sans pour autant l'expliquer complètement. Le SH étant plus précieux, les expériences d'activation des LT V γ 9V δ 2 ont été réalisées par la suite en RPMI 10% SVF.

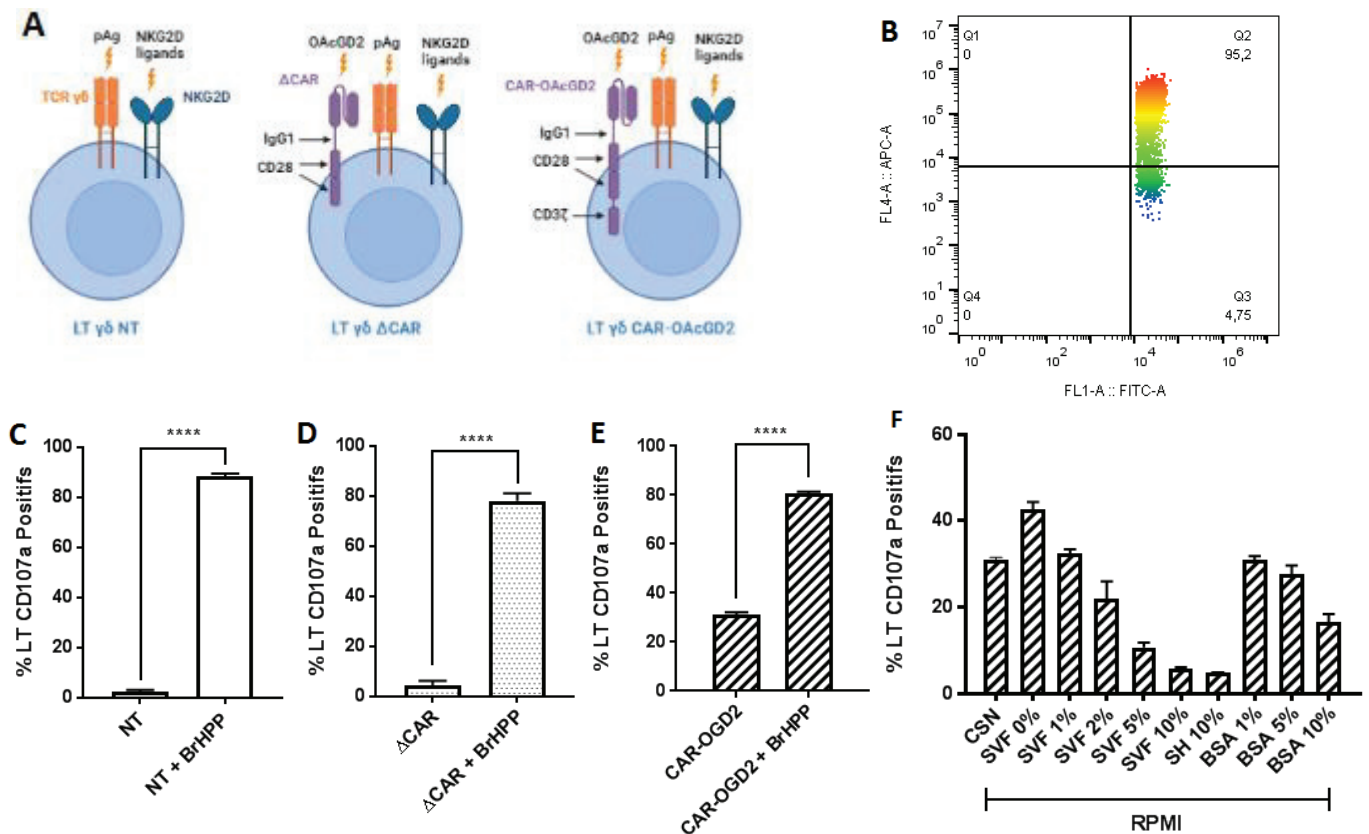
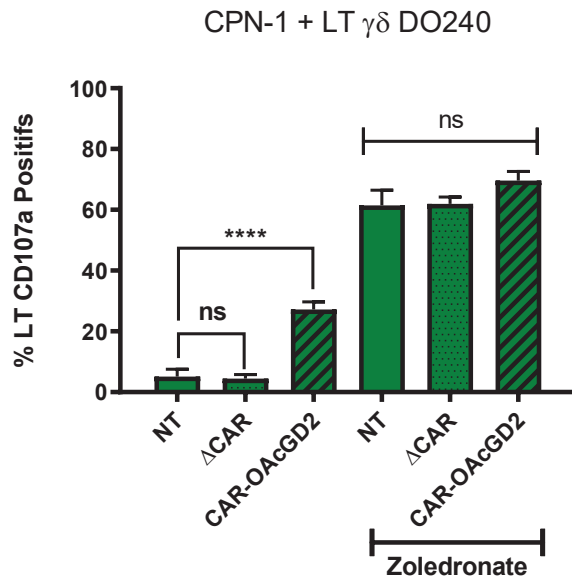
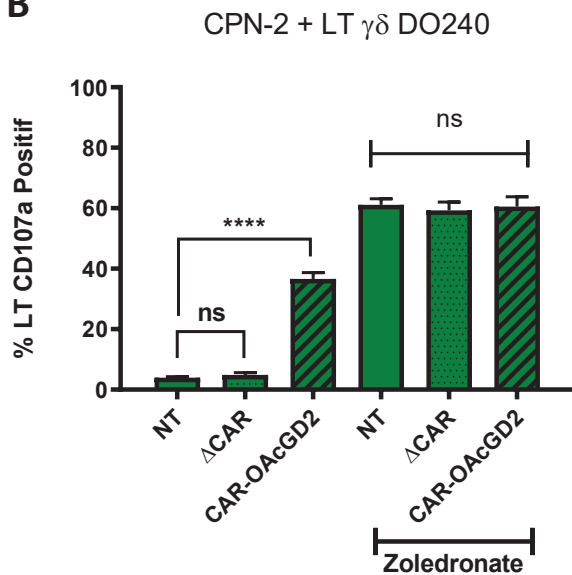


Figure 12 : Expression du CD107a par les LT $V\gamma 9V\delta 2$ en fonction du milieu (A) Schéma des trois populations de LT $V\gamma 9V\delta 2$ utilisés : non transduits (NT) ou transduits avec un CAR anti-OAcGD2 tronqué de la partie CD3 ζ fonctionnelle (Δ CAR) ou complet (CAR-OAcGD2). Ces trois populations présentent le TCR $V\gamma 9V\delta 2$ et des récepteurs activateurs NKG2D. Le CAR est constitué d'un domaine de costimulation et transmembranaire unique dérivé du CD28, ainsi qu'une section hinge dérivée d'une IgG1 humaine. (B) Exemple de dot plot obtenu en cytométrie en flux, permettant de définir le pourcentage de LT $V\gamma 9V\delta 2$ $V\delta 2$ + et CD107a + (ici 95,2%) (C-E) Pourcentage d'activation des LT $V\gamma 9V\delta 2$ NT (C), transduits avec le Δ CAR (D) ou avec le CAR CAR-OAcGD2 (E). Les résultats sont présentés en pourcentage de LT $V\gamma 9V\delta 2$ exprimant le CD107a (moyenne $\pm$ SD) dans du milieu défini, seuls ou en présence de BrHPP. ns = non significatif, **** = $p < 0,0001$ (N = 3) (F) Pourcentage d'auto-activation des LT $V\gamma 9V\delta 2$ CAR-OAcGD2 en fonction des conditions de culture : milieu de culture des CSN, RPMI seul ou en présence de concentrations croissantes de sérum de veau fœtal (SVF) ou d'albumine de sérum bovin (BSA). Les résultats sont présentés en % de LT $V\gamma 9V\delta 2$ CAR-OAcGD2 exprimant le CD107a (moyenne $\pm$ SD) (N = 1).

Immunoréactivité des LT V γ 9V δ 2 transduits avec le CAR-OAcGD2 contre les cultures primaires de GBM de sous-type CPN

Nous avons mesuré l'immunoréactivité des LT V γ 9V δ 2 contre les cultures primaires de GBM de signature moléculaire CPN. Deux cultures ont été testées, CPN-1 et CPN-2, qui expriment respectivement faiblement et fortement l'OAcGD2 (Figure 10D). Comme attendu, moins de 5% d'immunoréactivité a été observée avec les LT V γ 9V δ 2 NT et Δ CAR après coculture avec les cellules tumorales (Figure 13). Ces résultats confirment l'absence d'immunoréactivité spontanée des LT V γ 9V δ 2 contre les cellules tumorales de sous-type CPN. Une préincubation des cellules cibles avec du zoledronate, qui entraîne la production de phosphoantigène endogène par les cellules cibles et ainsi l'activation des LT V γ 9V δ 2, et montre une très forte activation des LT dans ces conditions quel que soit la population de LT V γ 9V δ 2 considérée (Figure 13). De manière intéressante, plus de 25% des LT V γ 9V δ 2 CAR-OAcGD2 sont activés par les cellules CPN-1 et CPN-2 ($27,17 \pm 2,54\%$ pour les cellules CPN-1, et $36,61 \pm 2,09\%$ pour les cellules CPN-2). L'addition du CAR aux LT V γ 9V δ 2 permet donc la reconnaissance des cellules cibles par ces LT et leur activation. De manière surprenante, l'activation des LT V γ 9V δ 2 CAR-OAcGD2 est similaire entre CPN-1 et CPN-2 alors que le niveau d'expression d'OAcGD2 dans ces cellules est très différent (Figure 11D).

Ces résultats montrent que les LT V γ 9V δ 2 CAR-OAcGD2 sont capables de reconnaître les cellules tumorales de sous-type CPN, indépendamment d'une faible ou une forte expression d'OAcGD2.

A**B**

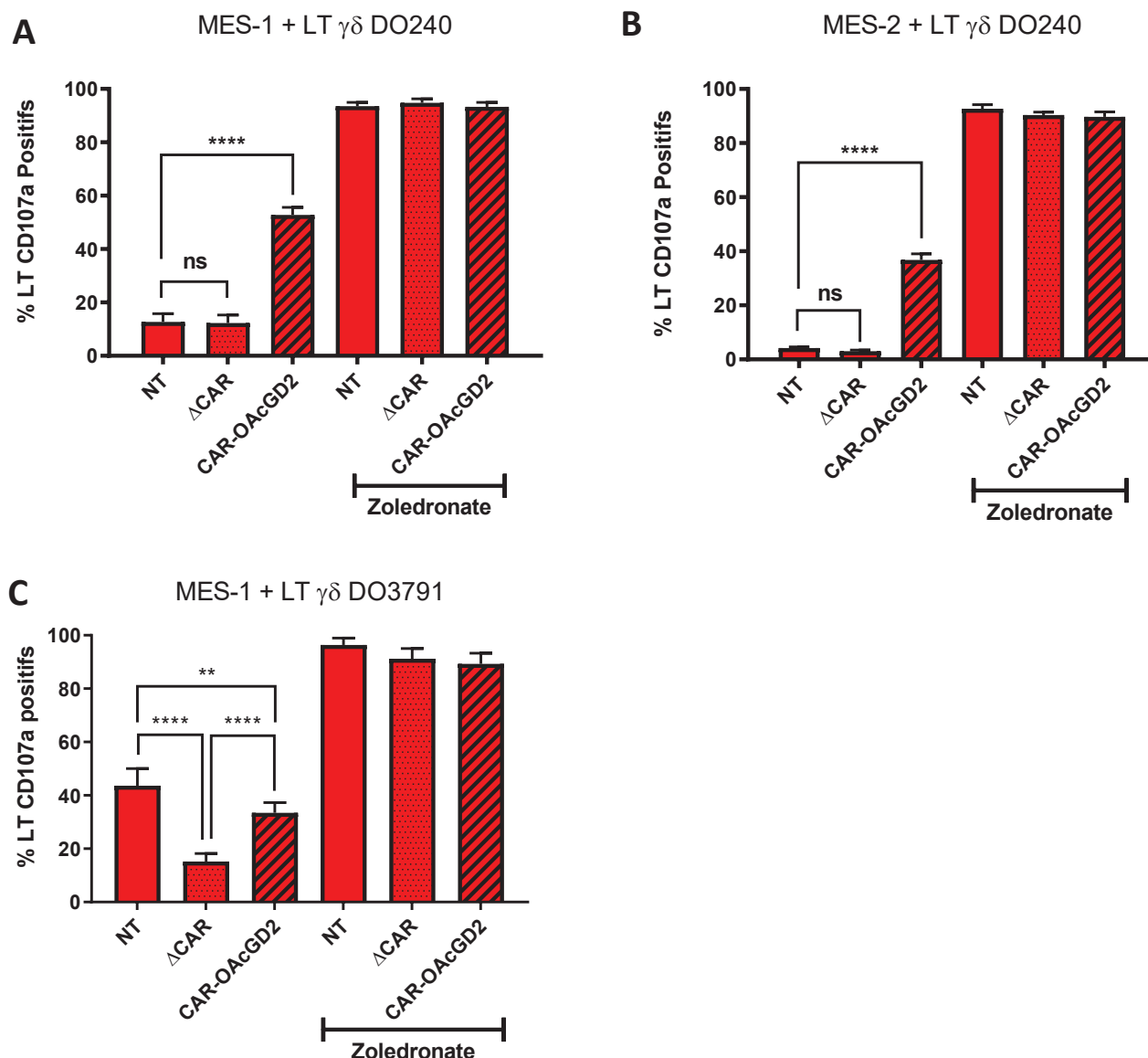
*Figure 13 : Activation des LT $V\gamma 9V\delta 2$ par les cultures primaires de sous-type moléculaire CPN (N = 3) (A-B) Pourcentage d'activation des LT $V\gamma 9V\delta 2$ Non Transduits (NT), transduits avec le CAR tronqué (Δ CAR) ou complet (CAR-OAcGD2) après 4h de coculture avec les cellules CPN-1 (A) ou CPN-2 (B), préalablement traitées ou non par du zoledronate. Les résultats sont présentés en pourcentage de LT $V\gamma 9V\delta 2$ exprimant le CD107a (moyenne +/- SD). ns = différence non significative, ** = $p < 0,01$, **** = $p < 0,0001$.*

Immunoréactivité des LT V γ 9V δ 2 transduits avec le CAR-OAcGD2 contre les cellules de GBM de sous-type MES

Deux cultures primaires de GBM de sous-type MES, MES-1 et MES-2, ont été testées. L'activation des LT V γ 9V δ 2 non transduits, Δ CAR ou CAR-OAcGD2 a été mesurée comme précédemment, en incluant également un contrôle positif avec le zoledronate. Dans un premier temps, ce pré-traitement au zoledronate a permis d'obtenir des taux d'activation de plus de 90% de toutes les populations de LT V γ 9V δ 2, indépendamment de la transduction du CAR ou du donneur. Dans un 1^{er} temps, nous avons analysé l'immunoréactivité spontanée des LT V γ 9V δ 2 non transduits du donneur DO240 avec des LT V γ 9V δ 2 du donneur DO3791 puisqu'il a été montré que les LT V γ 9V δ 2 sont capables de reconnaître et lyser ces cellules spontanément. Nous observons une faible activation des LT V γ 9V δ 2 DO240 non transduits ($12,71 \pm 3,10$ % de LT activés par MES-1 ; $4,22 \pm 0,43$ % par MES-2) (Figure 14A-B) alors qu'une activation significative est observée avec les LT V γ 9V δ 2 DO3791 ($45,79 \pm 2,7$ % de LT activés par MES-1) (Figure 14C).

Dans un 2^{ème} temps, nous avons déterminé si l'addition du CAR affectait cette immunoréactivité initiale. La transduction avec le CAR tronqué (Δ CAR) n'affecte pas la faible immunoréactivité spontanée des LT V γ 9V δ 2 DO240 (Figure 14A-B, NT vs Δ CAR) alors qu'elle diminue significativement l'activation spontanée des LT V γ 9V δ 2 DO3791 (Figure 14C, NT vs Δ CAR). De manière surprenante compte tenu de l'absence de détection du OAcGD2 dans les cellules MES, une activation significative des LT V γ 9V δ 2 DO240 et DO3791 est observée lorsqu'ils sont transduits avec le CAR-OAcGD2 complet ($52,8 \pm 2,79$ % de LT activés par MES-1 ; $36,80 \pm 2,23$ % par MES-2) (Figure 14A-B). Pour les LT V γ 9V δ 2 DO3791, on observe une activation significativement plus faible des LT transduits avec le CAR tronqué : $43,60 \pm 6,48$ % pour les NT contre $15,18 \pm 3,03$ % pour les Δ CAR (Figure 14C, NT vs Δ CAR).

L'ensemble de ces résultats montre que les LT V γ 9V δ 2 CAR-OAcGD2 sont capables de reconnaître et de s'activer en présence des cellules tumorales de sous-type MES, et ce malgré l'absence de détection de la cible. D'autre part, l'addition du CAR semble affecter considérablement l'immunoréactivité spontanée des LT V γ 9V δ 2.



*Figure 14 : Activation des LT $V\gamma 9V\delta 2$ par les cultures primaires de sous-type moléculaire MES ($N = 3$) (A-B) Pourcentage d'activation des LT $V\gamma 9V\delta 2$ DO240 Non Transduits (NT), transduits avec le CAR tronqué (Δ CAR) ou complet (CAR-OAcGD2) après 4h de coculture avec les cellules MES-1 (A) ou MES-2 (B), préalablement traitées ou non par du zoledronate. (C) Pourcentage d'activation des LT $V\gamma 9V\delta 2$ DO3791 Non Transduits (NT), transduits avec le CAR tronqué (Δ CAR) ou complet (CAR-OAcGD2) après 4h de coculture avec les cellules MES-1. Les résultats sont présentés en pourcentage de LT $V\gamma 9V\delta 2$ exprimant le CD107a (moyenne $\pm$ SD). ns = différence non significative, ** = $p < 0,01$, **** = $p < 0,0001$.*

Perte de l'immunoréactivité spontanée des LT V γ 9V δ 2 transduits avec le CAR-OAcGD2

Pour caractériser et ainsi mieux comprendre l'immunoréactivité des LT V γ 9V δ 2 CAR-OAcGD2 contre les cellules MES, des essais de dégranulation ont été réalisés en présence d'inhibiteurs des voies de reconnaissance spontanée des LT V γ 9V δ 2. Dans un premier temps, ce blocage a été réalisé en utilisant un anticorps contre les récepteurs NKG2D (NKG2Di) présents à la surface des LT V γ 9V δ 2 et impliqués dans la reconnaissance spontanée (Figure 15). Que l'immunoréactivité spontanée soit faible (DO240, Figure 14A) ou forte (DO3791, Figure 15B), l'addition des anticorps bloquant les récepteurs NKG2D (NKG2Di) ou l'interaction avec les butyrophilines (BTN3i) réduit significativement l'activation des LT V γ 9V δ 2 ($12,71 \pm 3,1$ % d'activation pour les LT V γ 9V δ 2 DO240 NT seuls, contre $3,56 \pm 0,38$ % en présence de NKG2Di et $1,46 \pm 0,40$ % en présence de BTN3i). A noter que l'inhibition de l'immunoréactivité spontanée est quasiment totale avec BTN3i alors qu'elle n'est que partielle avec NKG2Di, notamment lorsque cette dernière est importante comme avec les LT V γ 9V δ 2 DO3791 ($17,27 \pm 0,61$ % d'activation en présence de NKG2Di, $2,91 \pm 1,16$ % en présence de BTN3i, contre $45,79 \pm 2,7$ % en absence, $p < 0,0001$). Le blocage d'immunoréactivité spontanée des anticorps NKG2Di et BTN3i n'est plus observé lorsque l'expérience est réalisée avec les LT V γ 9V δ 2 CAR-OAcGD2 que ce soit avec les LT V γ 9V δ 2 du donneur DO3791 ou DO240. Ces résultats suggèrent que la reconnaissance et l'activation des LT V γ 9V δ 2 CAR-OAcGD2 par les cellules tumorales de sous-type MES ne mettent pas en jeu les voies d'activation spontanées spécifiques des LT V γ 9V δ 2 et médiées par les butyrophilines et les récepteurs activateurs NKG2D.

La transduction des LT V γ 9V δ 2 a nécessité un tri cellulaire suite à la perte d'expression du marqueur V δ 2 par ces effecteurs immunitaires. Nous nous sommes alors demandé si ce tri n'avait pas entraîné la perte des populations fortement immunoréactives des LT V γ 9V δ 2 du DO3791 (Figure 15C). Des expériences préliminaires ont été réalisées pour confirmer ou infirmer cette hypothèse. Lorsque les expériences sont réalisées avec des populations LT V γ 9V δ 2 CAR-OAcGD2 non triées, une inhibition partielle de l'immunoréactivité spontanée des LT V γ 9V δ 2 CAR-OAcGD2 est observée avec les anticorps bloquants NKG2Di et BTN3i (Figure 15D). Si ces résultats semblent confirmer la perte de la population LT V γ 9V δ 2 fortement immunoréactive, des expériences complémentaires sont indispensables pour le confirmer.

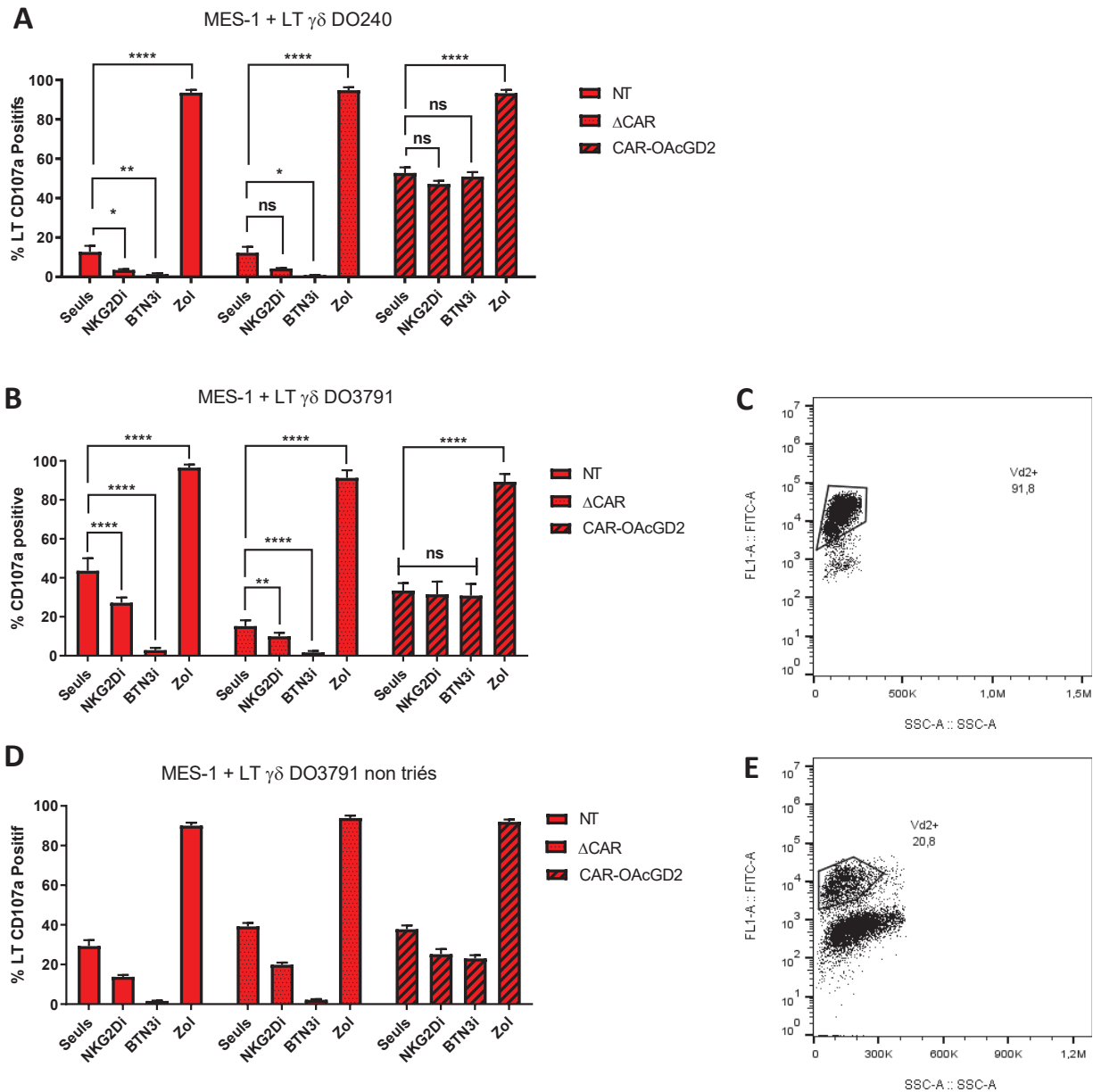


Figure 15 : Activation des LT en présence d'inhibiteurs des voies d'activation spécifiques aux LT $V\gamma 9V\delta 2$ (A, B, D) Pourcentage d'activation des LT $V\gamma 9V\delta 2$ DO240 (A), DO3791 triés (B) ou non (C) Non Transduits (NT), transduits avec le CAR tronqué (Δ CAR) ou complet (CAR-OAcGD2) après 4h de coculture avec la culture primaire de GBM MES-1, en présence ou non d'inhibiteur du récepteur NKG2D (NKG2Di) ou d'inhibiteur de BTN3 (BTN3i) (N = 3). Un traitement au zoledronate est utilisé comme contrôle positif d'activation. Les résultats sont présentés en % de LT $V\gamma 9V\delta 2$ exprimant le CD107a (moyenne $\pm$ SD), ns = différence non significative, * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, * = $p < 0,005$ **** = $p < 0,0001$ (C, E). Pourcentage de LT présentant le TCR $V\gamma 9V\delta 2$ dans la première population de LT $V\gamma 9V\delta 2$ DO3791 transduit avec le CAR-OAcGD2 à l'aide d'un anticorps anti-V $\delta 2$ couplé FITC (ici 91,8% et 20,8%).**

Ciblage de l'immunoréactivité LT V γ 9V δ 2 CAR-OAcGD2 induite par le CAR

Pour déterminer si l'immunoréactivité des LT V γ 9V δ 2 CAR-OAcGD2 observée en présence des cellules de sous-type MES pouvait être OAcGD2-dépendante, malgré l'absence de détection du OAcGD2 par cytométrie en flux, les cocultures de LT V γ 9V δ 2 avec les cellules tumorales ont été réalisées en présence des anticorps dirigé contre l'OAcGD2 (8B6), le GD2 (14G2a) ou encore la section hinge du CAR. Ces expériences ont été réalisées avec des cellules de sous-type MES et CPN afin de pouvoir valider, ou non, les effets potentiels des différents anticorps. Dans un 1^{er} temps, les cellules tumorales ont été préincubées avec l'anticorps 8B6 ou 14G2a en amont de la coculture avec les LT. Ni l'anticorps 8B6, ni le 14G2a n'affectent l'immunoréactivité des LT V γ 9V δ 2 CAR-OAcGD2 contre les cellules tumorales, quelle que soit la signature moléculaire (Figure 16A-B). A noter qu'une activité bloquante de ces anticorps n'a jamais été démontrée. Dans un 2^{ème} temps, les LT V γ 9V δ 2 CAR-OAcGD2 sont préincubés avec un fragment d'anticorps F(ab)'₂. Ce fragment d'Ac semble inhiber partiellement l'activation des LT V γ 9V δ 2 en présence des cellules MES et CPN (Figure 16C). Dirigé contre les chaînes variables et constantes du scFv, le F(ab)'₂ n'inhibe pas directement le CAR mais entraîne un encombrement stérique au niveau du CAR. Ces résultats suggèrent donc qu'au moins une partie de l'activation des LT V γ 9V δ 2 CAR-OAcGD2 contre les cellules MES et CPN est bien médiée par le CAR. Ces expériences ont été réalisées une seule fois et nécessitent d'être reproduites pour confirmer ces résultats.

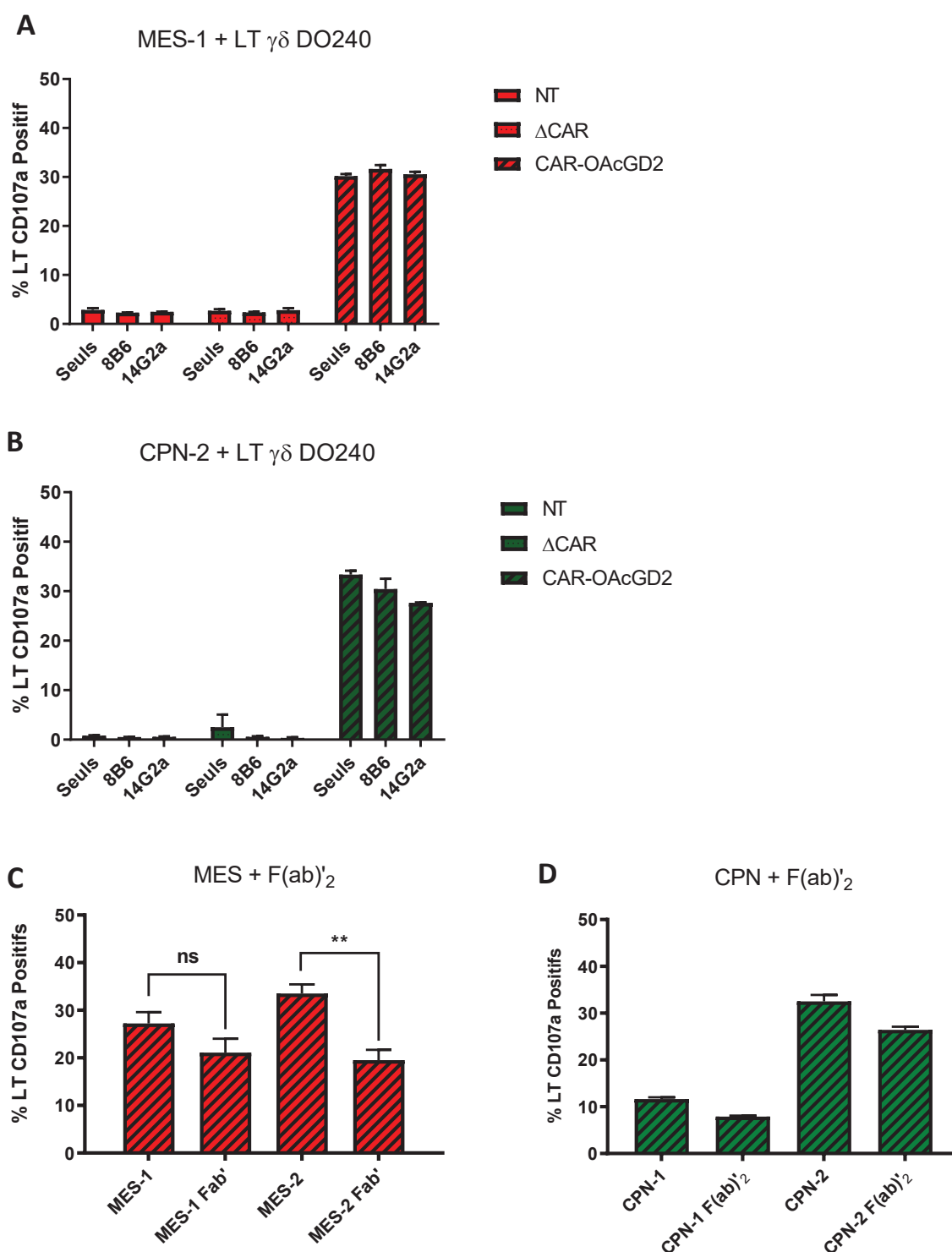
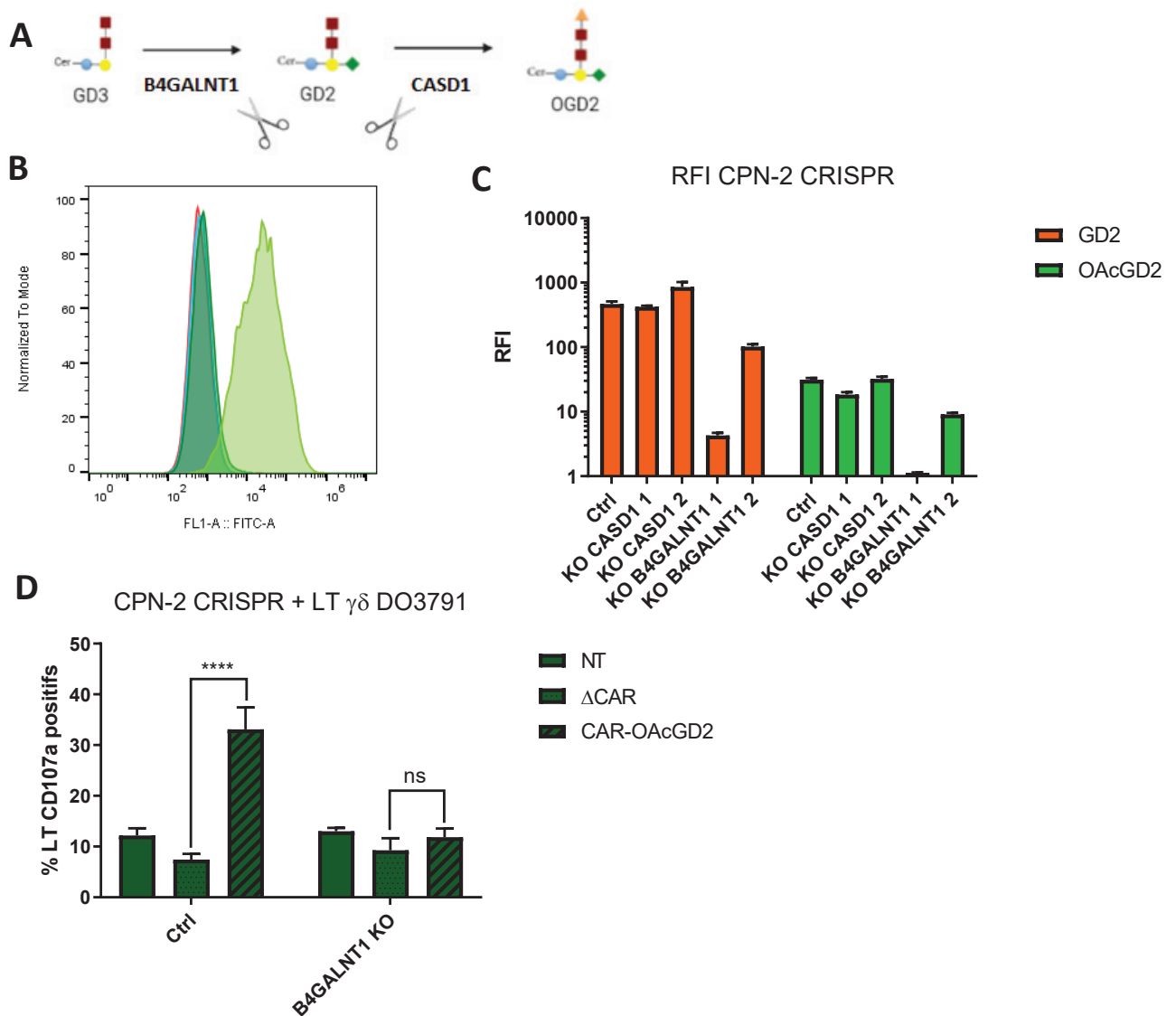


Figure 16 : Activation des LT $V\gamma 9V\delta 2$ DO240 transduits après blocage de la reconnaissance CAR-dépendante (A-B) (N = 1) Pourcentage de LT $V\gamma 9V\delta 2$ CD107a + après 4h de coculture avec les cellules MES- 1 et CPN-2, en présence ou non de l'Ac anti-OAcGD2 (8B6), de l'Ac anti-GD2 (14G2a) (C-D) Pourcentage de LT $V\delta 2$ + et CD107a + après 4h de coculture avec les cellules MES-1, MES-2 (N = 3) (C), CPN- 1 et CPN-2 (N = 1) (D), en présence d'un Ac dirigé contre la fraction constante de l'IgG humaine (F(ab)'₂).

Impact de l'inhibition de la synthèse du OAcGD2 sur l'immunoréactivité des LT V γ 9V δ 2 CAR-OAcGD2

Une autre stratégie pour déterminer si l'immunoréactivité des LT V γ 9V δ 2 CAR-OAcGD2 contre les cellules tumorales de GBM est dépendante du CAR OAcGD2 est d'inhiber la synthèse du OAcGD2 dans les cellules tumorales et déterminer son impact sur l'immunoréactivité des LT V γ 9V δ 2 CAR-OAcGD2. Les enzymes impliquées dans la synthèse du OAcGD2 ne sont pas clairement identifiées cependant certains candidats peuvent être envisagés. Nous avons choisi d'éteindre par la technologie CRISPR/Cas9 l'expression de la GD2 synthase (B4GALNT1), impliquée dans la synthèse du GD2, et de la CASD1, une enzyme impliquée dans la O-acétylation des gangliosides (Figure 17A). Les premières expériences ont été réalisées avec la culture primaire CPN-2 qui exprime le plus fort niveau d'expression d'OAcGD2. Pour chaque enzyme, 2 séquences cibles ont été testées. L'invalidation de CASD1 ne semble pas affecter l'expression du OAcGD2 (Figure 17C). En revanche, l'une des séquences guides permettant l'extinction de la GD2 synthase semble diminuer significativement l'expression du OAcGD2 et du GD2 (Figure 17B-C). L'immunoréactivité des LT V γ 9V δ 2 CAR-OAcGD2 a été analysée en présence de cellules CPN-2 transduites sans séquence guide (Ctrl) ou invalidées avec la séquence guide sg1 (B4GALNT1 sg1) (Figure 17D). Comme attendu, les LT V γ 9V δ 2 CAR-OAcGD2 reconnaissent et s'activent au contact des cellules Ctrl contrairement aux LT non transduits ou transduits avec le CAR tronqué alors qu'elles ne s'activent pas au contact des cellules B4GALNT1-sg1 (NT : $12,2 \pm 1,41$, Δ CAR : $7,44 \pm 1,11$ %, CAR-OAcGD2 : $33,12 \pm 4,31$ %). De manière intéressante, les cellules B4GALNT1-sg1 entraînent les mêmes niveaux d'activation dans les 3 populations de LT V γ 9V δ 2 (NT : $13,00 \pm 0,71$ %, Δ CAR : $9,27 \pm 2,37$ %, CAR-OAcGD2 : $11,86 \pm 1,69$ %). Ainsi, la perte d'expression du OAcGD2 dans les cellules CPN-2 semble être directement corrélée avec l'activation des LT V γ 9V δ 2 CAR-OAcGD2. L'absence d'effet de la 2^{ème} séquence cible permettant l'extinction de la B4GALNT1 ainsi que des séquences cibles dirigée contre la CASD1 pourrait provenir de difficultés expérimentales. De plus, la validation moléculaire de l'extinction de la B4GALNT1 avec la séquence cible sg1 n'a pas encore été formellement validée par RT-qPCR ou western-blot. Ainsi l'ensemble de ces résultats est très préliminaire mais particulièrement informatif d'où leur présentation dans ce manuscrit. L'invalidation de ces 2 enzymes dans les cellules primaires de GBM, CPN mais également MES, et leur impact sur l'immunoréactivité des LT V γ 9V δ 2 CAR-OAcGD2 est l'une des priorités expérimentales de la suite de ce projet.



*Figure 17 : Impact du KO GD2 synthase (B4GALNT1) sur l'expression du OAcGD2 et sur l'activité des LT Vγ9Vδ2 CAR-OAcGD2 (A) Schéma simplifié des enzymes impliquées dans la synthèse du GD2 (B4GALNT1) et de son O-acétylation (CASD1) et dont l'inactivation a été recherchée. Adapté de Fleurence et al, 2017 (108) (B) Analyse de l'expression du OAcGD2 par cytométrie en flux sur une culture CPN-2. Histogramme représentatif des cellules marquées avec l'isotype en bleu, et les cellules marquées avec un Ac dirigé contre l'OAcGD2 couplé FITC en vert clair (CPN-2 Ctrl) et vert foncé (CPN-2 KO B4GALNT1). (C) Expression du GD2 et du OAcGD2 dans les cellules de GBM. Les résultats sont présentés en ratio de fluorescence (RFI) du GD2 ou du OAcGD2 calculée par rapport à l'isotype du 14G2a et du 8B6 (moyenne ± SD). (D) Pourcentage de LT Vδ2+ et CD107a+ après 4h de coculture avec les cellules CPN-2 non modifiées (ctrl) ou KO B4GALNT1. Les résultats sont présentés en % de LT Vγ9Vδ2 exprimant le CD107a (moyenne +/- SD). Ns = différence non significative, ** = $p < 0,01$.*

Activité cytotoxique des LT V γ 9V δ 2 contre les cellules de GBM

Dans l'ensemble de notre étude, nous avons caractérisé l'immunoréactivité des différentes populations de LT V γ 9V δ 2 en analysant l'expression par cytométrie de flux du marqueur de dégranulation CD107a. Pour déterminer si cette activation des LT V γ 9V δ 2 CAR-OAcGD2 est bien associée à une activité cytotoxique des LT V γ 9V δ 2, des expériences préliminaires de cytotoxicité ont été réalisées. Dans ces expériences, l'activité cytotoxique des LT V γ 9V δ 2 a été mesurée en déterminant par des tests au ^{51}Cr la capacité des LT V γ 9V δ 2 à lyser les cellules tumorales, en fonction du ratio effecteur : cible (Figure 18). Ces expériences ont été principalement réalisées avec les LT V γ 9V δ 2 du donneur DO240 qui présentent peu d'immunoréactivité spontanée envers les cellules tumorales. Nous observons une augmentation de la lyse des cellules CPN-2 avec les LT V γ 9V δ 2 non transduits ou ΔCAR en fonction du ratio effecteur : cible (Figure 18A). Ainsi la lyse des cellules tumorales est nulle lorsqu'il y a un effecteur pour une cellule cible, alors qu'elle augmente progressivement avec le nombre d'effecteurs présents dans la coculture pour atteindre 14,2% et 24,3% pour les LT V γ 9V δ 2 non transduits ou ΔCAR respectivement à un ratio de 30 : 1. De manière importante, le pourcentage de cellules CPN-2 lysées par les LT V γ 9V δ 2 CAR-OAcGD2 est beaucoup plus importante que celui observé avec les LT V γ 9V δ 2 non transduits ou ΔCAR , et ce quel que soit le ratio considéré, pour atteindre 52,4% de cellules CPN-2 lysées au ratio 30 : 1 (Figure 18A). Des résultats similaires sont observés avec les cellules tumorales MES-1, c'est-à-dire une lyse proportionnelle au nombre de LT V γ 9V δ 2 et significativement plus importante en présence de LT V γ 9V δ 2 CAR-OAcGD2 (27,5% de lyse au ratio 30 : 1). Ainsi, l'activation des LT V γ 9V δ 2 CAR-OAcGD2 mesurée par l'expression du CD107a est bien directement corrélée à une activité cytotoxique des LT V γ 9V δ 2. Nous remarquerons cependant que l'activité cytotoxique associée à l'immunoréactivité spontanée des LT V γ 9V δ 2 (DO3791) est bien plus efficace que celles des LT V γ 9V δ 2 CAR-OAcGD2 (87,3% au ratio 30 : 1) contre les MES-1. De plus et bien que le niveau d'expression du CD107a était similaire après coculture, l'activité cytotoxique des LT V γ 9V δ 2 CAR-OAcGD2 semble être 2 fois plus importante contre les cellules tumorales CPN-2 que les MES-1.

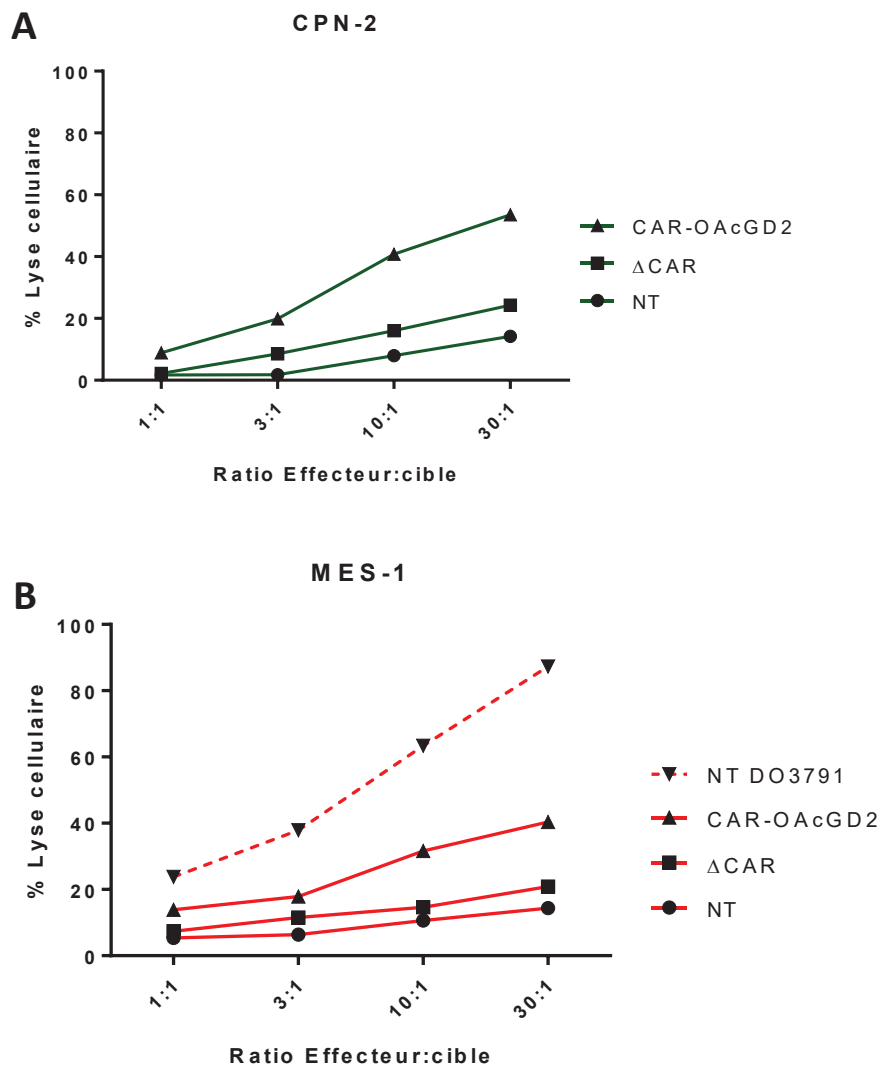


Figure 18 : Cytotoxicité des LT Vγ9Vδ2 DO240 transduits ou non avec le CAR anti-OAcGD2 (N = 2) Pourcentage de lyse des cellules MES-1 (A) ou CPN-2 (B) par les LT γδ non transduits (NT), transduits avec le CAR anti-OAcGD2 tronqué (ΔCAR) ou complet (CAR-OAcGD2). Les résultats sont présentés en % de relargage de ⁵¹Cr par les cellules cibles après 4h de coculture avec les effecteurs.

Discussion

Le GBM est une tumeur cérébrale agressive associée à un mauvais pronostic malgré les traitements mis en place aujourd'hui (4). Toutefois, le GBM étant une tumeur très hétérogène, les stratégies de thérapie ciblant le GBM sont toutes associées à une perte d'efficacité sur moyen terme du fait de la perte de l'antigène cible par les cellules cancéreuses résiduelles (89–91). Dans ce travail, nous avons évalué la pertinence d'une stratégie immunothérapeutique associant l'immunoréactivité spontanée des LT V γ 9V δ 2 avec un ciblage dirigé contre le ganglioside OAcGD2. Nos résultats montrent que les LT V γ 9V δ 2 transduits avec un CAR dirigé contre le OAcGD2 sont bien capables de reconnaître et de lyser les cellules de GBM, et ce indépendamment de leur signature moléculaire et du niveau d'expression du OAcGD2. S'ils méritent d'être affinés, notamment avec une caractérisation des mécanismes moléculaires impliqués et un plus grand nombre de cultures tumorales, nos résultats sont très prometteurs et ouvrent de potentielles nouvelles voies thérapeutiques contre le GBM.

Une caractérisation plus fine de l'immunoréactivité des LT V γ 9V δ 2 a révélé des résultats surprenants quant à l'efficacité de reconnaissance des LT V γ 9V δ 2 CAR-OAcGD2 en fonction de l'expression de la cible par les cellules tumorales et des voies d'activation impliquées dans l'activation des cellules effectrices que ce soit par les cellules de GBM MES et CPN. L'activation des LT V γ 9V δ 2 CAR-OAcGD2 a été observée avec toutes les cellules tumorales de GBM que nous avons testées. Cependant, cette activation semble être indépendante du niveau d'expression d'OAcGD2 par les cellules cibles, alors qu'on s'attendrait à une activation plus forte des LT V γ 9V δ 2 CAR-OAcGD2 face aux cellules exprimant fortement le OAcGD2 (CPN-2) par rapport à celles l'exprimant peu (CPN-1), et une absence d'activation face aux cellules ne l'exprimant pas (MES-1). Comme nous avons préalablement observé que l'expression d'OAcGD2 pouvait varier en fonction de l'état de confluence des cellules, nous avons donc vérifié que l'expression d'OAcGD2 était bien identique avant et après dissociation des sphéroïdes et coculture avec les LT V γ 9V δ 2. Cependant, ces expériences n'ont révélé aucune différence d'expression d'OAcGD2 dans les cellules tumorales. Il est également possible que les cellules MES expriment de très faible quantité d'OAcGD2, que nous ne sommes pas capables de détecter dans nos conditions mais suffisante pour être reconnues et activer les LT V γ 9V δ 2 CAR-OAcGD2. Le OAcGD2 pouvant être localisé dans les radeaux lipidiques des membranes, il n'est pas toujours accessible à une reconnaissance par un anticorps ; un moyen de détection ne se basant pas sur une reconnaissance immunologique

membranaire serait donc intéressant. Pour ce faire, on peut réaliser une extraction lipidique à partir des cultures primaires de GBM, et détecter le OAcGD2 parmi les gangliosides. Cette détection peut être réalisée par spectrométrie de masse, qui permet de quantifier les gangliosides O-acétylé à une précision de l'ordre du femtogramme par cellule (176). Il est également possible de séparer les gangliosides extraits par chromatographie sur couche mince et de détecter le OAcGD2 à l'aide du 8B6 (106,109). Ces deux méthodes permettraient d'obtenir une quantification plus sensible de l'expression de OAcGD2 par nos cultures primaires, et nous pourrions ainsi confronter les résultats obtenus à nos profils de cytométrie en flux.

Ces résultats posent aussi la question de la spécificité de la cible de notre CAR : si ce dernier reconnaît un autre épitope, ce manque de spécificité du CAR pour sa cible pouvant expliquer cette anomalie. Nous avons ainsi voulu bloquer la reconnaissance CAR-dépendante en utilisant les anticorps permettant de détecter l'expression d'OAcGD2 ou du GD2. Cependant, aucun de ces anticorps n'a permis de bloquer l'activation des LT V γ 9V δ 2 CAR-OAcGD2. Ces anticorps ne sont pas des anticorps bloquants, il est donc possible qu'ils se soient bien liés mais ne soient pas capables de bloquer la reconnaissance d'OAcGD2 (ou de GD2) par le CAR. De manière beaucoup plus positive, des analyses avec ces mêmes LT V γ 9V δ 2 CAR-OAcGD2 réalisées dans l'équipe dans le cadre d'un autre projet montre une activation spécifique de ces cellules uniquement par des cellules tumorales de neuroblastome exprimant le OAcGD2. Aucune activation des cellules effectrices n'a été observé par les cellules exprimant le GD2 mais pas de OAcGD2 (177). Pour confirmer que l'immunoréactivité des LT V γ 9V δ 2 CAR-OAcGD2 observée, tout au moins pour les cellules de sous-type CPN, est bien dépendante et spécifique de l'expression d'OAcGD2, nous avons éteint à l'aide de la technologie CRISPR-Cas9 la GD2 synthase (B4GALNT1), responsable de la synthèse du GD2 par les cellules cibles. Cette invalidation a déjà été réalisé dans des cellules de GBM pédiatriques et a permis de montrer que, dans ces conditions, les cellules tumorales n'étaient plus capables d'activer les LT CAR-GD2 (178). Ici, nous montrons bien une activation des LT V γ 9V δ 2 CAR-OAcGD2 dépendante de l'expression de OAcGD2 dans les cellules de sous-type CPN-2. Idéalement, l'extinction de l'enzyme responsable de l'acétylation de GD2 pourrait permettre de valider la spécificité de la cible OAcGD2. En effet, l'inactivation de la GD2 synthase diminue aussi l'expression de GD2, ce qui ne permet donc pas de conclure si cette baisse d'activation est due à la perte d'expression du OAcGD2 ou de GD2. CASD1 est la seule enzyme identifiée à ce jour permettant la O-acétylation des acides sialiques (107). En plus d'inactiver à nouveau B4GALNT1, nous allons

donc aussi tenter d'avoir une inactivation plus spécifique du OAcGD2 en inactivant CASD1 et voir si on a une perte unique de l'expression de OAcGD2 et si elle est suffisamment importante pour impacter l'activation des LT V γ 9V δ 2 CAR-OAcGD2, que ce soit sur les cultures de sous-type CPN ou MES. Pour expliquer l'augmentation de la reconnaissance des cellules exprimant faiblement le OAcGD2 par nos LT CAR, nous voulons également évaluer si la transduction n'excite pas les LT V γ 9V δ 2 CAR-OAcGD2, favorisant ainsi leur activation par d'autres voies. Cette hypothèse va être testée en utilisant des LT V γ 9V δ 2 CAR-HER2 réalisé à partir du même donneur, tout en s'assurant au préalable que les cellules tumorales MES n'expriment pas ce marqueur. En effet, une surexpression de HER-2 a été observée dans 15% des tumeurs de GBM (179). Il est également possible que la transduction du CAR ait modifié l'expression de certains gènes dans les LT V γ 9V δ 2. Par exemple, Il est possible que celle-ci favorise l'expression du CD8 par les LT V γ 9V δ 2 ce qui les rendrait capable de reconnaître le CMH de classe I présent à la surface des cellules cibles, notamment celles de sous-type MES (2). La recherche de l'expression de tels marqueurs à la surface des LT V γ 9V δ 2 pourrait donc s'avérer intéressante pour poursuivre l'exploration de cet effet. Le ciblage immunothérapeutique du GD2 pouvant causer des troubles neuropathiques importants du fait de sa présence sur certaines cellules du système nerveux périphérique saines, il est intéressant de cibler le OAcGD2 car il serait exprimé uniquement par les cellules tumorales (108). En ce sens, il sera nécessaire de tester l'immunoréactivité de nos LT V γ 9V δ 2 CAR-OAcGD2 sur des cellules normales, particulièrement des astrocytes, des cellules neuronales et endothéliales, afin de s'assurer de l'absence de toxicité due à un effet « on-target, off tumor » de notre approche.

Nous avons également voulu comprendre l'activation des LT V γ 9V δ 2 CAR-OAcGD2 par les cellules MES, et notamment déterminer la part due à l'immunoréactivité spontanée spécifique des LT V γ 9V δ 2. Dans un 1^{er} temps, nous avons pu établir que les LT V γ 9V δ 2 DO240 que nous avons utilisé pour la transduction n'étaient pas très immunoréactifs contre les cellules MES, contrairement aux LT V γ 9V δ 2 DO3791 fortement immunoréactifs. Nous avons également montré que le blocage des voies NKG2D et TCR V γ 9V δ 2 n'affectait pas l'activation des LT V γ 9V δ 2 CAR-OAcGD2 DO240 par les cellules MES, excluant l'implication de ces voies dans l'immunoréactivité observée. Nous avons donc ensuite réalisé des LT V γ 9V δ 2 CAR-OAcGD2 en utilisant les LT du donneur DO3791 pour augmenter l'activité de ces LT grâce à leur forte immunoréactivité spontanée. Cependant, la population que nous avons obtenue a perdu cette réactivité après transduction, la population transduite avec le CAR non fonctionnel étant moins réactive que la population non transduite. Il est intéressant de noter que la première culture de

LT V γ 9V δ 2 CAR-OAcGD2 que nous avons obtenue à partir du donneur DO3791 semblait être davantage réactive, et nous avons réussi à mettre en évidence une diminution de leur activation en présence d'inhibiteurs des voies NKG2D et TCR V γ 9V δ 2, preuve que cette population a gardé sa réactivité spontanée. Toutefois, cette population avait une proportion de LT V δ 2+ faible, ce qui a pu induire un biais dans les résultats d'activation du fait de la faible pureté de la population utilisée. Nous avons donc trié nos LT sur leur expression conjointe du CAR et du TCR V γ 9V δ 2 mais ils ont alors perdu leur forte activité spontanée. La proportion de LT ayant initialement été transduits avec le CAR étant de 16%, on a de ce fait sélectionné une partie de la population de LT V γ 9V δ 2. Or, au sein d'une même population de LT V γ 9V δ 2, tous ne vont pas avoir la même réactivité, bien que la raison de cette différence ne soit pas élucidé aujourd'hui (2,137). Une hypothèse pouvant être avancée pour expliquer ce phénomène serait donc que le tri sur l'expression conjointe du CAR et du TCR V γ 9V δ 2 a causé la perte de la population réactive. Si cette hypothèse se confirme, l'origine de cette plus forte réactivité sera importante à identifier afin de pouvoir réaliser des LT V γ 9V δ 2 CAR-OAcGD2 présentant une forte réactivité spontanée. Une alternative serait de transduire des clones de LT V γ 9V δ 2 fortement réactifs avec notre CAR plutôt qu'une culture primaire de LT V γ 9V δ 2, ceux-ci ayant été préalablement isolé par l'équipe (2). Cette population étant homogène, le tri ne devrait alors pas causer de perte de la réactivité spontanée. Il pourrait également être judicieux de voir si on récupère l'immunoréactivité spontanée de notre culture de LT V γ 9V δ 2 CAR-OAcGD2 DO3791 à l'aide de l'IL-21, qui a précédemment montré être capable de sensibiliser les LT V γ 9V δ 2 avant de les administrer sur des modèles murins de GBM (150).

Bien que les cultures primaires de GBM prolifèrent sous forme de sphères, les analyses d'activation des LT sont réalisées avec des suspensions cellulaires homogènes après dissociation mécanique et/ou enzymatique douce des sphères. Si ces conditions permettent d'apporter des preuves de concepts solides, elles ne correspondent pas à la réalité. En effet, les tumeurs solides forment généralement une masse difficile à infiltrer pour les LT, et le GBM n'y fait pas exception (180). Des expériences réalisées avec des modèles cellulaires en 3D et analysées en vidéomicroscopie pourront permettre d'analyser l'infiltration et la cytotoxicité des LT dans des conditions plus proches des tumeurs des patients. Des résultats préliminaires de l'équipe montrent que les LT V γ 9V δ 2 CAR-OAcGD2 éliminent préférentiellement les cellules se trouvant en périphérie de sphéroïdes de lignées de neuroblastome exprimant fortement le OAcGD2 (177). Le GBM étant une tumeur très hétérogène, il paraît crucial de développer un modèle cellulaire recréant au mieux cette hétérogénéité. Par conséquent, il est

intéressant de réaliser un modèle 3D associant des cellules des 2 sous-types marquées à l'aide de protéine fluorescente (GFP pour CPN et RFP pour MES par exemple). Le sous-type MES se situant généralement davantage dans les niches hypoxiques de la masse tumorale et le sous-type CPN davantage en périphérie, l'observation par microscopie confocale de ces sphéroïdes permettra de visualiser la disposition relative de ces sous-types (38). Cette disposition spatiale est importante à déterminer afin de savoir si elle a un impact sur l'élimination des cellules tumorales par nos LT CAR. Cette capacité d'élimination pourra aussi être évaluée en mesurant la fluorescence émise par cytométrie en flux après différents temps d'incubation des sphéroïdes hétérogènes avec les LT V γ 9V δ 2 CAR-OAcGD2 afin de voir si ces derniers éliminent préférentiellement un sous-type plutôt qu'un autre ou si les deux sont éliminés de manière similaire. Déterminer si le caractère souche des cellules tumorales impacte l'expression de l'OAcGD2 et par conséquent la réactivité de nos LT V γ 9V δ 2 CAR-OAcGD2 permettrait de déterminer si les cellules de GBM les plus agressives et radiorésistantes pourraient être ciblées plus efficacement ou non par notre approche (32). Ces paramètres sont d'autant plus importants à établir qu'il a été montré récemment que ces 2 facteurs sont capables de réduire la réponse antitumorale des LT CAR (181). Enfin, il pourrait être intéressant de caractériser la capacité de migration de nos LT, celle-ci étant primordiale pour leur activité *in vivo*. Pour ce faire, on se servira de transwell, qui sont des membranes pouvant être déposées à la surface d'un milieu de culture contenant des cellules tumorales et sur lesquelles peuvent être disposées les LT. Ceci permet de savoir si les LT sont capables de migrer à travers cette membrane si on dépose de l'autre côté de celle-ci des chimiokines ou des cellules tumorales, et donc si ils sont attirés par ces facteurs (182). Le micro-environnement tumoral étant néfaste à l'action des LT, il paraît pertinent de recréer ses différentes caractéristiques dans notre modèle tumoral et de mesurer leurs conséquences sur l'immunoréactivité de nos LT. L'hypoxie est un premier facteur important à évaluer, puisqu'il a déjà été montré que l'hypoxie est néfaste à l'action des LT V γ 9V δ 2 (142). Celle-ci peut être recréée en cultivant nos cellules dans une chambre à hypoxie. Enfin, les cellules tumorales sont capables de mettre en place divers mécanismes d'échappement tumoral, entre autres grâce aux points de contrôles immunitaires. Il pourrait donc être intéressant d'évaluer l'expression de protéines impliquées dans ces mécanismes dans les cultures de GBM, comme par exemple le ligand de PD-1 (PD-L1) ou encore TIM-3. L'association avec des inhibiteurs de ces points de contrôle, comme le nivolumab (un anti-PD-1), pourrait alors s'avérer intéressante pour améliorer l'efficacité de cette approche comme cela a déjà été montré dans des modèles précliniques de tumeurs solides (99). Un dernier mécanisme d'échappement tumoral qui serait intéressant d'évaluer serait la perte de l'expression de

OAcGD2 par nos cultures primaires après coculture avec nos LT V γ 9V δ 2 CAR-OAcGD2. La perte d'expression de la cible étant communément retrouvé dans les essais cliniques avec des LT CAR, ce phénomène est donc particulièrement important à surveiller (89–91). Des injections de ces LT V γ 9V δ 2 sur un modèle murin sont également indispensables avant toute transition vers la clinique. Comme décrit plus haut, il est impossible d'utiliser un modèle syngénique (125). Ceci nous limite à l'utilisation de souris NSG, profondément immunodéficiente et donc peu adaptées à l'évaluation de l'efficacité d'une immunothérapie, mais nous permettant tout de même d'avoir une première évaluation de toxicités éventuelles. Le modèle utilisé précédemment dans l'équipe consiste en un modèle orthotopique de GBM chez des souris NSG et où les LT V γ 9V δ 2 sont injectés en intratumoral (1,2,150). Il pourra être employé afin d'évaluer pour avoir un premier aperçu de l'action clinique de nos LT, en s'intéressant à la survie des souris, au contrôle du volume tumoral ainsi qu'à la mise en place d'une inflammation éventuelle qui pourrait être toxique. Il est également possible de suivre le devenir des LT en les modifiant pour qu'ils expriment un gène rapporteur, comme la luciférase, qui leur permettra d'émettre un signal bioluminescent détectable par certains systèmes d'imagerie (183). Cette approche permet d'apprécier la capacité à migrer vers le site d'injection de la tumeur ainsi que leur capacité à patrouiller dans l'organisme. Des coupes d'immunohistochimie à partir des cerveaux de souris pourront aussi être réalisées afin d'évaluer l'invasion de la tumeur par nos LT ainsi que l'évolution de l'expression du OAcGD2 par les cellules tumorales après injection des LT V γ 9V δ 2 CAR-OAcGD2.

Bien que les essais cliniques utilisant les LT CAR pour traiter le GBM ne soient encore qu'à des phases précoces, cette approche est prometteuse. L'administration de LT CAR était généralement associée à une tolérance correcte, ce qui était le premier résultat que ces essais souhaitaient mettre en évidence. Il est d'intéressant de noter que l'essentiel des LT CAR ne migrent pas à travers la BHE lors d'une administration IV (90). Cette voie d'administration implique donc d'augmenter la dose administrée pour avoir un nombre de LT suffisant au niveau du site tumoral, ce qui expose à un risque augmenté d'effet indésirable grave, notamment de CRS (92). La voie d'administration intra-tumorale permettant de limiter ce problème, elle semble donc à favoriser. Ces études montrent aussi une efficacité encourageante de cette approche, avec une survie des patients traités plus importante par rapport à celle de la population générale. Il a même été observé un patient avec une rémission suffisamment importante pour présenter des métastases, qui ne sont très rares dans le GBM du fait de la forte mortalité associée à ce cancer (89). Cependant, et comme nous l'avons déjà précisé, ces essais

sont limités par l'échappement des cellules tumorales à la reconnaissance des LT CAR en perdant l'expression de la cible du CAR. Plusieurs optimisations sont possibles pour contourner ce problème, comme l'utilisation de CAR reconnaissant plusieurs cibles (85). Ici, nous proposons d'associer la reconnaissance spontanée des cellules tumorales par les LT V γ 9V δ 2 à la reconnaissance induite par un CAR. Les LT V γ 9V δ 2 sont encore peu étudiés en clinique, mais les essais les utilisant ne montrent pas de toxicité particulièrement différente de celle observée avec des LT $\alpha\beta$. Comme ils ne reconnaissent pas le CMH, les LT V γ 9V δ 2 ne présentent pas de rejet de greffon contre l'hôte en cas d'administration allogénique. Il pourrait donc être possible de mettre en place une banque de LT V γ 9V δ 2 issu de donneurs sains prêts à l'emploi, plutôt que de réaliser une transfusion autologue à partir des lymphocytes d'un patient malade. Il faut toutefois noter que les LT injectés présentent les molécules du CMH du donneur, et qu'ils pourraient être rejetés par l'organisme receveur, ce qui limiterait grandement leur persistance chez le receveur et donc leur efficacité thérapeutique potentielle (165). Enfin, nos résultats préliminaires montrent une efficacité préclinique des LT V γ 9V δ 2 CAR-OAcGD2 sur le GBM intéressante, mais qui devra être davantage caractérisée afin d'avoir une preuve de concept suffisamment solide avant de pouvoir envisager une translation éventuelle vers la clinique. Si ces LT CAR sont acceptés pour être testés en clinique, ils seront d'abord utilisés chez des patients présentant un GBM récidivant et donc ayant déjà reçu les traitements conventionnels, à savoir radiothérapie et chimiothérapie à base de témozolomide. Ces derniers pouvant augmenter l'expression des ligands des LT V γ 9V δ 2, particulièrement des ligands de NKG2D (93,184), il pourrait être judicieux de mesurer les modifications éventuelles de l'expression du OAcGD2 par ces traitements sur les cellules de GBM et de vérifier s'ils ont un effet synergique ou antagoniste à l'action des LT V γ 9V δ 2 CAR-OAcGD2.

Conclusions générales

Le transfert adoptif de LT CAR est l'une des pistes d'immunothérapie les plus encourageante pour améliorer le traitement du GBM mais dont l'action est fortement limitée, entres autres par la forte hétérogénéité présentée par le GBM. Le développement de LT CAR capable de dépasser cette hétérogénéité en ayant plusieurs cibles leur permettant de reconnaître les cellules de GBM est donc un moyen de limiter l'échappement et la récurrence tumoral. Notre stratégie s'inscrit ainsi dans cette optique, en alliant une reconnaissance spontanée du sous-type MES des LT V γ 9V δ 2 à une reconnaissance induite par le CAR-OAcGD2 du sous-type CPN, et dont l'évaluation comme approche thérapeutique contre le GBM est totalement justifiée et cohérente avec les autres thérapies innovantes actuellement évaluées.

L'ensemble des résultats que nous avons obtenus suggère que les LT V γ 9V δ 2 CAR-OAcGD2 sont effectivement efficaces contre les cellules de GBM, quel que soit leur sous-type moléculaire et leur degré d'expression du OAcGD2. Ces différents points sont donc très encourageants pour la poursuite de ce projet en tant que stratégie thérapeutique utilisable sur le GBM en clinique. Il convient de souligner qu'il s'agit encore de résultats préliminaires, et que beaucoup de travaux précliniques reste encore à réaliser avant d'imaginer un passage vers la clinique, particulièrement l'élucidation du mécanisme à l'origine de l'activation des LT V γ 9V δ 2 CAR-OAcGD2 et la caractérisation de leur activation sur davantage de cultures primaires et sur des modèle 3D et in vivo. L'identification de facteurs impactant leur efficacité anti tumorale sera également pertinente afin d'optimiser leur utilisation, seuls ou en combinaison avec des traitements permettant d'agir sur ces facteurs putatifs.

Le Président de la thèse,

Nom : Sébastien VIEL

Vu et permis d'imprimer, Lyon, le **21 FEV, 2023**

Vu, le Directeur de l'Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, Faculté de Pharmacie

Signature:



Pour le Président de l'Université Claude Bernard Lyon 1,

Professeur C. DUSSART



Bibliographie

1. Jarry U, Chauvin C, Joalland N, Léger A, Minault S, Robard M, et al. Stereotaxic administrations of allogeneic human V γ 9V δ 2 T cells efficiently control the development of human glioblastoma brain tumors. *Oncoimmunology*. juin 2016;5(6):e1168554.
2. Chauvin C, Joalland N, Perroteau J, Jarry U, Lafrance L, Willem C, et al. NKG2D Controls Natural Reactivity of V γ 9V δ 2 T Lymphocytes against Mesenchymal Glioblastoma Cells. *Clin Cancer Res*. 1 déc 2019;25(23):7218-28.
3. Fleurence J, Cochonneau D, Fougeray S, Oliver L, Geraldo F, Terme M, et al. Targeting and killing glioblastoma with monoclonal antibody to O-acetyl GD2 ganglioside. *Oncotarget*. 5 juill 2016;7(27):41172-85.
4. Ostrom QT, Cioffi G, Waite K, Kruchko C, Barnholtz-Sloan JS. CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2014-2018. *Neuro Oncol*. 5 oct 2021;23(12 Suppl 2):iii1-105.
5. Louis DN, Perry A, Wesseling P, Brat DJ, Cree IA, Figarella-Branger D, et al. The 2021 WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Neuro-Oncology*. 1 août 2021;23(8):1231-51.
6. Reni M, Mazza E, Zanon S, Gatta G, Vecht CJ. Central nervous system gliomas. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. 1 mai 2017;113:213-34.
7. Shukla G, Alexander GS, Bakas S, Nikam R, Talekar K, Palmer JD, et al. Advanced magnetic resonance imaging in glioblastoma: a review. *Chinese Clinical Oncology*. août 2017;6(4):7-7.
8. Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJB, et al. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med*. 10 mars 2005;352(10):987-96.
9. Stupp R, Hegi ME, Mason WP, van den Bent MJ, Taphoorn MJB, Janzer RC, et al. Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. *Lancet Oncol*. mai 2009;10(5):459-66.
10. Figure 4 : Illustration du protocole de radio-chimiothérapie validé par... [Internet]. ResearchGate. [cité 14 mars 2022]. Disponible sur: https://www.researchgate.net/figure/Illustration-du-protocole-de-radio-chimiotherapie-valide-par-R-Stupp_fig3_278382531
11. Lacroix M, Abi-Said D, Fourney DR, Gokaslan ZL, Shi W, DeMonte F, et al. A multivariate analysis of 416 patients with glioblastoma multiforme: prognosis, extent of resection, and survival. *Journal of Neurosurgery*. 1 août 2001;95(2):190-8.
12. Orringer D, Lau D, Khatri S, Zamora-Berridi GJ, Zhang K, Wu C, et al. Extent of resection in patients with glioblastoma: limiting factors, perception of resectability, and effect on survival. *J Neurosurg*. nov 2012;117(5):851-9.
13. Chaichana KL, Cabrera-Aldana EE, Jusue-Torres I, Wijesekera O, Olivi A, Rahman M, et al. When gross total resection of a glioblastoma is possible, how much resection should be achieved? *World Neurosurg*. août 2014;82(1-2):e257-265.

14. Molinaro AM, Hervey-Jumper S, Morshed RA, Young J, Han SJ, Chunduru P, et al. Association of Maximal Extent of Resection of Contrast-Enhanced and Non-Contrast-Enhanced Tumor With Survival Within Molecular Subgroups of Patients With Newly Diagnosed Glioblastoma. *JAMA Oncol.* avr 2020;6(4):495-503.
15. Shah AH, Mahavadi A, Di L, Sanjurjo A, Eichberg DG, Borowy V, et al. Survival benefit of lobectomy for glioblastoma: moving towards radical supramaximal resection. *J Neurooncol.* juill 2020;148(3):501-8.
16. Zhang JJY, Lee KS, Voisin MR, Hervey-Jumper SL, Berger MS, Zadeh G. Awake craniotomy for resection of supratentorial glioblastoma: a systematic review and meta-analysis. *Neurooncol Adv.* 18 sept 2020;2(1):vdaa111.
17. Lawrence YR, Li XA, el Naqa I, Hahn CA, Marks LB, Merchant TE, et al. RADIATION DOSE–VOLUME EFFECTS IN THE BRAIN. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1 mars 2010;76(3 Suppl):S20-7.
18. Tan AC, Ashley DM, López GY, Malinzak M, Friedman HS, Khasraw M. Management of glioblastoma: State of the art and future directions. *CA Cancer J Clin.* juill 2020;70(4):299-312.
19. Roa W, Brasher P m. a., Bauman G, Anthes M, Bruera E, Chan A, et al. Abbreviated Course of Radiation Therapy in Older Patients With Glioblastoma Multiforme: A Prospective Randomized Clinical Trial. *JCO.* 1 mai 2004;22(9):1583-8.
20. Sharma S, Salehi F, Scheithauer BW, Rotondo F, Syro LV, Kovacs K. Role of MGMT in Tumor Development, Progression, Diagnosis, Treatment and Prognosis. *Anticancer Research.* 1 oct 2009;29(10):3759-68.
21. McBain C, Lawrie TA, Rogozińska E, Kernohan A, Robinson T, Jefferies S. Treatment options for progression or recurrence of glioblastoma: a network meta-analysis. *Cochrane Database Syst Rev.* 4 mai 2021;5:CD013579.
22. Combs SE, Heeger S, Haselmann R, Edler L, Debus J, Schulz-Ertner D. Treatment of primary glioblastoma multiforme with cetuximab, radiotherapy and temozolomide (GERT)--phase I/II trial: study protocol. *BMC Cancer.* 18 mai 2006;6:133.
23. Papademetriou IT, Porter T. Promising approaches to circumvent the blood-brain barrier: progress, pitfalls and clinical prospects in brain cancer. *Ther Deliv.* 2015;6(8):989-1016.
24. Sampson JH, Akabani G, Archer GE, Berger MS, Coleman RE, Friedman AH, et al. Intracerebral infusion of an EGFR-targeted toxin in recurrent malignant brain tumors. *Neuro Oncol.* juin 2008;10(3):320-9.
25. Xie J, Shen Z, Anraku Y, Kataoka K, Chen X. Nanomaterial-Based Blood-Brain-Barrier (BBB) Crossing Strategies. *Biomaterials.* déc 2019;224:119491.
26. Feng Q, Shen Y, Fu Y, Muroski ME, Zhang P, Wang Q, et al. Self-Assembly of Gold Nanoparticles Shows Microenvironment-Mediated Dynamic Switching and Enhanced Brain Tumor Targeting. *Theranostics.* 10 avr 2017;7(7):1875-89.
27. Chen X, Yuan M, Zhang Q, Ting Yang Y, Gao H, He Q. Synergistic Combination of Doxorubicin and Paclitaxel Delivered by Blood Brain Barrier and Glioma Cells Dual Targeting Liposomes for Chemotherapy of Brain Glioma. *Curr Pharm Biotechnol.* 2016;17(7):636-50.

28. Yang J, Yan J, Liu B. Targeting EGFRvIII for glioblastoma multiforme. *Cancer Letters*. 10 sept 2017;403:224-30.
29. Zhang Y, Dube C, Gibert M, Cruickshanks N, Wang B, Coughlan M, et al. The p53 Pathway in Glioblastoma. *Cancers (Basel)*. 1 sept 2018;10(9):E297.
30. Bao S, Wu Q, McLendon RE, Hao Y, Shi Q, Hjelmeland AB, et al. Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature*. 7 déc 2006;444(7120):756-60.
31. Tang X, Zuo C, Fang P, Liu G, Qiu Y, Huang Y, et al. Targeting Glioblastoma Stem Cells: A Review on Biomarkers, Signal Pathways and Targeted Therapy. *Front Oncol*. 8 juill 2021;11:701291.
32. Abou-Antoun TJ, Hale JS, Lathia JD, Dombrowski SM. Brain Cancer Stem Cells in Adults and Children: Cell Biology and Therapeutic Implications. *Neurotherapeutics*. avr 2017;14(2):372-84.
33. Verhaak RGW, Hoadley KA, Purdom E, Wang V, Qi Y, Wilkerson MD, et al. An integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR and NF1. *Cancer Cell*. 19 janv 2010;17(1):98.
34. Patel AP, Tirosh I, Trombetta JJ, Shalek AK, Gillespie SM, Wakimoto H, et al. Single-cell RNA-seq highlights intratumoral heterogeneity in primary glioblastoma. *Science*. 20 juin 2014;344(6190):1396-401.
35. Phillips HS, Kharbanda S, Chen R, Forrest WF, Soriano RH, Wu TD, et al. Molecular subclasses of high-grade glioma predict prognosis, delineate a pattern of disease progression, and resemble stages in neurogenesis. *Cancer Cell*. mars 2006;9(3):157-73.
36. Bhat KPL, Balasubramanian V, Vaillant B, Ezhilarasan R, Hummelink K, Hollingsworth F, et al. Mesenchymal differentiation mediated by NF- κ B promotes radiation resistance in glioblastoma. *Cancer Cell*. 9 sept 2013;24(3):331-46.
37. Wang Q, Hu B, Hu X, Kim H, Squatrito M, Scarpace L, et al. Tumor Evolution of Glioma-Intrinsic Gene Expression Subtypes Associates with Immunological Changes in the Microenvironment. *Cancer Cell*. 10 juill 2017;32(1):42-56.e6.
38. Garnier D, Renoult O, Alves-Guerra MC, Paris F, Pecqueur C. Glioblastoma Stem-Like Cells, Metabolic Strategy to Kill a Challenging Target. *Front Oncol*. 6 mars 2019;9:118.
39. Schmitt MJ, Company C, Dramaretska Y, Barozzi I, Göhrig A, Kertalli S, et al. Phenotypic Mapping of Pathologic Cross-Talk between Glioblastoma and Innate Immune Cells by Synthetic Genetic Tracing. *Cancer Discov*. mars 2021;11(3):754-77.
40. Oizel K, Chauvin C, Oliver L, Gratas C, Geraldo F, Jarry U, et al. Efficient Mitochondrial Glutamine Targeting Prevails Over Glioblastoma Metabolic Plasticity. *Clin Cancer Res*. 15 oct 2017;23(20):6292-304.
41. Chédeville AL, Madureira PA. The Role of Hypoxia in Glioblastoma Radiotherapy Resistance. *Cancers (Basel)*. 1 févr 2021;13(3):542.

42. Saxena K, Jolly MK. Acute vs. Chronic vs. Cyclic Hypoxia: Their Differential Dynamics, Molecular Mechanisms, and Effects on Tumor Progression. *Biomolecules*. 3 août 2019;9(8):339.
43. Boyd NH, Tran AN, Bernstock JD, Etminan T, Jones AB, Gillespie GY, et al. Glioma stem cells and their roles within the hypoxic tumor microenvironment. *Theranostics*. 2021;11(2):665-83.
44. Louveau A, Smirnov I, Keyes TJ, Eccles JD, Rouhani SJ, Peske JD, et al. Structural and functional features of central nervous system lymphatics. *Nature*. 16 juill 2015;523(7560):337-41.
45. Auffray C, Sieweke MH, Geissmann F. Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells. *Annu Rev Immunol*. 2009;27:669-92.
46. Cui X, Tan Morales RT, Qian W, Wang H, Gagner JP, Dolgalev I, et al. Hacking Macrophage-associated Immunosuppression for Regulating Glioblastoma Angiogenesis. *Biomaterials*. avr 2018;161:164-78.
47. Takenaka MC, Gabriely G, Rothhammer V, Mascanfroni ID, Wheeler MA, Chao CC, et al. Control of tumor-associated macrophages and T cells in glioblastoma via AHR and CD39. *Nat Neurosci*. mai 2019;22(5):729-40.
48. Chen W, Jin W, Hardegen N, Lei KJ, Li L, Marinos N, et al. Conversion of peripheral CD4+CD25-naïve T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *J Exp Med*. 15 déc 2003;198(12):1875-86.
49. Jacobs JFM, Idema AJ, Bol KF, Grotenhuis JA, de Vries IJM, Wesseling P, et al. Prognostic significance and mechanism of Treg infiltration in human brain tumors. *Journal of Neuroimmunology*. 25 août 2010;225(1):195-9.
50. Nduom EK, Wei J, Yaghi NK, Huang N, Kong LY, Gabrusiewicz K, et al. PD-L1 expression and prognostic impact in glioblastoma. *Neuro Oncol*. févr 2016;18(2):195-205.
51. Li G, Wang Z, Zhang C, Liu X, Cai J, Wang Z, et al. Molecular and clinical characterization of TIM-3 in glioma through 1,024 samples. *Oncoimmunology*. 28 juill 2017;6(8):e1328339.
52. Qi S, Liu Y. Differences in protein expression between the u251 and u87 cell lines. *Turkish Neurosurgery* [Internet]. 2016 [cité 11 oct 2021]; Disponible sur: http://www.turkishneurosurgery.org.tr/summary_en_doi.php3?doi=10.5137/1019-5149.JTN.17746-16.1
53. Singh SK, Clarke ID, Terasaki M, Bonn VE, Hawkins C, Squire J, et al. Identification of a Cancer Stem Cell in Human Brain Tumors. *Cancer Res*. 15 sept 2003;63(18):5821-8.
54. Xie Y, Bergström T, Jiang Y, Johansson P, Marinescu VD, Lindberg N, et al. The Human Glioblastoma Cell Culture Resource: Validated Cell Models Representing All Molecular Subtypes. *EBioMedicine*. oct 2015;2(10):1351-63.
55. Hubert CG, Rivera M, Spangler LC, Wu Q, Mack SC, Prager BC, et al. A three-dimensional organoid culture system derived from human glioblastomas recapitulates the hypoxic gradients and cancer stem cell heterogeneity of tumors found in vivo. *Cancer Res*. 15 avr 2016;76(8):2465-77.

56. Jacob F, Salinas RD, Zhang DY, Nguyen PTT, Schnoll JG, Wong SZH, et al. A Patient-Derived Glioblastoma Organoid Model and Biobank Recapitulates Inter- and Intra-tumoral Heterogeneity. *Cell*. 9 janv 2020;180(1):188-204.e22.
57. Ogawa J, Pao GM, Shokhirev MN, Verma IM. Glioblastoma Model Using Human Cerebral Organoids. *Cell Rep*. 24 avr 2018;23(4):1220-9.
58. Linkous A, Balamatsias D, Snuderl M, Edwards L, Miyaguchi K, Milner T, et al. Modeling Patient-Derived Glioblastoma with Cerebral Organoids. *Cell Rep*. 19 mars 2019;26(12):3203-3211.e5.
59. Ham O, Jin YB, Kim J, Lee MO. Blood vessel formation in cerebral organoids formed from human embryonic stem cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1 janv 2020;521(1):84-90.
60. Patrizzii M, Bartucci M, Pine SR, Sabaawy HE. Utility of Glioblastoma Patient-Derived Orthotopic Xenografts in Drug Discovery and Personalized Therapy. *Front Oncol*. 12 févr 2018;8:23.
61. Van Den Bent MJ, Gan HK, Lassman AB, Kumthekar P, Merrell R, Butowski NA, et al. Efficacy of a novel antibody-drug conjugate (ADC), ABT-414, as monotherapy in epidermal growth factor receptor (EGFR) amplified, recurrent glioblastoma (GBM). *JCO*. 20 mai 2016;34(15_suppl):2542-2542.
62. Rosenthal M, Curry R, Reardon DA, Rasmussen E, Upreti VV, Damore MA, et al. Safety, tolerability, and pharmacokinetics of anti-EGFRvIII antibody-drug conjugate AMG 595 in patients with recurrent malignant glioma expressing EGFRvIII. *Cancer Chemother Pharmacol*. août 2019;84(2):327-36.
63. Cloughesy TF, Mochizuki AY, Orpilla JR, Hugo W, Lee AH, Davidson TB, et al. Neoadjuvant anti-PD-1 immunotherapy promotes a survival benefit with intratumoral and systemic immune responses in recurrent glioblastoma. *Nat Med*. mars 2019;25(3):477-86.
64. National Cancer Institute (NCI). A Phase II Study of Checkpoint Blockade Immunotherapy in Patients With Somatically Hypermutated Recurrent Glioblastoma [Internet]. *clinicaltrials.gov*; 2021 nov [cité 15 nov 2021]. Report No.: NCT04145115. Disponible sur: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04145115>
65. MD PYW. A Phase Ib Clinical Trial to Evaluate Early Immunologic Pharmacodynamic Parameters Following Neoadjuvant Anti-PD-1 (Nivolumab), or the Combination of Anti-PD-1 Plus Anti-CTLA-4 (Nivolumab Plus Ipilimumab) in Patients With Surgically Accessible Glioblastoma [Internet]. *clinicaltrials.gov*; 2021 juill [cité 15 nov 2021]. Report No.: NCT04606316. Disponible sur: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04606316>
66. Wen PY, Reardon DA, Armstrong TS, Phuphanich S, Aiken RD, Landolfi JC, et al. A Randomized Double-Blind Placebo-Controlled Phase II Trial of Dendritic Cell Vaccine ICT-107 in Newly Diagnosed Patients with Glioblastoma. *Clin Cancer Res*. 1 oct 2019;25(19):5799-807.
67. Polyzoidis S, Ashkan K. DCVax®-L—Developed by Northwest Biotherapeutics. *Hum Vaccin Immunother*. 1 nov 2014;10(11):3139-45.
68. Yu MW, Quail DF. Immunotherapy for Glioblastoma: Current Progress and Challenges. *Front Immunol*. 13 mai 2021;12:676301.

69. Martikainen M, Essand M. Virus-Based Immunotherapy of Glioblastoma. *Cancers (Basel)*. 5 févr 2019;11(2):186.
70. Lang FF, Conrad C, Gomez-Manzano C, Yung WKA, Sawaya R, Weinberg JS, et al. Phase I Study of DNX-2401 (Delta-24-RGD) Oncolytic Adenovirus: Replication and Immunotherapeutic Effects in Recurrent Malignant Glioma. *J Clin Oncol*. 10 mai 2018;36(14):1419-27.
71. Desjardins A, Gromeier M, Herndon JE, Beaubier N, Bolognesi DP, Friedman AH, et al. Recurrent Glioblastoma Treated with Recombinant Poliovirus. *N Engl J Med*. 12 juill 2018;379(2):150-61.
72. Wang J, Shen F, Yao Y, Wang LL, Zhu Y, Hu J. Adoptive Cell Therapy: A Novel and Potential Immunotherapy for Glioblastoma. *Front Oncol*. 2020;10:59.
73. Gross G, Waks T, Eshhar Z. Expression of immunoglobulin-T-cell receptor chimeric molecules as functional receptors with antibody-type specificity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. déc 1989;86(24):10024-8.
74. Frigault MJ, Lee J, Basil MC, Carpenito C, Motohashi S, Scholler J, et al. Identification of chimeric antigen receptors that mediate constitutive or inducible proliferation of T cells. *Cancer Immunol Res*. avr 2015;3(4):356-67.
75. Rafiq S, Hackett CS, Brentjens RJ. Engineering strategies to overcome the current roadblocks in CAR T cell therapy. *Nat Rev Clin Oncol*. 2020;17(3):147-67.
76. Schuster SJ, Bishop MR, Tam CS, Waller EK, Borchmann P, McGuirk JP, et al. Tisagenlecleucel in Adult Relapsed or Refractory Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *N Engl J Med*. 3 janv 2019;380(1):45-56.
77. Maude SL, Laetsch TW, Buechner J, Rives S, Boyer M, Bittencourt H, et al. Tisagenlecleucel in Children and Young Adults with B-Cell Lymphoblastic Leukemia. *N Engl J Med*. 1 févr 2018;378(5):439-48.
78. Neelapu SS, Locke FL, Bartlett NL, Lekakis LJ, Miklos DB, Jacobson CA, et al. Axicabtagene Ciloleucel CAR T-Cell Therapy in Refractory Large B-Cell Lymphoma. *N Engl J Med*. 28 déc 2017;377(26):2531-44.
79. YESCARTA (axicabtagène ciloleucel) [Internet]. Haute Autorité de Santé. [cité 16 nov 2021]. Disponible sur: https://www.has-sante.fr/jcms/p_3262244/fr/yescarta-axicabtagene-ciloleucel
80. KYMRIAH (tisagenlecleucel), CAR T anti-CD19 (LDGCB) [Internet]. Haute Autorité de Santé. [cité 16 nov 2021]. Disponible sur: https://www.has-sante.fr/jcms/c_2891692/fr/kymriah-tisagenlecleucel-car-t-anti-cd19-ldgcb
81. Zhang C, Liu J, Zhong JF, Zhang X. Engineering CAR-T cells. *Biomark Res*. 24 juin 2017;5:22.
82. Finney HM, Lawson AD, Bebbington CR, Weir AN. Chimeric receptors providing both primary and costimulatory signaling in T cells from a single gene product. *J Immunol*. 15 sept 1998;161(6):2791-7.
83. Chmielewski M, Abken H. TRUCKs: the fourth generation of CARs. *Expert Opin Biol Ther*. 2015;15(8):1145-54.

84. Kagoya Y, Tanaka S, Guo T, Anczurowski M, Wang CH, Saso K, et al. A novel chimeric antigen receptor containing a JAK-STAT signaling domain mediates superior antitumor effects. *Nat Med.* mars 2018;24(3):352-9.
85. Hegde M, Mukherjee M, Grada Z, Pignata A, Landi D, Navai SA, et al. Tandem CAR T cells targeting HER2 and IL13R α 2 mitigate tumor antigen escape. *J Clin Invest.* 2016;126(8):3036-52.
86. Roybal KT, Williams JZ, Morsut L, Rupp LJ, Kolinko I, Choe JH, et al. Engineering T cells with Customized Therapeutic Response Programs Using Synthetic Notch Receptors. *Cell.* 6 oct 2016;167(2):419-432.e16.
87. Hernandez-Lopez RA, Yu W, Cabral KA, Creasey OA, Lopez Pazmino MDP, Tonai Y, et al. T cell circuits that sense antigen density with an ultrasensitive threshold. *Science.* 12 mars 2021;371(6534):1166-71.
88. Casucci M, Falcone L, Camisa B, Norelli M, Porcellini S, Stornaiuolo A, et al. Extracellular NGFR Spacers Allow Efficient Tracking and Enrichment of Fully Functional CAR-T Cells Co-Expressing a Suicide Gene. *Front Immunol.* 21 mars 2018;9:507.
89. Brown CE, Badie B, Barish ME, Weng L, Ostberg JR, Chang WC, et al. Bioactivity and Safety of IL13R α 2-Redirected Chimeric Antigen Receptor CD8+ T Cells in Patients with Recurrent Glioblastoma. *Clin Cancer Res.* 15 sept 2015;21(18):4062-72.
90. O'Rourke DM, Nasrallah MP, Desai A, Melenhorst JJ, Mansfield K, Morrisette JJD, et al. A single dose of peripherally infused EGFRvIII-directed CAR T cells mediates antigen loss and induces adaptive resistance in patients with recurrent glioblastoma. *Sci Transl Med.* 19 juill 2017;9(399).
91. Ahmed N, Brawley V, Hegde M, Bielałowicz K, Kalra M, Landi D, et al. HER2-Specific Chimeric Antigen Receptor–Modified Virus-Specific T Cells for Progressive Glioblastoma. *JAMA Oncol.* 1 août 2017;3(8):1094-101.
92. Lin Q, Ba T, Ho J, Chen D, Cheng Y, Wang L, et al. First-in-Human Trial of EphA2-Redirected CAR T-Cells in Patients With Recurrent Glioblastoma: A Preliminary Report of Three Cases at the Starting Dose. *Front Oncol.* 2021;11:694941.
93. Weiss T, Weller M, Guckenberger M, Sentman CL, Roth P. NKG2D-Based CAR T Cells and Radiotherapy Exert Synergistic Efficacy in Glioblastoma. *Cancer Res.* 15 févr 2018;78(4):1031-43.
94. Garnett CT, Palena C, Chakraborty M, Chakraborty M, Tsang KY, Schlom J, et al. Sublethal irradiation of human tumor cells modulates phenotype resulting in enhanced killing by cytotoxic T lymphocytes. *Cancer Res.* 1 nov 2004;64(21):7985-94.
95. Monach PA, Meredith SC, T.Siegel C, Schreiber H. A unique tumor antigen produced by a single amino acid substitution. *Immunity.* 1 janv 1995;2(1):45-59.
96. Peng M, Mo Y, Wang Y, Wu P, Zhang Y, Xiong F, et al. Neoantigen vaccine: an emerging tumor immunotherapy. *Mol Cancer.* 23 août 2019;18:128.
97. De Martino M, Daviaud C, Vanpouille-Box C. Radiotherapy: An immune response modifier for immuno-oncology. *Semin Immunol.* févr 2021;52:101474.

98. Vanpouille-Box C, Alard A, Aryankalayil MJ, Sarfraz Y, Diamond JM, Schneider RJ, et al. DNA exonuclease Trex1 regulates radiotherapy-induced tumour immunogenicity. *Nat Commun.* 9 juin 2017;8(1):15618.
99. John LB, Devaud C, Duong CPM, Yong CS, Beavis PA, Haynes NM, et al. Anti-PD-1 Antibody Therapy Potently Enhances the Eradication of Established Tumors By Gene-Modified T Cells. *Clin Cancer Res.* 15 oct 2013;19(20):5636-46.
100. City of Hope Medical Center. A Phase 1 Study to Evaluate IL13R α 2-Targeted Chimeric Antigen Receptor (CAR) T Cells Combined With Checkpoint Inhibition for Patients With Resectable Recurrent Glioblastoma [Internet]. *clinicaltrials.gov*; 2021 oct [cité 14 nov 2021]. Report No.: NCT04003649. Disponible sur: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04003649>
101. Huang J, Zheng M, Zhang Z, Tang X, Chen Y, Peng A, et al. Interleukin-7-loaded oncolytic adenovirus improves CAR-T cell therapy for glioblastoma. *Cancer Immunol Immunother.* sept 2021;70(9):2453-65.
102. Xie G, Dong H, Liang Y, Ham JD, Rizwan R, Chen J. CAR-NK cells: A promising cellular immunotherapy for cancer. *EBioMedicine.* 24 août 2020;59:102975.
103. Gong JH, Maki G, Klingemann HG. Characterization of a human cell line (NK-92) with phenotypical and functional characteristics of activated natural killer cells. *Leukemia.* avr 1994;8(4):652-8.
104. Arai S, Meagher R, Swearingen M, Myint H, Rich E, Martinson J, et al. Infusion of the allogeneic cell line NK-92 in patients with advanced renal cell cancer or melanoma: a phase I trial. *Cytotherapy.* 2008;10(6):625-32.
105. Tonn T, Schwabe D, Klingemann HG, Becker S, Esser R, Koehl U, et al. Treatment of patients with advanced cancer with the natural killer cell line NK-92. *Cytotherapy.* déc 2013;15(12):1563-70.
106. Fabris D, Karmelić I, Muharemović H, Sajko T, Jurilj M, Potočki S, et al. Ganglioside Composition Distinguishes Anaplastic Ganglioglioma Tumor Tissue from Peritumoral Brain Tissue: Complementary Mass Spectrometry and Thin-Layer Chromatography Evidence. *Int J Mol Sci.* 17 août 2021;22(16):8844.
107. Baumann AMT, Bakkers MJG, Buettner FFR, Hartmann M, Grove M, Langereis MA, et al. 9-O-Acetylation of sialic acids is catalysed by CASD1 via a covalent acetyl-enzyme intermediate. *Nat Commun.* 14 juill 2015;6:7673.
108. Fleurence J, Fougeray S, Bahri M, Cochonneau D, Clémenceau B, Paris F, et al. Targeting O-Acetyl-GD2 Ganglioside for Cancer Immunotherapy. *J Immunol Res.* 2017;2017:5604891.
109. Cavdarli S, Schröter L, Albers M, Baumann AM, Vicogne D, Le Doussal JM, et al. Role of Sialyl-O-Acetyltransferase CASD1 on GD2 Ganglioside O-Acetylation in Breast Cancer Cells. *Cells.* 11 juin 2021;10(6):1468.
110. Kroesen M, Büll C, Gielen PR, Brok IC, Armandari I, Wassink M, et al. Anti-GD2 mAb and Vorinostat synergize in the treatment of neuroblastoma. *Oncoimmunology.* 28 mars 2016;5(6):e1164919.

111. Yu RK, Bieberich E, Xia T, Zeng G. Regulation of ganglioside biosynthesis in the nervous system. *Journal of Lipid Research*. 1 mai 2004;45(5):783-93.
112. Cheresh DA, Pierschbacher MD, Herzig MA, Mujoo K. Disialogangliosides GD2 and GD3 are involved in the attachment of human melanoma and neuroblastoma cells to extracellular matrix proteins. *Journal of Cell Biology*. 1 mars 1986;102(3):688-96.
113. Ryu JS, Seo SY, Jeong EJ, Kim JY, Koh YG, Kim YI, et al. Ganglioside GM3 Up-Regulate Chondrogenic Differentiation by Transform Growth Factor Receptors. *Int J Mol Sci*. 13 mars 2020;21(6):1967.
114. Marconi S, De Toni L, Lovato L, Tedeschi E, Gaetti L, Acler M, et al. Expression of gangliosides on glial and neuronal cells in normal and pathological adult human brain. *J Neuroimmunol*. 30 déc 2005;170(1-2):115-21.
115. Iwasawa T, Zhang P, Ohkawa Y, Momota H, Wakabayashi T, Ohmi Y, et al. Enhancement of malignant properties of human glioma cells by ganglioside GD3/GD2. *International Journal of Oncology*. 1 avr 2018;52(4):1255-66.
116. Fahr C, Schauer R. Detection of sialic acids and gangliosides with special reference to 9-O-acetylated species in basalomas and normal human skin. *J Invest Dermatol*. févr 2001;116(2):254-60.
117. Cavdarli S, Delannoy P, Groux-Degroote S. O-acetylated Gangliosides as Targets for Cancer Immunotherapy. *Cells*. 17 mars 2020;9(3).
118. DINUTUXIMAB BETA EUSA (dinutuximab bêta), anticorps monoclonal [Internet]. Haute Autorité de Santé. [cité 6 janv 2022]. Disponible sur: https://www.has-sante.fr/jcms/c_2808580/fr/dinutuximab-beta-eusa-dinutuximab-beta-anticorps-monoclonal
119. Marx S, Wilken F, Wagner I, Marx M, Troschke-Meurer S, Zumpe M, et al. GD2 targeting by dinutuximab beta is a promising immunotherapeutic approach against malignant glioma. *J Neurooncol*. mai 2020;147(3):577-85.
120. Prapa M, Chiavelli C, Golinelli G, Grisendi G, Bestagno M, Di Tinco R, et al. GD2 CAR T cells against human glioblastoma. *NPJ Precis Oncol*. 27 oct 2021;5:93.
121. Richman SA, Nunez-Cruz S, Moghimi B, Li LZ, Gershenson ZT, Mourelatos Z, et al. High-Affinity GD2-Specific CAR T Cells Induce Fatal Encephalitis in a Preclinical Neuroblastoma Model. *Cancer Immunol Res*. janv 2018;6(1):36-46.
122. Majzner RG, Ramakrishna S, Yeom KW, Patel S, Chinnasamy H, Schultz LM, et al. GD2-CAR T cell therapy for H3K27M-mutated diffuse midline gliomas. *Nature*. 7 févr 2022;
123. Terme M, Dorvillius M, Cochonneau D, Chaumette T, Xiao W, Diccianni MB, et al. Chimeric Antibody c.8B6 to O-Acetyl-GD2 Mediates the Same Efficient Anti-Neuroblastoma Effects as Therapeutic ch14.18 Antibody to GD2 without Antibody Induced Allodynia. *PLoS One* [Internet]. 10 févr 2014 [cité 28 mai 2021];9(2). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3919714/>
124. Ribot JC, Lopes N, Silva-Santos B. $\gamma\delta$ T cells in tissue physiology and surveillance. *Nat Rev Immunol*. avr 2021;21(4):221-32.

125. Silva-Santos B, Serre K, Norell H. $\gamma\delta$ T cells in cancer. *Nat Rev Immunol*. nov 2015;15(11):683-91.
126. Chien Y hsiu, Meyer C, Bonneville M. $\gamma\delta$ T Cells: First Line of Defense and Beyond [Internet]. <http://dx.doi.org.doelec.univ-lyon1.fr/10.1146/annurev-immunol-032713-120216>. 2014 [cité 15 sept 2021]. Disponible sur: <https://www-annualreviews-org.doelec.univ-lyon1.fr/doi/abs/10.1146/annurev-immunol-032713-120216>
127. Parker CM, Groh V, Band H, Porcelli SA, Morita C, Fabbi M, et al. Evidence for extrathymic changes in the T cell receptor gamma/delta repertoire. *J Exp Med*. 1 mai 1990;171(5):1597-612.
128. Groh V, Porcelli S, Fabbi M, Lanier LL, Picker LJ, Anderson T, et al. Human lymphocytes bearing T cell receptor gamma/delta are phenotypically diverse and evenly distributed throughout the lymphoid system. *J Exp Med*. 1 avr 1989;169(4):1277-94.
129. Gober HJ, Kistowska M, Angman L, Jenö P, Mori L, De Libero G. Human T cell receptor gammadelta cells recognize endogenous mevalonate metabolites in tumor cells. *J Exp Med*. 20 janv 2003;197(2):163-8.
130. Lang F, Peyrat MA, Constant P, Davodeau F, David-Ameline J, Poquet Y, et al. Early activation of human V gamma 9V delta 2 T cell broad cytotoxicity and TNF production by nonpeptidic mycobacterial ligands. *J Immunol*. 1 juin 1995;154(11):5986-94.
131. Morita CT, Beckman EM, Bukowski JF, Tanaka Y, Band H, Bloom BR, et al. Direct presentation of nonpeptide prenyl pyrophosphate antigens to human gamma delta T cells. *Immunity*. oct 1995;3(4):495-507.
132. Harly C, Guillaume Y, Nedellec S, Peigné CM, Mönkkönen H, Mönkkönen J, et al. Key implication of CD277/butyrophilin-3 (BTN3A) in cellular stress sensing by a major human $\gamma\delta$ T-cell subset. *Blood*. 13 sept 2012;120(11):2269-79.
133. Vavassori S, Kumar A, Wan GS, Ramanjaneyulu GS, Cavallari M, El Daker S, et al. Butyrophilin 3A1 binds phosphorylated antigens and stimulates human $\gamma\delta$ T cells. *Nat Immunol*. sept 2013;14(9):908-16.
134. Karunakaran MM, Willcox CR, Salim M, Paletta D, Fichtner AS, Noll A, et al. Butyrophilin-2A1 Directly Binds Germline-Encoded Regions of the V γ 9V δ 2 TCR and Is Essential for Phosphoantigen Sensing. *Immunity*. 17 mars 2020;52(3):487-498.e6.
135. Rigau M, Ostrouska S, Fulford TS, Johnson DN, Woods K, Ruan Z, et al. Butyrophilin 2A1 is essential for phosphoantigen reactivity by $\gamma\delta$ T cells. *Science*. 7 févr 2020;367(6478):eaay5516.
136. Harly C, Peigné CM, Scotet E. Molecules and Mechanisms Implicated in the Peculiar Antigenic Activation Process of Human V γ 9V δ 2 T Cells. *Front Immunol*. 2014;5:657.
137. Vyborova A, Beringer DX, Fasci D, Karaïskaki F, van Diest E, Kramer L, et al. $\gamma\delta$ 2T cell diversity and the receptor interface with tumor cells. *J Clin Invest*. 130(9):4637-51.
138. Espinosa E, Belmont C, Pont F, Luciani B, Poupot R, Romagné F, et al. Chemical synthesis and biological activity of bromohydrin pyrophosphate, a potent stimulator of human gamma delta T cells. *J Biol Chem*. 25 mai 2001;276(21):18337-44.

139. Rincon-Orozco B, Kunzmann V, Wrobel P, Kabelitz D, Steinle A, Herrmann T. Activation of V γ 9V δ 2 T Cells by NKG2D. *The Journal of Immunology*. 15 août 2005;175(4):2144-51.
140. Wrobel P, Shojaei H, Schitteck B, Gieseler F, Wollenberg B, Kalthoff H, et al. Lysis of a broad range of epithelial tumour cells by human gamma delta T cells: involvement of NKG2D ligands and T-cell receptor- versus NKG2D-dependent recognition. *Scand J Immunol*. sept 2007;66(2-3):320-8.
141. Kühl AA, Pawlowski NN, Grollich K, Blessenohl M, Westermann J, Zeitz M, et al. Human peripheral $\gamma\delta$ T cells possess regulatory potential. *Immunology*. déc 2009;128(4):580-8.
142. Park JH, Kim HJ, Kim CW, Kim HC, Jung Y, Lee HS, et al. Tumor hypoxia represses $\gamma\delta$ T cell-mediated antitumor immunity against brain tumors. *Nature Immunology*. mars 2021;22(3):336-46.
143. Dieli F, Troye-Blomberg M, Ivanyi J, Fournié JJ, Krensky AM, Bonneville M, et al. Granulysin-dependent killing of intracellular and extracellular Mycobacterium tuberculosis by Vgamma9/Vdelta2 T lymphocytes. *J Infect Dis*. 15 oct 2001;184(8):1082-5.
144. Qin G, Mao H, Zheng J, Sia SF, Liu Y, Chan PL, et al. Phosphoantigen-Expanded Human $\gamma\delta$ T Cells Display Potent Cytotoxicity against Monocyte-Derived Macrophages Infected with Human and Avian Influenza Viruses. *J Infect Dis*. sept 2009;200(6):858-65.
145. Khan MWA, Curbishley SM, Chen HC, Thomas AD, Pircher H, Mavilio D, et al. Expanded Human Blood-Derived $\gamma\delta$ T Cells Display Potent Antigen-Presentation Functions. *Front Immunol*. 23 juill 2014;5:344.
146. Brandes M, Willmann K, Bioley G, Lévy N, Eberl M, Luo M, et al. Cross-presenting human $\gamma\delta$ T cells induce robust CD8+ $\alpha\beta$ T cell responses. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 17 févr 2009;106(7):2307-12.
147. Lo Presti E, Pizzolato G, Gulotta E, Cocorullo G, Gulotta G, Dieli F, et al. Current Advances in $\gamma\delta$ T Cell-Based Tumor Immunotherapy. *Front Immunol*. 27 oct 2017;8:1401.
148. Joalland N, Lafrance L, Oullier T, Marionneau-Lambot S, Loussouarn D, Jarry U, et al. Combined chemotherapy and allogeneic human V γ 9V δ 2 T lymphocyte-immunotherapies efficiently control the development of human epithelial ovarian cancer cells in vivo. *Oncoimmunology*. 2019;8(11):e1649971.
149. De Luca A, Lamura L, Gallo M, Daniele G, D'Alessio A, Giordano P, et al. Pharmacokinetic evaluation of zoledronic acid. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. juill 2011;7(7):911-8.
150. Joalland N, Chauvin C, Oliver L, Vallette FM, Pecqueur C, Jarry U, et al. IL-21 Increases the Reactivity of Allogeneic Human V γ 9V δ 2 T Cells Against Primary Glioblastoma Tumors. *J Immunother*. juin 2018;41(5):224-31.
151. Buqué A, Galluzzi L. Modeling Tumor Immunology and Immunotherapy in Mice. *Trends Cancer*. sept 2018;4(9):599-601.
152. Heilig JS, Tonegawa S. Diversity of murine gamma genes and expression in fetal and adult T lymphocytes. *Nature*. 28 sept 1986;322(6082):836-40.

153. Karunakaran MM, Göbel TW, Starick L, Walter L, Herrmann T. V γ 9 and V δ 2 T cell antigen receptor genes and butyrophilin 3 (BTN3) emerged with placental mammals and are concomitantly preserved in selected species like alpaca (*Vicugna pacos*). *Immunogenetics*. avr 2014;66(4):243-54.
154. Fazzi R, Petrini I, Giuliani N, Morganti R, Carulli G, Dalla Palma B, et al. Phase II Trial of Maintenance Treatment With IL2 and Zoledronate in Multiple Myeloma After Bone Marrow Transplantation: Biological and Clinical Results. *Front Immunol*. 3 févr 2021;11:573156.
155. University of Alabama at Birmingham. Pilot Study of Zoledronic Acid and Interleukin-2 for Refractory Pediatric Neuroblastoma: Assessment of Tolerability and In Vivo Expansion $\gamma\delta$ T-Cells [Internet]. *clinicaltrials.gov*; 2014 déc [cité 10 oct 2021]. Report No.: NCT01404702. Disponible sur: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01404702>
156. University of Wisconsin, Madison. Phase II Study of Interleukin-2 in Combination With Zoledronic Acid in Patients With Untreated Metastatic Renal Cell Carcinoma [Internet]. *clinicaltrials.gov*; 2019 nov [cité 10 oct 2021]. Report No.: NCT00582790. Disponible sur: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00582790>
157. University of Wisconsin, Madison. Pilot Clinical Trial of Short-Term Bisphosphonate Administration as Chemoprevention for Breast Cancer Via Engagement of $\gamma\delta$ T Cells [Internet]. *clinicaltrials.gov*; 2020 oct [cité 10 oct 2021]. Report No.: NCT02781805. Disponible sur: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02781805>
158. Fuda Cancer Hospital, Guangzhou. $\gamma\delta$ T Cell Immunotherapy for Treatment of Breast Cancer [Internet]. *clinicaltrials.gov*; 2020 juill [cité 11 oct 2021]. Report No.: NCT03183206. Disponible sur: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03183206>
159. Fuda Cancer Hospital, Guangzhou. $\gamma\delta$ T Cell Immunotherapy for Treatment of Hepatocellular Liver Cancer [Internet]. *clinicaltrials.gov*; 2016 juill [cité 11 oct 2021]. Report No.: NCT02425735. Disponible sur: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02425735>
160. Fuda Cancer Hospital, Guangzhou. $\gamma\delta$ T Cell Immunotherapy for Treatment of Lung Cancer [Internet]. *clinicaltrials.gov*; 2020 juill [cité 11 oct 2021]. Report No.: NCT03183232. Disponible sur: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03183232>
161. weidong H. A Phase I / II Study of Ex Vivo Expanded Allogeneic $\gamma\delta$ T Cell Therapy for Treatment of Patients With Advanced Solid Cancers Which Have No Objective Response to Current Treatment [Internet]. *clinicaltrials.gov*; 2021 févr [cité 11 oct 2021]. Report No.: NCT04765462. Disponible sur: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04765462>
162. Novel Gamma-Delta ($\gamma\delta$)T Cell Therapy for Treatment of Patients With Newly Diagnosed Glioblastoma - Tabular View - *ClinicalTrials.gov* [Internet]. [cité 1 oct 2021]. Disponible sur: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/record/NCT04165941>
163. Campoli M, Ferrone S. HLA antigen changes in malignant cells: epigenetic mechanisms and biologic significance. *Oncogene*. 6 oct 2008;27(45):5869-85.
164. Xu Y, Xiang Z, Alnaggar M, Kouakanou L, Li J, He J, et al. Allogeneic V γ 9V δ 2 T-cell immunotherapy exhibits promising clinical safety and prolongs the survival of patients with late-stage lung or liver cancer. *Cell Mol Immunol*. févr 2021;18(2):427-39.

165. Graham C, Jozwik A, Pepper A, Benjamin R. Allogeneic CAR-T Cells: More than Ease of Access? Cells. 1 oct 2018;7(10):155.
166. Sureshbabu SK, Chaukar D, Chiplunkar SV. Hypoxia regulates the differentiation and anti-tumor effector functions of $\gamma\delta$ T cells in oral cancer. Clin Exp Immunol. juill 2020;201(1):40-57.
167. Hoeres T, Holzmann E, Smetak M, Birkmann J, Wilhelm M. PD-1 signaling modulates interferon- γ production by Gamma Delta ($\gamma\delta$) T-Cells in response to leukemia. Oncoimmunology. 2019;8(3):1550618.
168. Li X, Lu H, Gu Y, Zhang X, Zhang G, Shi T, et al. Tim-3 suppresses the killing effect of V γ 9V δ 2 T cells on colon cancer cells by reducing perforin and granzyme B expression. Experimental Cell Research. 1 janv 2020;386(1):111719.
169. Choi BD, Yu X, Castano AP, Darr H, Henderson DB, Bouffard AA, et al. CRISPR-Cas9 disruption of PD-1 enhances activity of universal EGFRvIII CAR T cells in a preclinical model of human glioblastoma. J Immunother Cancer. 14 nov 2019;7:304.
170. Capsomidis A, Benthall G, Van Acker HH, Fisher J, Kramer AM, Abeln Z, et al. Chimeric Antigen Receptor-Engineered Human Gamma Delta T Cells: Enhanced Cytotoxicity with Retention of Cross Presentation. Mol Ther. 7 févr 2018;26(2):354-65.
171. Adicet Bio, Inc. A Phase 1 Safety and Efficacy Study of ADI-001 Anti-CD20 CAR-engineered Allogeneic Gamma Delta T Cells in Adults With B Cell Malignancies, in Monotherapy and Combination With IL 2 [Internet]. clinicaltrials.gov; 2021 août [cité 26 sept 2021]. Report No.: NCT04735471. Disponible sur: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04735471>
172. PersonGen BioTherapeutics (Suzhou) Co., Ltd. Clinical Application of Chimeric Antigen Receptor Modified $\gamma\delta$ T Cells (CAR - $\gamma\delta$ T Cells) in Relapsed and Refractory CD7 Positive T Cell-derived Malignant Tumors [Internet]. clinicaltrials.gov; 2021 mars [cité 26 sept 2021]. Report No.: NCT04702841. Disponible sur: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04702841>
173. CytoMed Therapeutics Pte Ltd. A Phase I Dose-escalation Trial to Evaluate Haploidentical / Allogeneic Natural Killer Group 2D Ligand (NKG2DL)-Targeting Chimeric Antigen Receptor-grafted Gamma Delta ($\gamma\delta$) T Cells (CTM-N2D) in Subjects With Relapsed or Refractory Solid Tumour [Internet]. clinicaltrials.gov; 2019 sept [cité 26 sept 2021]. Report No.: study/NCT04107142. Disponible sur: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT04107142>
174. Cerato E, Birkle S, Portoukalian J, Mezazigh A, Chatal JF, Aubry J. Variable region gene segments of nine monoclonal antibodies specific to disialogangliosides (GD2, GD3) and their O-acetylated derivatives. Hybridoma. août 1997;16(4):307-16.
175. Palakodeti A, Sandstrom A, Sundaresan L, Harly C, Nedellec S, Olive D, et al. The molecular basis for modulation of human V γ 9V δ 2 T cell responses by CD277/butyrophilin-3 (BTN3A)-specific antibodies. J Biol Chem. 21 sept 2012;287(39):32780-90.
176. Cavdarli S, Yamakawa N, Clarisse C, Aoki K, Brysbaert G, Le Doussal JM, et al. Profiling of O-acetylated Gangliosides Expressed in Neuroectoderm Derived Cells. Int J Mol Sci. 6 janv 2020;21(1):E370.
177. SFI 2021 - Program Wednesday 8 December [Internet]. [cité 17 janv 2022]. Disponible sur: <https://www.alphavisa.com/sfi/2021/program2.php>

178. Mount CW, Majzner RG, Sundaresh S, Arnold EP, Kadapakkam M, Haile S, et al. Potent antitumor efficacy of anti-GD2 CAR T-cells in H3K27M+ diffuse midline gliomas. *Nat Med.* mai 2018;24(5):572-9.
179. Koka V, Potti A, Forseen SE, Pervez H, Fraiman GN, Koch M, et al. Role of Her-2/neu overexpression and clinical determinants of early mortality in glioblastoma multiforme. *Am J Clin Oncol.* août 2003;26(4):332-5.
180. Martinez M, Moon EK. CAR T Cells for Solid Tumors: New Strategies for Finding, Infiltrating, and Surviving in the Tumor Microenvironment. *Front Immunol.* 2019;10:128.
181. Wang D, Prager BC, Gimple RC, Aguilar B, Alizadeh D, Tang H, et al. CRISPR Screening of CAR T Cells and Cancer Stem Cells Reveals Critical Dependencies for Cell-Based Therapies. *Cancer Discov.* 1 mai 2021;11(5):1192-211.
182. Harlin H, Meng Y, Peterson AC, Zha Y, Tretiakova M, Slingluff C, et al. Chemokine expression in melanoma metastases associated with CD8+ T-cell recruitment. *Cancer Res.* 1 avr 2009;69(7):3077-85.
183. Ashmore-Harris C, Iafrate M, Saleem A, Fruhwirth GO. Non-invasive Reporter Gene Imaging of Cell Therapies, including T Cells and Stem Cells. *Mol Ther.* 3 juin 2020;28(6):1392-416.
184. Chitadze G, Lettau M, Luecke S, Wang T, Janssen O, Fürst D, et al. NKG2D- and T-cell receptor-dependent lysis of malignant glioma cell lines by human $\gamma\delta$ T cells: Modulation by temozolomide and A disintegrin and metalloproteases 10 and 17 inhibitors. *Oncoimmunology.* avr 2016;5(4):e1093276.

L'ISPB - Faculté de Pharmacie de Lyon et l'Université Claude Bernard Lyon 1 n'entendent donner aucune approbation ni improbation aux opinions émises dans les thèses ; ces opinions sont considérées comme propres à leurs auteurs.

L'ISPB - Faculté de Pharmacie de Lyon est engagé dans une démarche de lutte contre le plagiat. De ce fait, une sensibilisation des étudiants et encadrants des thèses a été réalisée avec notamment l'incitation à l'utilisation d'une méthode de recherche de similitudes.

PARIS Pierre

**Ciblage Immunothérapeutique des cellules de Glioblastome par des Lymphocytes T
Vgamma9Vdelta2 CAR-OAcGD2**

Th. D. Pharm., Lyon 1, 2023, 95 p.

RESUME

Le glioblastome (GBM) est la tumeur cérébrale primaire la plus fréquente et la plus agressive chez l'adulte. Malgré les traitements actuels très agressifs, moins de 5% des patients survivent plus de 5 ans. Parmi les nouvelles pistes thérapeutiques, l'immunothérapie tient une place prépondérante. En effet, dans des études précliniques, il a été démontré qu'une thérapie cellulaire adoptive utilisant des lymphocytes T Vγ9Vδ2 est efficace contre les cellules de GBM de sous-type Mesenchymal (MES). D'autre part, il a été observé que les autres sous-types, à savoir Classique et Proneural (CPN), expriment davantage le GD2 O-acétylé (OAcGD2), un ganglioside non présent à la surface des cellules nerveuses normales mais que l'on retrouve dans certains cancers comme le GBM. Le but de ce travail était d'évaluer si la transduction des lymphocytes T (LT) Vγ9Vδ2 avec un Récepteur Chimérique à l'Antigène (CAR) permettant une reconnaissance directe du OAcGD2 permettait d'étendre la reconnaissance et l'élimination des cellules de GBM au sous-type CPN, tout en conservant leur activité spontanée envers les cellules MES. Dans ce but, nous avons utilisé des LT Vγ9Vδ2 CAR-OAcGD2 et évalué leur activation face à des cultures primaires de GBM. Dans un 1^{er} temps, l'expression du OAcGD2 a été analysée dans les cellules tumorales par cytométrie en flux. Puis, leur capacité à activer les LT Vγ9Vδ2 a été mesurée en analysant l'expression du CD107a par les LT par cytométrie de flux. Nous avons ainsi montré que les LT Vγ9Vδ2 CAR-OAcGD2 étaient activés par toutes les cellules tumorales, indépendamment de leur sous-type moléculaire et de l'expression d'OAcGD2. Aucune activation n'a été observée dans les LT Vγ9Vδ2 non transduits ou transduits avec un CAR non fonctionnel. Le blocage des voies d'activation impliquée dans l'immunoréactivité spontanée des LT Vγ9Vδ2 n'altère pas l'activation des LT Vγ9Vδ2 CAR-OAcGD2. L'inactivation d'une enzyme permettant la production du GD2 O-acétylé dans des cellules exprimant le OAcGD2 permet quant à elle de bloquer cette reconnaissance médiée par le CAR. L'ensemble de ces résultats suggèrent que les LT Vγ9Vδ2 CAR-OAcGD2 apparaissent comme des outils efficaces pour éliminer les cellules de GBM et que cette stratégie mérite d'être explorée davantage dans le cadre d'une immunothérapie des GBM.

MOTS CLES

GD2 O-acétylé, Glioblastome, lymphocytes T Vγ9Vδ2, CAR

JURY

M. VIEL Sébastien

Mme PECQUEUR Claire

Mme MOYRET-LALLE Caroline

M. MEURETTE Olivier

DATE DE SOUTENANCE

Vendredi 03 Mars 2023

CONTACT

Mail du tuteur pédagogique : caroline.moyret-lalle@univ-lyon1.fr