

Université de Montréal

**Nouvelle approche immunothérapeutique afin de traiter le
neuroblastome réfractaire chez l'enfant**

par Martine Cordeau

Département de Microbiologie et Immunologie, Université de Montréal
Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des Études Supérieures
en vue de l'obtention du grade de Magister Scientiæ (M.Sc)
option Microbiologie et Immunologie

Octobre, 2014

© Martine Cordeau, 2014

Université de Montréal
Faculté des Études Supérieures

Ce mémoire intitulé :

**Nouvelle approche immunothérapeutique afin de traiter le neuroblastome
réfractaire chez l'enfant**

Présenté par

Martine Cordeau

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Président rapporteur : Valérie Abadie

Membre du jury : Martin Guimond

Codirecteur : Sabine Herblot

Directeur de recherche : Dr. Michel Duval

Résumé

Malgré plusieurs chimiothérapies suivies d'une transplantation et d'une immunothérapie, 40% des patients avec un neuroblastome (NB) à haut risque subissent une progression de la maladie ou une rechute. L'échec de ces traitements est attribué à la présence de cellules initiatrices de tumeur (TIC) qui expriment le marqueur CD133 et qui sont souvent résistantes aux agents chimiothérapeutiques. Les cellules Natural Killer (NK), qui possèdent un effet anti-tumoral, peuvent être utilisées dans le cadre du développement de nouvelles approches immunothérapeutiques. Nous posons l'hypothèse que les cellules NK activées éliminent efficacement les TIC et contribuent à la réduction des risques de rechute. De plus, il est possible d'augmenter l'effet anti-tumoral des cellules NK contre le NB. L'activité cytotoxique des cellules NK est augmentée par des cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC) activées. A la suite de la stimulation de leurs récepteurs Toll-like les pDC produisent de grandes quantités d'interféron-alpha (IFN- α). Nous avons étudié les propriétés lytiques des cellules NK contre des lignées cellulaires de NB à la suite de leur activation par l'IFN- α ou des pDC activées. Nos résultats révèlent une augmentation de l'activité cytolitique des cellules NK contre ces lignées en réponse à une stimulation par les pDC activées. De plus, les cellules de NB CD133⁺ ou celles résistantes à l'immunothérapie dirigée contre le glycolipide disialoganglioside (GD2) sont sensibles à la lyse médiée par les cellules NK stimulées par les pDC. Nous avons examiné les mécanismes cellulaires impliqués dans la lyse des cellules de NB. Nous montrons que cette cytotoxicité est médiée en partie par TRAIL induisant l'apoptose et en partie par la libération des granules cytotoxiques. Ainsi, ces résultats permettent de proposer une nouvelle approche immuno-thérapeutique complémentaire au traitement par l'anticorps anti-GD2 pour les patients atteints de NB à haut risque.

Mots-clés : neuroblastome, immunothérapie, cellule Natural Killer, cellule dendritique plasmacytoïde, cellule initiatrice de tumeur, TRAIL, dégranulation

Abstract

Despite aggressive treatment by chemotherapy followed by transplantation and treatment with anti-tumor cell disialoganglioside (GD2) monoclonal antibody, IL-2, GM-CSF and retinoic acid, 40% of patients with high-risk neuroblastoma (NB) still undergo disease progression or relapse. Furthermore, tumor-initiating cells (TIC) expressing the CD133 marker are present in NB tumors and are more resistant to chemotherapy. To evaluate a new immunotherapeutic approach, we took advantage of the anti-tumor effect of Natural Killer (NK) cells. We hypothesized that activated NK cells would be a potent therapeutic strategy to eliminate TIC and reduce relapse of NB. We aimed to establish the best strategy to increase the NK cell mediated cytotoxicity against NB. NK cell cytotoxic activity is increased by cytokines, chemokines and activated plasmacytoid dendritic cells (pDC) which produce high amounts of interferon-alpha (IFN- α) upon Toll-like receptor stimulation. We investigated NK-cell lytic properties against NB cell lines following activation by IFN- α or activated pDC. Our results reveal that NB cells, including TIC (CD133⁺ cells) and GD2-negative cells, are highly sensitive to NK cell mediated cytotoxicity following stimulation by activated pDC. We also examined the cellular mechanisms involved in NK cell-mediated lysis of NB cell lines. The increased cytotoxicity is partially mediated by TRAIL induced apoptosis and as well as by the release of cytolytic granules. In conclusion, we propose a new immunotherapeutic approach that can be used in combination with the anti-GD2 therapy for the treatment of high-risk NB patients.

Keywords : neuroblastoma, immunotherapy, Natural Killer cell, plasmacytoid dendritic cell, tumor-initiating cell, GD2, TRAIL, degranulation

Table des matières

| | |
|--|-------------|
| Résumé | i |
| Abstract | ii |
| Table des matières | iii |
| Liste des tableaux | vi |
| Liste des figures | viii |
| Abréviations | x |
| Dédicace | xv |
| Remerciements | xvi |
| | |
| INTRODUCTION | 1 |
| Chapitre 1 : Le neuroblastome | 2 |
| 1.1 Historique du neuroblastome | 2 |
| 1.2 Origine du neuroblastome - Cellules de la crête neurales | 2 |
| 1.3 Histopathologie | 4 |
| 1.4 Épidémiologie..... | 6 |
| 1.5 Étiologie..... | 6 |
| 1.6 Dépistage | 7 |
| 1.7 Classification du neuroblastome | 7 |
| 1.8 Les traitements..... | 11 |
| 1.8.1 Acide rétinoïque..... | 12 |
| Chapitre 2 : Les traitements immunothérapeutique pour les neuroblastomes à risque élevé | 13 |
| 2.1 Nouvelles approches immunothérapeutique..... | 13 |
| 2.2 L'anticorps monoclonal anti-disialoganglioside | 13 |
| 2.3 Interleukine-2..... | 15 |
| 2.4 GM-CSF..... | 16 |
| Chapitre 3 : Problématique des neuroblastomes à haut risque | 18 |
| 3.1 Les cellules initiatrices de tumeur | 18 |
| 3.2 Le récepteur CD133 | 19 |
| 3.3 Résistance aux traitements de chimiothérapie..... | 19 |

| | |
|---|-----------|
| Chapitre 4 : La reconstruction du système immunitaire | 21 |
| 4.1 <i>Les différences entre une greffe autologue et allogénique</i> | 21 |
| 4.2 <i>La greffe allogénique dans le traitement du neuroblastome</i> | 22 |
| 4.3 <i>La reconstitution du système immunitaire après une greffe allogénique</i> | 23 |
| Chapitre 5 : Les cellules Natural Killer | 26 |
| 5.1 <i>L'origine des cellules NK.....</i> | 26 |
| 5.2 <i>Le développement des cellules NK</i> | 26 |
| 5.3 <i>Caractérisation fonctionnelle des cellules NK dans le sang périphérique.....</i> | 27 |
| 5.4 <i>Activation ou inhibition des cellules NK - Les trois superfamilles de récepteurs</i> | 29 |
| 5.5 <i>Les voies cytotoxiques.....</i> | 33 |
| 5.5.1 <i>Induction de l'apoptose de la cellule cible via les récepteurs de mort cellulaire.....</i> | 33 |
| 5.5.2 <i>Le relargage des granules cytotoxiques</i> | 34 |
| 5.6 <i>Régulation de la fonction effectrice.....</i> | 35 |
| 5.6.1 <i>Les cytokines régulatrices de la fonction des cellules NK.....</i> | 35 |
| 5.6.2 <i>La régulation des fonctions des cellules NK par les cellules dendritiques</i> | 36 |
| Chapitre 6 : Les cellules dendritiques plasmacytoïdes | 37 |
| 6.1 <i>Caractéristiques phénotypiques des cellules dendritiques plasmacytoïdes.....</i> | 37 |
| 6.2 <i>L'origine des cellules dendritiques plasmacytoïdes.....</i> | 38 |
| 6.3 <i>Les récepteurs activateurs – Récepteur Toll-like</i> | 39 |
| 6.4 <i>Les cellules présentatrices d'antigènes.....</i> | 40 |
| Chapitre 7 : Sensibilité des cellules de neuroblastome face aux cellules NK..... | 42 |
| HYPOTHÈSE ET OBJECTIFS | 44 |
| MATÉRIEL ET MÉTHODE | 46 |
| RÉSULTATS | 48 |
| ARTICLE..... | 50 |
| Abstract | 52 |
| Introduction | 53 |
| Materials and methods..... | 55 |
| Results..... | 59 |
| Discussion | 68 |
| Conclusion..... | 70 |
| Acknowledgments..... | 71 |
| References | 72 |

| | |
|---------------------------|-----------|
| CONCLUSION..... | 76 |
| BIBLIOGRAPHIE..... | 80 |
| ANNEXE..... | 96 |

Liste des Tableaux

Tableau I – Système de classification-International Neuroblastoma Staging System.

Tableau II – Système de classification préopératoire-International Neuroblastoma Risk Group Staging System.

Tableau III – Les différents récepteurs activateurs exprimés sur les cellules NK et leurs ligands

Tableau IV – Les différents récepteurs inhibiteurs exprimés sur les cellules NK et leurs ligands

Tableau V – Les différents ligands des récepteurs de mort exprimés sur les cellules NK et leur récepteurs

Tableau VI – Molécules produites et sécrétées par les pDC suite à l'exposition à un virus ou à un agent agoniste synthétique

ARTICLE :

Table I – Percentage of surface expression of GD2 and CD133⁺ on three different NB cell lines.

ANNEXE:

Table I - Clinicopathological features of all patients and mean GD2 immunostaining scores

Table II - The GD2 immunostaining score

Table III - GD2 surface expression on SK-N-DZ, SK-N-AS and SJNB7 cells

Liste des Figures

- Figure 1 - Les différentes étapes de la neurulation.
- Figure 2 - Système de classification histologique: International Neuroblastoma Pathology Classification.
- Figure 3 - Localisations et conséquences du neuroblastome.
- Figure 4 - Caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles des deux sous-populations de cellules NK.

ARTICLE :

- Figure 1- NK cell-mediated lysis of NB cell lines following activation with TLR9-stimulated pDC.
- Figure 2- TLR9-stimulated pDC induce CD69 and TRAIL expression on NK cells, as well as IFN- γ production.
- Figure 3- NK cells stimulated with TLR9-activated pDC release cytotoxic granules against NB target cells.
- Figure 4- Multiple lytic pathways are involved in NB cell lysis by activated NK cells.
- Supplement Figure S1- NK cells co-cultured with TLR-9-activated pDC up-regulated TRAIL and CD69.

Supplement Figure S2- TLR-9-activated pDC do not induce the up-regulation of natural cytotoxicity receptors, NKGD2, Granzyme B or Perforine on NK cell.

Supplement Figure S3- Contact between NK cell and pDC induced stronger CD69 and TRAIL up-regulation on activated NK cell.

ANNEXE:

Figure 1 - GD2 is specifically expressed in neuroblasts.

Figure 2 - Differential expression of GD2 in relapsing versus non-relapsing patients receiving anti-GD2 immunotherapy.

Figure 3 - The efficacy of NK cell-mediated ADCC directly depends on the percentage of GD2 positive cells of NB tumors.

Abréviations

A

| | |
|--------|--|
| ABC : | ATP-binding cassette |
| ABS : | Absolu |
| ADCC : | Cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps |
| ADN : | Acide désoxyribonucléique |
| AKT : | Protéine kinase B/AKT |
| AML : | Leucémie myéloïde aigue |
| APC : | Allophycocyanine |
| ARN : | Acide ribonucléique |
| ARNm : | Acide ribonucléique messenger |
| ATP : | Adénosine triphosphate |

B

| | |
|---------|--|
| BDCA- : | Antigène des cellules dendritiques du sang |
| BMP : | Protéine inductrice de l'os |
| BSA : | Albumine de sérum bovin |

C

| | |
|---------|---|
| Ca : | Calcium |
| c-à-d : | C'est-à-dire |
| CBMC : | Cellules mononuclées du sang de cordon |
| CCL- : | Ligand de chemokine |
| CD : | Classe (syn. : marqueur) de différenciation |
| CDC : | Cytotoxicité dépendante du complément |
| CFSE : | Carboxyfluorescéine diacétique ester succinimidylique |
| CIRBP : | Cold-inducing mRNA binding protein |
| Cis: | Isotretinoin |
| CMH : | Complexe majeur d'histocompatibilité |

| | |
|---------|--|
| CPA : | Cellule présentatrice d'antigène |
| CpG : | Motif cytosine-guanine d'ADN bactérien |
| CSC : | Cellule souche cancéreuse |
| CSH : | Cellule souche hématopoïétique |
| CTL : | Contrôle |
| CXCL- : | Chemokine à motif C-X-C |

D

| | |
|-------|----------------------------------|
| D : | Domaine |
| DC : | Cellule dendritique |
| DMEM: | Dubelcco's Modified Eagle Medium |
| DR : | Sous-classe D du CMH de classe I |

E

| | |
|--------|---|
| EDTA : | Acide éthylène diamine tétraacétique |
| E :T : | Ratio de cellules effectrices sur cellules cibles |
| EFS : | Taux de survie sans complication |

F

| | |
|----------|--|
| Fab : | Région variable d'un anticorps |
| FADD : | Protéine associé aux domaines de mort du FAS |
| FAS : | Fragment inducteur d'apoptose |
| FASL : | Ligand du fragment inducteur d'apoptose |
| FBS : | Sérum bovin fœtal |
| Fc : | Région constante d'un anticorps |
| F.D.A. : | Food and drug administration |
| FGF : | Facteur de croissance des fibroblastes |
| FH : | Histologie favorable |
| FITC : | Isothiocyanate de fluorescéine |
| FLT3 : | FMS-related tyrosine kinase 3 |

G

| | |
|----------|---|
| GD2 : | Disialoganglioside-2 |
| GM-CSF : | Facteur de stimulation des colonies de granulocytes-macrophages |
| GvHD : | Maladie du greffon contre l'hôte |
| GvT : | Greffon contre la tumeur |

H

| | |
|--------|--|
| HLA : | Antigène des leucocytes humains |
| HSCT : | Transplantation de cellules souches hématopoïétiques |

I

| | |
|----------|--|
| IFN : | Interféron |
| Ig : | Immunoglobuline |
| IL : | Interleukine |
| INRG: | International Neuroblastoma Risk Group |
| INRGSS : | International Neuroblastoma Risk Group Staging System |
| INSS : | International Neuroblastoma Staging System |
| IRF- : | Interferon-regulatory transcription factor |
| ITAM : | Motifs activateurs des immunorécepteurs associés à la tyrosine |
| ITIM : | Motifs inhibiteurs des immunorecepteurs associés à la tyrosine |

K

| | |
|-------|------------------------------|
| kDa : | Kilodalton |
| KIR : | Killer cell Ig-like receptor |

L

| | |
|-------|--|
| L : | Longue chaîne cytoplasmique |
| LFA- | Lymphocyte function-associated antigen |
| LRR : | Répétition riche en leucine |

M

| | |
|------------|---|
| mAb : | Anticorps monoclonal |
| MCP- : | Monocyte chemoattractant protein (Protéine chimioattractif des monocytes) |
| mDC : | Cellules dendritiques myéloïdes |
| MKI : | Index mitotique et caryorrhexis |
| microRNA : | Petit ARN non-codant |
| MIP- : | Macrophage inflammatory protein (Protéine inflammatoire des macrophages) |
| MYCN : | Gène MYCN |

N

| | |
|---------|---|
| NB : | Neuroblastome |
| N-CAM : | Molécule d'adhésion des cellules neurales |
| NCR : | Récepteurs naturels de cytotoxicité |
| NLR : | NOD-like receptor |
| NK : | Natural Killer |
| NS : | Non-stimulé |

O

| | |
|-------|----------------------|
| ODN : | Oligodéoxynucléotide |
|-------|----------------------|

P

| | |
|----------|---|
| PAMP : | Motifs moléculaires associés aux pathogènes |
| PBMC : | Cellules mononucléées du sang périphérique |
| PBS : | Tampon phosphate salin |
| pDC : | Cellules dendritiques plasmacytoïdes |
| PE : | Phycoérythrine |
| PE/CY7 : | Phycoérythrine/cyanine-7 |
| PI : | Iodure de propidium |

R

RANTES: Regulated on activation, normal T cell expressed and secreted
RIG-: Retinoic acid-inducible gene
RPMI : Milieu Roswell Park Memorial Institute

S

S : Chaîne courte cytoplasmique
SD : Déviation standard
SEM : Erreur standard de la moyenne

T

TGF : Facteur de croissance transformant
TIC : Cellule initiateur de tumeur
TLR : Récepteur de type Toll
TNF : Tumor necrosis factor (Facteur de nécrose tumorale)
TRAIL : Tumor-necrosis-factor related apoptosis inducing ligand
(Ligand induisant l'apoptose apparenté au facteur de nécrose tumorale)

U

UF : Histologie défavorable

W

Wnt : Protéine Wnt

Je dédie ce mémoire

À ma famille, spécialement à mes parents,

À mes ami(e)s,

Et à tous ceux qui m'ont transmis savoir et passion...

Remerciements

La réalisation de cette maîtrise n'aurait jamais été possible sans l'appui de plusieurs personnes. Ces collègues et ami(e)s ont fait en sorte que ces deux années soient une expérience de vie inoubliable!

Tout d'abord, je voudrais remercier mon directeur de recherche, le Dr. Michel Duval pour m'avoir admis dans son laboratoire. Michel, ce devoir de la recherche d'être au service des patients a fait en sorte que je tenais à poursuivre mon cheminement académique dans ton laboratoire. Le fait d'utiliser ce qui est naturellement présent dans le corps humain afin d'éliminer les cellules cancéreuses a toujours été ce en quoi je croyais.

Sabine, tu as été mon mentor aux cours de ces dernières années. Tu es celle qui m'a donné tous les outils nécessaires afin de me réaliser dans le monde scientifique; analyser et développer mon sens critique. En me laissant prendre mes propres décisions, tu m'as permis de devenir autonome. Pour toutes les idées que j'apportais à mon projet, tu étais celle qui m'encourageais et qui m'orientais. J'apprécie beaucoup que Michel et toi m'avez permis de travailler sur le projet d'Émilie, présenter mes recherches à l'international et de publier mon étude sur le système immunitaire des femmes enceintes. Merci de m'avoir fait confiance et de m'avoir donné cette opportunité!

Paulo, tu es celui qui m'a appris tout ce que je sais sur les techniques de laboratoire et sur le fonctionnement des différents appareils du Centre de recherche. Lorsque j'avais des questions par rapport aux protocoles ou aux instruments, tu as toujours pris le temps nécessaire pour bien m'expliquer chacune des étapes. Tes commentaires sont constructifs et ton sens critique ne fait qu'améliorer la qualité des présentations.

Martin, notre sujet de maîtrise a été décidé suite à un tirage dans une simple boîte d'embouts vide! À la suite de ces deux belles années, je tiens à te remercier. Lorsque je terminais mes expériences pour répondre aux demandes des "reviewers", tu passais des heures à mettre au point la technique de cytotoxicité. Tu étais présent pour me donner un coup de main lorsque j'avais des difficultés aux FACS ou que j'étais coincée entre deux expériences. Alors Martin un énorme merci!

Je veux également remercier les infirmières de recherche pour avoir prélevé tous les donneurs de sang, soit Yves-Line Delva, Caroline Tra, Catherine Desjean, Christine de Castelbajac et Marie St-Jacques ce qui m'a valu le surnom affectif de *Petite vampire*.

Finalement je voudrais souligner l'assistance du département de microbiologie et immunologie de la Faculté de médecine de l'Université de Montréal pour la bourse départementale qui m'a été octroyée. Ainsi que la bourse de maîtrise de la Fondation du CHU Sainte-Justine et la Fondation de Étoiles.

À vous tous, je vous dois un énorme Merci!

Ce fut un plaisir de travailler avec vous!

« La persévérance – Secret de tous les triomphes. »

-Victor Hugo

INTRODUCTION

Chapitre 1 : Le neuroblastome

1.1 Historique du neuroblastome

Le neuroblastome a été décrit pour la première fois en 1864 par le professeur d'anatomie Rudolf Ludwig Karl Virchow qui lui attribua le terme de gliome. Cette maladie est également connue sous le nom de sarcome suprarrénal ou sarcome congénital. Virchow a associé le gliome et la présence d'un nodule localisé à la médulle de la glande surrénale¹. En 1901, le professeur de médecine William Pepper publia ses observations faites sur de jeunes patients. Ces derniers mourraient suite au développement d'une tumeur au niveau des surrénales et d'une hypertrophie du foie². Ces observations cliniques portent maintenant le nom de syndrome de Pepper. Puis, le physicien Robert Grieve Hutchison rapporta plusieurs cas de sarcome surrénal en 1907. Ces patients âgés de 9 mois à 9 ans présentaient des métastases au niveau du globe oculaire. À la suite d'une autopsie, la présence de tumeur au niveau de la glande surrénale a été établie sur chacun³. Ces manifestations cliniques portent aujourd'hui le nom de syndrome de Hutchison. Ce n'est qu'en 1910 que le terme neuroblastome est employé par le Dr. James Homer Wright dans un article décrivant une série de cas de tumeur localisée à la surrénale et/ou au foie qu'il caractérisa par microscopie⁴.

1.2 Origine du neuroblastome – Cellules de la crête neurale

Lors de la quatrième semaine du développement embryonnaire, la formation du système nerveux est enclenchée. Cette étape porte le nom de neurulation et permet de transformer l'ectoderme (la plaque neurale) en tube neural. Durant la neurulation (Figure 1)⁵, la plaque neurale s'enfonce et, à la suite du repliement, forme la gouttière neurale. Les parois se rapprochent et se fusionnent pour créer le tube neural. C'est à cette jonction, que sont retrouvées les cellules de la future crête neurale. Le tube neural se dissocie ensuite de l'ectoderme et des cellules de la crête neurale^{6,7}. Cette disjonction inhibe la cohésion des cellules de la crête neurale par la perte d'expression des molécules d'adhésion présentes dans le tube neural, soit N-CAM (Molécule d'adhésion des cellules neurales) et les cadhérines^{8,9}.

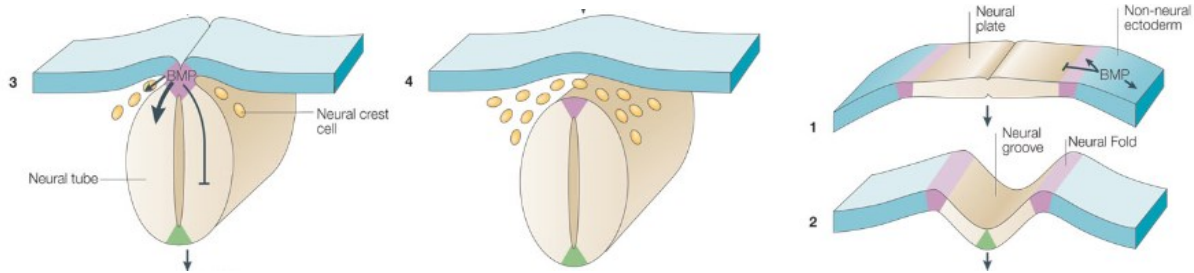


Figure 1 – Les différentes étapes de la neurulation.

Au cours de la quatrième semaine de gestation, le système nerveux de l’embryon se développe. 1) À partir de l’ectoderme, le tube neural se forme lors de la constriction de la plaque neurale. 2) Cette dernière se replie afin de créer la gouttière neurale. 3) Les cellules présentes à la jonction permettent la création de la crête neurale. 4) À cette étape, le tube neural et les cellules de la crête neurale se dissocient de l’ectoderme. *Adapté de Liu, A. & Niswander, 2005*⁵.

Les cellules de la crête neurale migrent grâce à la présence des molécules BMP (Bone morphogenetic proteins), FGF (Fibroblast growth factors) et Wnt (Wnt proteins)^{5,10-15}, des molécules de la famille du TGF- β (Facteur de croissance transformant). L’acide rétinoïque semble également jouer un rôle^{16,17}. La fin de la migration est liée à la réexpression des cadhérines et du N-CAM⁸.

La crête neurale est à l’origine de quatre grandes fonctions cellulaires en fonction du lieu de migration et de la localisation des cellules dans le système. On y retrouve 1) les neurones et les cellules gliales du système nerveux sensitif, sympathique et parasympathique, 2) les cellules de la glande surrénale, 3) les cellules pigmentaires, ainsi que 4) les tissus conjonctifs, le cartilage facial et plusieurs composantes du squelette¹⁸. Le destin des cellules de la crête neurale dépend de leur niveau de différenciation. Des cellules indifférenciées ou matures, telles que les neuroblastes et les cellules de Schwann sont aussi retrouvées.

Les facteurs liés au développement du neuroblastome demeurent inconnus. Cependant, il est établi que cette tumeur se développe au dépend du système nerveux sympathique et que les précurseurs de la maladie dérivent des cellules de la crête neurale.

1.3 Histopathologie

La présence des neuroblastes et des cellules de Schwann est essentielle au développement des tumeurs neuroblastiques, incluant le neuroblastome, le ganglioneuroblastome et le ganglioneurome^{19,20}. Les neuroblastes dont les précurseurs proviennent de la crête neurale sont des cellules pluripotentes et forment plusieurs composantes du système nerveux sympathique. Elles peuvent se différencier et former des cellules ganglionnaires ou demeurer immatures. Les cellules de Schwann sont des cellules gliales qui entourent les cellules neuronales et ont pour fonction d'assurer le développement des neuroblastes et des neurones. L'équilibre entre ces deux types cellulaires est fragile.

Un système de classification élaboré par Shimada en 1999¹⁹, puis révisé en 2003²¹, a permis de classer les tumeurs neuroblastiques en fonction de trois critères (Figure 2)²² : 1) le stade de différenciation des neuroblastes, 2) la quantité de cellules nourricières formées par les cellules de Schwann (Stroma Schwannien) et 3) l'index mitotique et caryorrhexis (MKI). Le pronostic est divisé en deux sous-groupes histologiques (favorable ou défavorable) et corrèle aux chances de survie du patient. L'âge au diagnostic joue également un rôle important dans la probabilité de survie^{23,24}.

En fonction de ce système de classification, le neuroblastome est une tumeur composée de moins de 50% de stroma Schwannien. Les neuroblastomes sont classés en trois catégories, définies en fonction de leur degré de différenciation : indifférencié, faiblement différencié (c.-à-d., moins de 5% des cellules tumorales sont des cellules ganglionnaires) et différencié (c.-à-d., au moins 5% des cellules tumorales sont de types ganglionnaires). Le neuroblastome indifférencié est toujours de mauvais pronostic¹⁹.

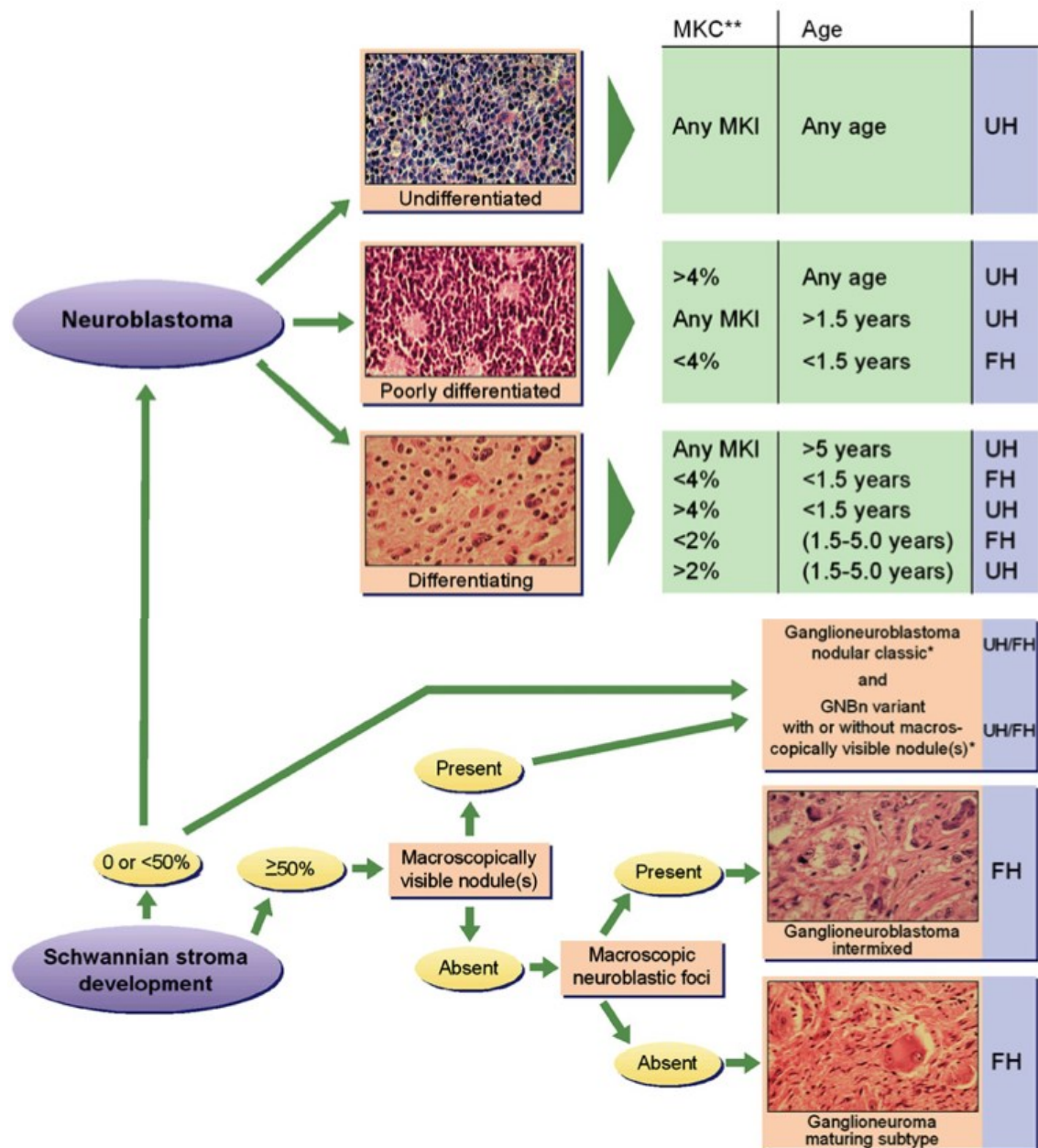


Figure 2 – Système de classification : International Neuroblastoma Pathology Classification.

Lorsque la quantité de cellules nourricières du nom de stroma Schwannien est inférieure à 50%, le diagnostic posé est un neuroblastome. Ce dernier peut être non différencié, faiblement différencié ou différencié ce qui, en fonction de l'âge du patient et de l'index mitotique et caryorrhexis (MKI) peut être considéré comme un diagnostic histologique favorable (FH) ou défavorable (UH). Le ganglioneuroblastome est diagnostiqué lorsque le développement du stroma Schwannien est supérieur à 50%. *Adapté Park et al. 2010²²*

1.4 Épidémiologie

Le neuroblastome constitue la tumeur solide extra-crânienne la plus commune chez les enfants et représente 7 à 10% de toutes les tumeurs infantiles^{22,25}. Cette maladie est généralement diagnostiquée avant l'âge de 18 mois²⁶. Une étude réalisée dans 50 pays durant la décennie 70 par le Centre International de Recherche sur le Cancer a permis d'observer une prédominance de la maladie dans la population caucasienne blanche²⁵. Aucune variation n'a été observée entre l'Amérique du Nord, l'Europe et l'Océanie. L'incidence de la maladie diminue avec le vieillissement de l'enfant atteignant une moyenne de 7 à 12 cas par millions tout âge confondu. Au cours de la première année de vie²⁷, le neuroblastome représentant 25 à 50 cas par million. Toutefois, une prédominance des diagnostics se fait entre l'âge de 1 et 4 ans totalisant 50% des diagnostics, soit près de 15-20 cas par million. Plus la maladie se déclare tardivement dans la vie de l'enfant, plus les symptômes cliniques diminuent. Les catégories d'âge de 5 à 9 ans et 10 à 14 ans représentent 20% de toutes les détections avec respectivement 2-4 cas et 1-1.5 cas par million. Aucune différence n'est significativement observée entre les blancs et les noirs²², cependant, l'incidence est légèrement plus importante chez les garçons comparativement aux filles avec un ratio de 1.2 :1²⁵.

1.5 Étiologie

Il existe plusieurs hypothèses concernant les causes du neuroblastome. Le développement du neuroblastome serait associé à divers facteurs environnementaux tels que l'exposition du père aux champs électromagnétiques^{28,29}, la consommation d'alcool au cours du développement du fœtus par la mère³⁰⁻³², ainsi que toute exposition à la fumée de cigarette^{30,31,33}. La profession qu'exercent les deux parents a également été analysée. Certains métiers, comme agriculteur, accentuent le contact avec des agents potentiellement carcinogènes, tels que les pesticides, les insecticides ou les fongicides³³. La prise de médicaments durant la grossesse fut aussi proposée^{30,31}. Cependant, aucune étude n'a pu confirmer de façon significative ces hypothèses.

Le neuroblastome peut être diagnostiqué chez un patient atteint d'un syndrome, d'une tumeur ou d'une malformation impliquant les cellules de la crête neurale (c.-à-d. neurocristopathies)^{22,34}. Des facteurs prédisposants, tels la maladie de Hirschsprung et le

neurofibromatose de type I ont été décrits. Il semble que leur association au neuroblastome ne soit qu'anecdotique³⁵⁻³⁷.

1.6 Dépistage

Une des caractéristiques du neuroblastome est la surproduction de catécholamine³⁸⁻⁴⁰. Les molécules comme l'adrénaline, la dopamine et la noradrénaline jouent un rôle de neurotransmetteur à la fois dans le système nerveux central et périphérique. Elles sont sécrétées par la glande médullo-surrénale et ces composantes sont excrétées dans l'urine. Dans les années 70, un test de dépistage fût élaboré par les japonais. Ce dernier mesurait quantitativement dans les urines, les métabolites des catécholamines (c.-à-d., acide vanillylmandélique, acide homovanilique), ce qui a eu pour effet d'augmenter la détection de la maladie à plus de 20 cas par million⁴¹. Deux études sur le dépistage du neuroblastome, réalisées chez les bambins âgés de 3 semaines à 6 mois et chez les enfants de 1 an, ne sont pas parvenues à démontrer une réduction du taux de mortalité grâce au test de dépistage^{42, 43}. Les types de neuroblastome détectés étaient en majorité ceux démontrant des caractéristiques biologiques favorables à la survie des patients. Ce test de dépistage n'apporte donc aucune diminution de l'incidence des neuroblastomes à haut risque ni une augmentation du taux de survie⁴²⁻⁴⁴. Il a donc été abandonné comme test de dépistage.

1.7 Classification du neuroblastome

Le neuroblastome est un cancer solide extra-crânien originaire des cellules nerveuses immatures (neuroblastes); ces cellules forment le système nerveux sympathique. Le neuroblastome est retrouvé le long de la colonne vertébrale, dans la région de la glande médullosurrénale et dans les ganglions. Tel qu'illustrée à la figure 3⁴⁵, la tumeur peut s'infiltrer dans la région intraforaminale et provoquer la paralysie chez le patient causée par la compression de la colonne⁴⁶. Le neuroblastome peut également se loger dans le cou (5% des cas) et au haut de la poitrine (20% des cas) causant ainsi le syndrome de Horner⁴⁷. Dans près de 65% des diagnostics, les tumeurs sont retrouvées dans l'abdomen. Dans la moitié des cas des tumeurs abdominales, elles sont localisées à la médulla de la glande surrénale^{22,48}. Dans

plus de 50% des cas, les métastases infiltrent la moelle osseuse, le foie, les os et la peau^{47,49}. Lorsque la maladie forme des métastases au niveau de la peau, le patient développe des nodules sous-cutanés de couleur bleue laissant des traces semblables à des hématomes. Cette manifestation clinique se nomme le syndrome du *blueberry muffin*^{22,48}. Dans seulement 1% des cas, aucune tumeur primaire n'est détectée.

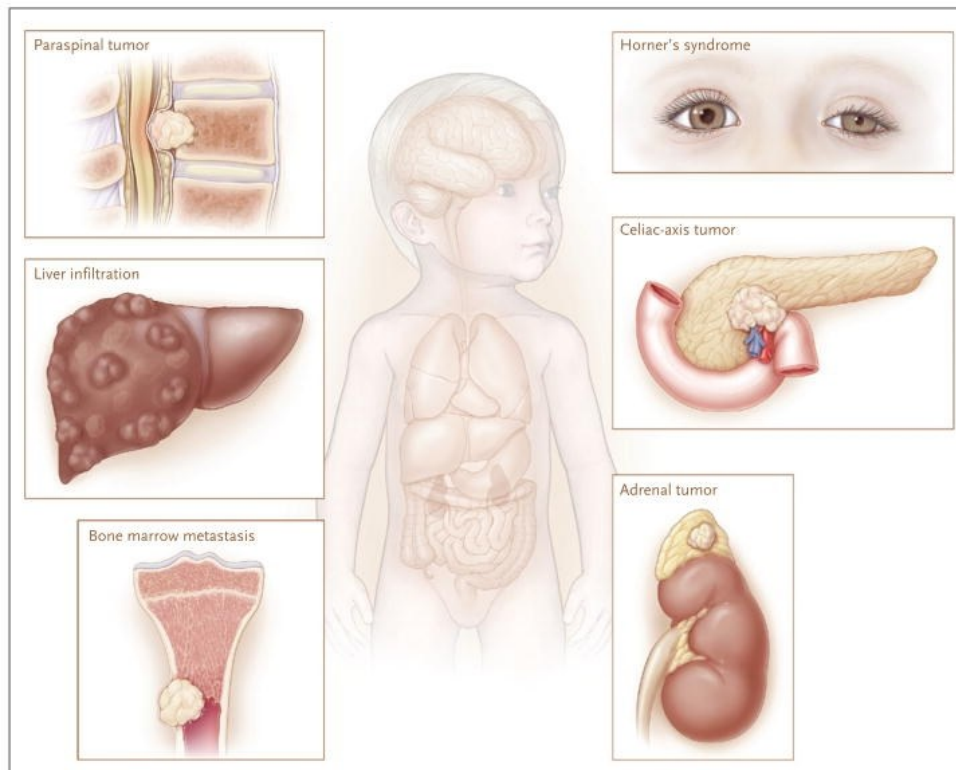


Figure 3 – Localisation et conséquences du neuroblastome

En s'infiltrant dans la région intraforaminale, la tumeur cause une compression de la colonne pouvant conduire à la paralysie. Le NB peut se loger dans le cou et en haut de la poitrine, affectant l'orbite oculaire. Les effets cliniques de ce NB résultent en un syndrome de Horner : une paupière tombante (ptosis), l'incapacité à transpirer (anhydrosis) et la constriction de la pupille (myosis). La tumeur peut se loger près du tronc cœliaque à proximité des vaisseaux et nerfs importants. Le NB est généralement métastatique. Les métastases sont retrouvées au niveau des os, de la peau (non illustré) et peut même infiltrer le foie. *Image et texte adapté de Marris JM, 2010⁴⁵*

Chez plusieurs patients, aucun symptôme n'est apparent alors que d'autres manifestent des symptômes communs dont la fièvre, la perte de poids, la douleur, la détresse respiratoire reliée à la compression ou l'hépatomégalie (c.-à-d., augmentation de la taille du foie)⁴⁸, la dilatation abdominale et/ou la présence d'une masse palpable⁵⁰.

Les critères pour le diagnostic et l'établissement des différents stades du neuroblastome ont été établis en 1988 et révisés en 1993 par l'International Neuroblastoma Staging System (INSS)^{51,52}; six stades ont été établis en fonction de la localisation de la tumeur lors du diagnostic (Tableau I)⁵².

Tableau I- Système de classification - International Neuroblastoma Staging System

| Stade | Description |
|--------------|---|
| 1 | Tumeur localisée, exérèse complète de la tumeur avec ou sans résidus microscopiques de la maladie; Les ganglions lymphatiques ipsilatéraux sont négatifs pour la tumeur au microscope (Les ganglions attachés et enlevés avec la tumeur peuvent être positifs). |
| 2A | Tumeur localisée, exérèse partielle de la tumeur; Les ganglions lymphatiques ipsilatéraux sont négatifs pour la tumeur au microscope. |
| 2B | Tumeur localisée avec ou sans exérèse complète de la tumeur avec des ganglions lymphatiques ipsilatéraux positifs pour la tumeur; Les ganglions lymphatiques controlatéraux doivent être microscopiquement négatifs. |
| 3 | Tumeur unilatérale non résécable dépassant la ligne médiane avec ou sans envahissement ganglionnaire régional; Tumeur unilatérale localisée avec les ganglions lymphatiques controlatéraux envahis ou tumeur médiane avec extension bilatérale (non résécable) ou ganglions lymphatiques envahis. La ligne médiane est définie comme la colonne vertébrale. Les tumeurs provenant d'un côté et traversant la ligne médiane doivent s'infiltrer à la ligne médiane ou au-delà du côté opposé de la colonne vertébrale. |
| 4 | Toutes tumeurs primaires avec dissémination aux ganglions lymphatiques distants, aux os, à la moelle osseuse, au foie, à la peau et/ou à d'autres organes (à l'exception de ceux définis au stade 4S). |
| 4S | Tumeur primaire localisée (comme défini pour les stades 1, 2A ou 2B), avec une dissémination métastatique limitée à la peau, au foie ou à la moelle osseuse (limité aux enfants âgés de moins d'un an). |

Un système de classification plus complet a été élaboré au début des années 2000 à la suite de l'évaluation d'une cohorte de plus de 8 800 patients atteints du neuroblastome⁵³. L'International Neuroblastoma Risk Group Staging System (INRGSS) est plus précis puisqu'il se base sur un nouveau système de stratification qui utilise l'imagerie médicale (Tableau II)⁵⁴, contrairement au INSS qui se base sur l'ablation de la tumeur. Il est maintenant possible d'associer le stade L1 au stade 1, le stade L2 aux stades 2A/B et 3 et les stades M et MS équivalent, aux stades 4 et 4S respectivement⁵³. Pour chacun de ces stades, il est possible de prédire le risque associé au neuroblastome en s'appuyant sur les facteurs tels que l'âge du patient au moment du diagnostic, le stade selon l'INSS, les caractéristiques histologiques, le stade de différenciation de la tumeur et les aberrations génomiques^{53,54}.

Tableau II- Système de classification préopératoire - International Neuroblastoma Risk Group Staging System

| Stade | Description |
|-----------|--|
| L1 | Tumeur localisée sans infiltration des organes vitaux et confinée à une seule région du corps |
| L2 | Tumeur localisée avec facteur de risque |
| M | Tumeur métastatique (à l'exception du stade MS) |
| MS | Tumeur métastatique chez les enfants âgés de moins de 18 mois localisée à la peau, au foie et/ou à la moelle osseuse |

Les risques associés au neuroblastome peuvent être classés en trois catégories : 1) risque faible, 2) risque intermédiaire ou 3) risque élevé. Les neuroblastomes présentant des faibles risques, représentent 37% des diagnostics et le taux de survie sans complication (EFS) après 5 ans atteint 75 à 100%. Les patients ayant un risque jugé intermédiaire ont 50 à 75% de chance de survie et comptent pour 18% des cas. Les neuroblastomes à risque élevé touchent 45% des enfants diagnostiqués et les probabilités de survie pour les « *meilleurs* » cas sont de moins de 50% avant l'utilisation de l'immunothérapie^{49,53,55,56}.

1.8 Les traitements

Le neuroblastome est un cancer reconnu pour son hétérogénéité clinique. Le pronostic peut être favorable pour certains stades; la tumeur peut régresser spontanément ou à l'inverse la tumeur se dissémine à travers le corps (neuroblastome à haut risque).

Généralement, pour les neuroblastomes à faible risque des stades L1 et L2, sans amplification de l'oncogène MYCN⁵³, seule une chirurgie est nécessaire⁵⁷. Cependant, s'il y a une rechute postopératoire, un traitement de chimiothérapie sera administré au patient⁵⁸. Pour les stades MS ou 4S, dont le "S" a pour signification "Spéciale", aucun traitement n'est donné puisque dans la majorité des cas, le cancer se résorbe de lui-même^{48,59} dans le cas où les facteurs biologiques sont favorables⁵³. L'enfant est placé sous observation afin de s'assurer qu'il n'y ait pas de complication⁶⁰.

Le neuroblastome à risque intermédiaire regroupe en partie les stades L2 et M; le stade L2 rassemble les enfants de plus ou moins 18 mois sans amplification de MYCN, mais possédant une aberration génétique tandis que le stade M est associé aux enfants entre 12 et 18 mois sans amplification de MYCN⁵³. Afin de réduire la taille de la tumeur, les patients reçoivent plusieurs cycles de chimiothérapie préopératoire. Le but de la chimiothérapie est de résorber en totalité la tumeur sans pour autant endommager les organes. Si cette pratique est impossible ou incomplète, une exérèse macroscopique est effectuée (complète ou partielle) avant d'initier un cycle avec des agents chimiothérapeutiques. Dans des cas plus complexes, une radiothérapie est utilisée^{61,62}.

Finalement, tous les patients présentant une amplification de l'oncogène MYCN ont un diagnostic de neuroblastome à risque élevé⁵³. Les traitements standards prodigués pour les neuroblastomes à risque élevé débutent avec plusieurs cycles chimiothérapeutiques non myéloablatifs (c.-à-d., ne nécessite pas une greffe de cellules souches hématopoïétiques) et permettent de réduire la masse tumorale au site primaire (le taux de survie sans complication après 3 ans est de 26%)⁶³. Le traitement est suivi de l'exérèse complète (si possible) de la tumeur et d'une radiothérapie. Une étude réalisée par l'équipe de Katherine K. Matthay, en 1999, a démontré un bénéfice sur l'augmentation du taux de survie après 3 ans à plus de 46%, suite à la combinaison de la thérapie standard avec la chimiothérapie myéloablative (qui consiste à administrer des doses élevées d'agent chimiothérapeutique afin d'éradiquer en totalité ou en partie les cellules tumorales, mais également les cellules du système immunitaire

et les cellules souches; à la base de l'hématopoïèse), et suivie d'une transplantation des cellules souches du patient (c.-à-d., greffe autologue) et de l'utilisation de l'acide rétinoïque⁶³.

1.8.1 Acide rétinoïque

L'acide rétinoïque est un dérivé naturel ou synthétique de la vitamine A. Il est essentiel dans le développement embryonnaire et post-natal; ainsi qu'à l'âge adulte pour la croissance, la vision, la reproduction et la résistance aux infections. Son action physiologique affecte la différenciation des cellules épithéliales du tractus gastrique, du système immunitaire, de la peau, des os, de l'hématopoïèse et de l'homéostasie de divers tissus⁶⁴⁻⁶⁷.

L'acide rétinoïque joue un rôle dans le cancer puisque la carence en vitamine A augmente l'incidence des cancers chez plusieurs modèles animaux^{64,65,67}. L'acide rétinoïque, sous forme tretinoïn ou isotretinoïn module la croissance. Cette molécule régule le niveau d'expression de divers microRNA (c.-à-d., Petit ARN non-codant qui supprime l'expression de gène suite à leur liaison partielle d'une séquence complémentaire de l'ARN messenger (ARNm). Cette liaison inhibe la translation de l'ARNm en protéine ou en accélère sa dégradation⁶⁸). Ces microRNA ont un rôle majeur dans la différenciation des cellules neurales et peuvent avoir un effet suppresseur de tumeur ou une activité oncogénique dans divers types de cancers⁶⁹. L'acide rétinoïque sous forme *cis* est notamment incluse dans le traitement des neuroblastomes à haut risque, spécialement les cellules de neuroblastome réfractaires et même résistantes à la chimiothérapie⁶³. Chez les cellules de neuroblastome, l'acide rétinoïque est un agent qui induit la différenciation vers un état non pathologique ou active la voie apoptotique^{63,70-73}. L'administration de l'acide 13-*cis*-rétinoïque ne provoque pas d'effets secondaires chez les enfants atteints de neuroblastome à haut risque. De plus, suite à une transplantation de moelle osseuse autologue, l'utilisation de l'acide rétinoïque permet d'augmenter la survie du patient sans effets secondaires (EFS). Cependant, l'augmentation de la survie est obtenue uniquement lorsque la charge tumorale est faible⁶³.

Chapitre 2 : Les traitements immunothérapeutiques pour les neuroblastomes à risque élevé

2.1 Nouvelles approches immunothérapeutiques

La résistance des cellules cancéreuses face aux drogues chimiothérapeutiques est fréquente chez les patients atteints de neuroblastome à haut risque. Il est donc important d'orienter le traitement vers d'autres voies, telle que l'immunothérapie. L'immunothérapie combine des composants stimulant le système immunitaire et des molécules ciblant des récepteurs à la surface des cellules tumorales.

Ainsi, le protocole thérapeutique actuellement employé pour les enfants atteints de neuroblastome à risque élevé consiste en un traitement à l'aide de doses élevées de drogues de chimiothérapie suivi d'une chirurgie et d'une chimiothérapie induisant une myéloablation; la restauration de la fonction hématopoïétique est obtenue par greffe de cellules souches autologues préalablement prélevées chez le patient. Par la suite, l'irradiation locale réduit les risques de rechute⁷⁴ et est suivie par l'immunothérapie combinant l'anticorps monoclonal anti-disialoganglioside (GD2) ch14.18, l'interleukine-2 (IL-2), le GM-CSF et l'acide rétinoïque⁷⁵⁻⁸⁰.

2.2 L'anticorps monoclonal anti-disialoganglioside (GD2)

Les anticorps monoclonaux ciblent des antigènes spécifiques exprimés à la surface d'une cellule tumorale. L'usage de ce type de traitement est avantageux puisque les anticorps monoclonaux sont conçus pour cibler un antigène à la surface d'une cellule cancéreuse (avec une forte affinité et spécificité pour la molécule concernée). Ils ont peu d'effets toxiques sur le système et une longue demi-vie. Les mécanismes d'action induisant la lyse des cellules cibles passent par la voie de la cytotoxicité cellulaire dépendante de l'anticorps (ADCC)⁸¹, la cytotoxicité dépendante du complément (CDC)⁸².

En clinique, l'immunothérapie employant des anticorps monoclonaux (mAb) vise le glycolipide disialoganglioside (GD2)⁷⁵⁻⁷⁸, une molécule jouant un rôle dans l'adhésion cellulaire⁸³. On retrouve cette molécule à la surface des cellules de neuroblastome, de

glioblastome, de certaines cellules de mélanome et des cellules tumorales de poumons⁸²⁻⁸⁵. L'expression du GD2 se retrouve également sur certains types de cellules saines⁸², mais est restreint au système nerveux central, aux fibres nerveuses périphériques et aux mélanocytes de la peau⁸⁴. L'anticorps anti-GD2 administré chez la souris et chez l'homme, ne traverse pas la barrière cérébrale et ne cause aucun dommage neurologique à long terme⁷⁸. Ainsi, l'expression restreinte du GD2 dans les tissus sains fait du mAb anti-GD2, un traitement immunothérapeutique très efficace.

Plusieurs essais cliniques ont été réalisés sur trois types de mAb anti-GD2 de première génération (14G2a, ch14.18 et 3F8) et de deuxième génération (hu14.18-IL-2, hu14.18K322A et mAb1A7). Le 14G2A et le 3F8 sont respectivement des mAbs anti-GD2 IgG2 et IgG3 de type murin⁸⁴. Le ch14.18 est un mAb chimérique composé de la région variable (Fab) du mAb 14.18 anti-GD2 IgG3 murin et de la région constante (Fc) du IgG1 κ humain^{78,84}. Le mAb anti-GD2 ch14.18 possède une demi-vie plus longue que le mAb 14G2a, et peut atteindre jusqu'à 66 heures⁸⁴. L'anticorps monoclonal ch14.18 persiste à la surface des cellules tumorales et ce, jusqu'à 17 jours suivant le traitement immunothérapeutique⁷⁸. Il a également été démontré que l'anti-GD2 ch14.18 provoque la lyse des cellules de neuroblastome et de mélanome par les mécanismes d'ADCC et par CDC^{78,81,86,87}. Le mécanisme par ADCC consiste à éliminer les cellules cibles couplées avec un anticorps par le relargage de granules cytotoxiques (Perforine et Granzyme) ou par l'expression des ligands des récepteurs de mort cellulaire. Les cellules NK ont un rôle déterminant dans la lyse par ADCC. Le couplage de l'anticorps monoclonal est reconnue par la cellules NK ce qui à pour effet d'activer le relargage de ces granules cytotoxiques. La lyse des cellules tumorales n'est efficace que chez les patients qui ont un mismatch endogène (mismatch KIR-HLA)⁸⁸.

Lorsque l'on administre l'anticorps ch14.18 aux patients atteints de neuroblastome, les effets secondaires les plus communs sont la douleur, la fièvre, l'urticaire, une arythmie cardiaque (tachycardie), une hyponatrémie (diminution du taux de sodium) et une hypokaliémie (diminution du taux de potassium). Les douleurs les plus courantes sont localisées généralement aux extrémités et à l'abdomen. Cette toxicité est contrôlable et réversible puisque la sévérité de la douleur dépend de la dose et du nombre d'administrations⁷⁸.

2.3 Interleukine-2

L'interleukine (IL)-2 est une glycoprotéine sécrétée de 15 kDa se liant à la surface de récepteur de certains leucocytes comprenant les sous-populations CD4⁺ et CD8⁺ des lymphocytes T, les lymphocytes B, les cellules Natural Killer (NK) ainsi que les monocytes et les thymocytes⁸⁹⁻⁹¹. Cette molécule monomérique fait partie de la famille des cytokines de type I et possède une structure globale formée de quatre hélices alpha⁹¹. L'IL-2 est impliquée dans le maintien de l'homéostasie immune, régule le développement, la survie ainsi que la fonction cellulaire. Cette molécule assure la stimulation de la croissance des lymphocytes T et détermine l'intensité et la durée de la réponse immunitaire innée et adaptative.

Il a été démontré que 60% des cellules T CD4⁺ activées par l'IL-2 augmentent à leur surface l'expression de FasL, essentiel à la lyse de cellules cibles. L'IL-2 joue également un rôle dans la régulation négative du système immunitaire et prévient une réponse auto-immunitaire. L'IL-2 lie son récepteur pour ensuite être consommée par la cellule suite à son internalisation. En absence d'une stimulation continue antigénique, les lymphocytes T activés entrent en apoptose causée par l'absence ou la réduction d'IL-2 dans l'environnement. L'IL-2 induit le programme de mort cellulaire des cellules T activés par leur voie de signalisation Fas/FasL. Ainsi, une délétion du gène IL-2 chez la souris cause une réponse auto-immune inflammatoire létale affectant de multiples organes⁹¹ et la délétion de la sous-unité γ c du récepteur à l'IL-2 a des conséquences sévères sur le système immunitaire, puisque cette chaîne est commune à plusieurs cytokines (c.-à-d., IL-2; IL-4; IL-7; IL-9; IL-15; IL-21). L'absence de la sous-unité γ c affecte le développement des lymphocytes T et B et rend impossible celui des cellules NK⁹¹. L'IL-2 a également la propriété d'induire le facteur de nécrose tumorale (TNF)- α , l'interféron (IFN)- α et le GM-CSF en plus d'augmenter l'activité cytolytique des différents sous-types de cellules NK⁹².

Les effets de l'IL-2 sur les cellules immunitaires peuvent être utilisés lors du développement d'une immunothérapie contre le cancer. L'objectif de la thérapie à l'aide d'IL-2 est 1) d'augmenter le nombre de cellules immunitaires par la stimulation de leur développement et de leur survie, ainsi que 2) d'activer leur cytotoxicité et/ou leur production de cytokines^{79,93,94}. En 1992, la *Food and drug administration* (F.D.A.) a approuvé l'utilisation de l'IL-2 dans le traitement du cancer du rein. Des essais cliniques sont présentement en cours afin de traiter, entre autre, le cancer du sein, des ovaires, du foie, de la

prostate et des poumons. Des études réalisées sur des cellules tumorales ont permis de démontrer que l'activation des lymphocytes par l'IL-2 cause la lyse des cellules cibles autant *in vitro* qu'*in vivo*^{79,80}. L'action lytique engendrée par le traitement à l'IL-2 est maintenant utilisée en combinaison avec des anticorps monoclonaux. Ainsi, la combinaison ch14.18 anti-GD2 et IL-2 est employée en clinique et cause l'augmentation de la lyse des cellules tumorales et le déclenchement du phénomène lytique par ADCC^{79,80}. Des faibles doses d'IL-2 sont utilisées. Toutefois, plusieurs effets toxiques sont observés. La fièvre, des frissons, la diarrhée, la nausée, le vomissement, la confusion et la perte de poids font partie des effets secondaires mineurs. L'anémie, la thrombocytopenie (diminution du nombre de plaquettes dans le sang), la détresse respiratoire et le coma font partie des effets secondaires les plus sévères^{79,80,91}.

2.4 GM-CSF

Le GM-CSF est une molécule générant des colonies de macrophages et de granulocytes à partir de cellules souches⁹⁵. Elle affecte la prolifération de plusieurs cellules myéloïdes telles que les monocytes⁹⁶⁻⁹⁸, les neutrophiles⁹⁹⁻¹⁰¹, les éosinophiles¹⁰², ainsi que les cellules dendritiques^{103,104}. Par ailleurs le nombre de cellules hématopoïétiques n'est pas affecté dans un modèle murin dont les cellules sont GM-CSF^{-/-105}. Le GM-CSF est difficilement détectable dans le sérum humain hormis lors d'une infection (c.-à-d., En réponse à l'endotoxine – Lipopolysaccharide (LPS))^{106,107}. Il est détectable au site d'inflammation^{96,98,108}. Lors d'une interaction avec un agent infectieux tel le LPS, les monocytes induisent la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (c.-à-d., l'IL-1 et le TNF- α) dans l'environnement. Ces molécules activent les cellules avoisinantes qui à leur tour synthétisent le GM-CSF. Le GM-CSF stimule la prolifération, la survie, la différenciation et l'induction des fonctions effectrices des cellules énuméré ci-haut (activation d'une boucle paracrine)⁹⁵. Cette molécule est sécrétée par plusieurs types cellulaires incluant les fibroblastes, les cellules du muscle lisse, les cellules endothéliales et les cellules épithéliales des bronches.^{98,109}. Le GM-CSF possède donc un rôle central dans l'activation locale, le recrutement et la survie des cellules immunitaires.

Le GM-CSF est actuellement utilisé afin de stimuler la protection de l'hôte envers les tumeurs grâce à sa réaction inflammatoire locale, permettant le recrutement des cellules présentatrices d'antigènes directement au niveau du site.

Utilisé en combinaison avec l'anticorps monoclonal 3F8, le GM-CSF augmente l'efficacité thérapeutique en augmentant le nombre de cellules effectrices en circulation et en augmentant l'effet cytotoxique par ADCC des lymphocytes. L'utilisation du GM-CSF à des concentrations de 0.2 à 20ng/ml assure l'activation maximale du mécanisme lytique ADCC (augmentation de 93% à 267%) chez les cellules effectrices. Par ailleurs, l'ajout de GM-CSF au 3F8 permet d'en réduire la concentration de dix fois, sans pour autant altérer l'effet lytique obtenu par le traitement. Cependant, l'effet lytique n'est pas attribuable au GM-CSF seul. Sans la présence de granulocytes, la lyse des cellules de neuroblastome est indétectable. Le traitement est bien toléré par les enfants atteints de neuroblastome et aucune toxicité n'est observée au niveau du cœur, du foie et des reins. Les seuls effets secondaires observés sont des crises d'urticaire mineures, de la fièvre et de l'hypotension associée à l'infusion du 3F8⁷⁶.

Chapitre 3 : Problématique des neuroblastomes à haut risque

Les traitements additionnels avec l'anticorps anti-tumoral monoclonal anti-GD2, l'IL-2, le GM-CSF et l'acide 13-*cis* rétinoïque ont permis d'améliorer l'EFS et la survie, en général, à 66% pour les enfants qui répondent cliniquement à la chimiothérapie suivie d'une greffe⁷⁷. Cependant, 40% des patients subiront une progression de la maladie ou une rechute. Ces neuroblastomes à haut risque réfractaires aux traitements sont causés en partie par la présence de cellules souches cancéreuses (CSC), aussi connues comme étant des cellules initiatrices de tumeur (TIC). La résistance aux traitements peut également être liée à la présence de cellules n'exprimant pas le marqueur GD2 et donc échappant à l'immunothérapie ciblée anti-GD2.

3.1 Les cellules initiatrices de tumeur (TIC)

Les cellules souches cancéreuses (CSC) ont des propriétés similaires réservées aux cellules souches saines puisqu'elles peuvent s'auto-régénérer et se différencier. Elles effectuent une division asymétrique en créant une nouvelle CSC et des cellules cancéreuses plus différenciées¹¹⁰. Deux hypothèses sont proposées afin de comprendre l'origine de ces CSC. Ces dernières peuvent être une cellule souche normale, mais plus susceptible à l'accumulation de mutations oncogéniques, ou une cellule différenciée ayant acquis les propriétés d'une CSC¹¹¹. De plus, elles sont résistantes aux traitements standards de chimiothérapie et de radiothérapie causant ainsi la récurrence rapide de tumeurs¹¹²⁻¹¹⁵. Les CSC sont retrouvées dans divers types de cancers, tel que le cancer du cerveau^{110,116}, du colon^{117,118}, du pancréas^{119,120}, des reins¹²¹, du foie¹²² et de la prostate^{123,124}. La présence d'un ou de plusieurs marqueurs tels que CD24, CD44 et CD133 permet la détection des CSC.

3.2 Le récepteur CD133

Le récepteur CD133 est une glycoprotéine à cinq domaines transmembranaires exprimée par les progéniteurs hématopoïétiques et par les cellules souches de la crête neurale^{112,125}. Ce récepteur permet de distinguer les cellules souches et les cellules précurseurs. Le CD133 fait partie de la famille des Prominin-1 et est exprimé au niveau des cellules progénitrices endothéliales, des cellules souches hématopoïétiques et des cellules souches épithéliales de la prostate. La fonction biologique de la Prominin-1 n'est pas encore élucidée. La Prominin-1 pourrait toutefois jouer un rôle dans la régulation de la topologie membranaire¹²⁵ puisqu'une délétion de Prominin-1 cause la dégénérescence de la rétine par l'altération des photorécepteurs de l'œil¹²⁶.

Le marqueur CD133 est utilisé afin d'isoler les cellules souches tumorales du cancer du pancréas¹¹⁹, du colon^{117,118} et des reins¹²¹. Pour les cancers de type cérébral, le marqueur CD133 est exprimé chez le médulloblastome¹¹⁰, le glioblastome^{113,127,128} et le neuroblastome¹²⁹. Le marquage immunohistochimique d'échantillons de tumeurs solides de neuroblastomes et de ganglioblastomes prélevées sur 40 patients a permis de démontrer que les neuroblastomes à haut risque expriment plus fréquemment le CD133 à leur surface (57.9% pour le stades 3 et 4) comparativement aux stades 1 et 2 (30.7%) et le stade 4S (37.5%)¹³⁰. De plus, la survie de ces patients est inversement corrélée avec l'expression du CD133. Les patients CD133⁻ survivent plus longtemps que les patients CD133⁺¹³⁰. Une seconde étude plus poussée a été réalisée sur une cohorte plus imposante de 280 patients atteints de différents stades de neuroblastome. Le récepteur CD133 a été détecté sur 100 des 280 patients de l'étude. Le stade 4 représente à lui seul 84 des patients positifs au CD133 sur un total de 106 (i.e., 79,2%). Ainsi, l'expression du CD133 est associée de façon significative à la diminution des chances de survie des patients¹¹⁴.

3.3 Résistance aux traitements de chimiothérapie

Les CSC possèdent une autre propriété associée aux cellules souches saines soit la propriété de quiescence et la résistance à des drogues multiples et aux toxines¹³¹. Les CSC ont la capacité de réparer l'ADN endommagé et expriment des transporteurs de drogues, de type ABC (ATP-binding cassette). Il a été démontré que l'inactivation de ces transporteurs

sensibilise les cellules aux drogues chimiothérapeutiques tels que la vinblastine, l'ivermectin, le topotecan et le mitoxantrone. Les cellules CD133⁻ expriment peu ou pas les gènes ABCC11 et ABCC12 comparativement aux cellules CD133⁺. Ces gènes font partie de l'ATP-binding cassette de la sous famille C des membres 11 et 12, respectivement. Ils encodent les protéines qui assurent une résistance aux drogues¹²⁹ ce qui causent la sensibilité accrue chez ces cellules.

Les cellules TIC exprimant le CD133 à leur surface résistent aux traitements chimiothérapeutiques et ainsi induisent la croissance de la tumeur^{112,114}. Ces cellules possèdent également des gènes et des protéines qui promeuvent la survie cellulaire et inhibent l'induction de l'apoptose, tels le CIRBP (Cold-inducible mRNA binding protein)¹³² et l'AKT (protein kinase B/AKT)^{114,133,134}. L'inhibition du gène CIRBP dans le cancer de la prostate réinstaurer la sensibilité des cellules cancéreuses à la chimiothérapie¹³². Il en est de même pour l'altération de la voie AKT; l'inhibition de la voie AKT dans les cellules de neuroblastome CD133⁺ rend ces dernières sensibles aux traitements de chimiothérapie (doxorubicin, la vincristine et le cisplatine) à l'instar des cellules CD133⁻¹¹⁴.

Chapitre 4 : La reconstruction du système immunitaire

Le traitement de chimiothérapie myéloablatrice emploie des doses qui ne sont pas tolérées par les cellules de la moelle osseuse du patient, ce qui déplete les cellules souches hématopoïétiques et les cellules du système immunitaire. Les cellules souches hématopoïétiques sont à l'origine de toutes les cellules sanguines, elles expriment le CD34 à leur surface et sont situées dans les niches de la moelle osseuse. Pour assurer la survie du patient, un nouveau système hématopoïétique doit être transplanté. La transplantation consiste en une infusion intraveineuse de cellules souches hématopoïétiques. Ces cellules sont obtenues à partir de trois sources distinctes : 1) les cellules souches présentes dans la moelle osseuse, 2) en circulation dans le sang périphérique¹³⁵ ou 3) dans le sang de cordon ombilical¹³⁶⁻¹³⁹. Il est également possible d'isoler des cellules souches à partir du foie fœtal, mais cette pratique n'est utilisée qu'en de rares occasions. Les cellules souches peuvent être directement prélevées chez le patient ou sur son jumeau identique. Ces types de greffe portent respectivement les noms de greffe autologue et greffe syngénique. Une greffe est dite allogénique lorsque les cellules souches proviennent d'autre individu que le patient (un membre de la famille, un donneur anonyme ou une unité de sang de cordon).

4.1 Les différences entre une greffe autologue et allogénique

Lorsque la greffe est autologue, les cellules immunocompétentes présentes dans le greffon ne déclenchent pas la maladie du greffon contre l'hôte (GvHD), car les cellules font partie du Soi. Ainsi, l'utilisation d'immunosuppresseurs n'est pas requise dans ce type de greffe. Toutefois, ce type de greffe est associé à un risque accru de rechute, car la réaction immunitaire du greffon contre la tumeur est faible (effet GvT). Les cellules immunocompétentes du greffon ne s'activant pas contre les cellules tumorales.

La greffe allogénique consiste en l'infusion de cellules souches d'un donneur autre que le patient lui-même. L'un des facteurs primordiaux dans ce type de traitement est la compatibilité entre le donneur et le receveur. La compatibilité est évaluée en fonction de l'expression des gènes HLA (antigènes de leucocytes humains), aussi connus sous le nom de

complexe majeur d'histocompatibilité (CMH). Les cellules immunitaires expriment à leur surface le CMH de classe I qui permet la reconnaissance des cellules du Soi. Lorsque les gènes HLA du donneur sont identiques au receveur, les risques de rejet sont diminués^{140,141}. Toutefois, il y a toujours un risque que les cellules immunocompétentes présentes dans le greffon déclenchent une GvHD¹⁴². Afin de réduire les de GvHD, la cyclosporine A et des corticoïdes sont administrés en prophylaxie au patient. Le méthotrexate et/ou de la cyclophosphamide peuvent également être utilisés¹⁴³⁻¹⁴⁵.

Il est possible de balancer les effets recherchés afin de traiter le patient. Si la compatibilité HLA n'est pas parfait, les risques de rejet de greffe, ainsi que l'effet GvHD sont présents^{140,141}, mais une légère différence au niveau du système immunitaire entre le receveur et le donneur cause le phénomène de greffon contre la tumeur (GvT). Cet effet GvT diminue les risques de rechute, puisque les cellules immunitaires présentes dans le greffon reconnaissent les cellules tumorales comme étant étrangères et cancéreuses.

4.2 La greffe allogénique dans le traitement du neuroblastome

Les patients atteints du neuroblastome reçoivent dans la plus part des cas une greffe autologue¹⁴⁶. Toutefois, les risques de rechute et les cas de neuroblastome réfractaire sont fréquents. Plusieurs études ont été réalisées sur les possibilités d'effectuer des greffes de cellules souches hématopoïétiques allogéniques pour ce type de cancer. Lorsque le cancer persiste suite à une première transplantation autologue, le patient risque une rechute lors de la seconde greffe.

L'effet GvT chez les enfants diagnostiqués avec un neuroblastome à haut risque n'a pas été rapporté avant les années 2000. Une première équipe a rapporté en 2003, le cas d'un jeune garçon de 4 ans atteint d'un neuroblastome de stade 4 qui ne démontrait aucun signe de rechute ou de GvHD chronique 4 ans après une première greffe autologue et une seconde greffe allogénique¹⁴⁷. Un deuxième cas est rapporté en 2007 chez une jeune fille âgée de 10 ans diagnostiquée pour un neuroblastome métastatique réfractaire combiné avec une leucémie myéloïde aigue (AML) secondaire¹⁴⁸. Ainsi, 900 jours suivant la transplantation allogénique de moelle osseuse, l'enfant était en rémission totale avec seulement une GvHD cutanée

chronique. Ces deux cas démontrent le potentiel de l'effet du greffon contre le neuroblastome suite à une greffe allogénique de moelle osseuse^{147,148}.

L'accessibilité à un donneur de moelle osseuse compatible peut s'avérer problématique dans le cas de greffe allogénique. Afin d'éviter les complications, un donneur possédant un match HLA parfaitement identique au patient est recherché. Le HLA de chaque membre de la famille est analysé. Si aucun n'est compatible, les donneurs n'ayant aucun lien familial avec le patient sont considérés. S'il est préférable d'obtenir un match HLA parfait, un simple mismatch peut également être considéré. Il a été démontré qu'il est possible d'obtenir dans 99% des cas, un sang de cordon compatible pour le receveur en moins de 1 mois, comparativement à plus de 61 jours pour un donneur de moelle^{149,150}.

L'immaturation des cellules immunitaires présentes dans le sang de cordon permet d'accepter une plus grande disparité du HLA. Une concordance de 3 ou 4 sur 6 des différents HLA est suffisante pour effectuer une transplantation. Pour les greffes allogéniques provenant d'autres sources (sang périphérique enrichie de cellules souches ou moelle osseuse), une concordance de 7 sur 8 est nécessaire. Par ailleurs, l'immaturation des cellules du sang de cordon réduit la sévérité de la GvHD¹⁵¹⁻¹⁵³. Dans le cas du neuroblastome réfractaire, il est possible d'obtenir une prise de greffe après un régime de conditionnement intense (chimiothérapie suivit d'une greffe). Toutefois, la rechute des patients est imminente et ce, avant que l'effet GvT ne soit établi¹⁴⁹. Ainsi, la greffe doit être effectuée au moment où le nombre de cellules tumorales est le plus réduit. Bien que les unités de sang de cordon contiennent de 10 à 100 fois moins de cellules nucléées comparativement à la moelle osseuse, la survie des patients après 5 ans est similaire pour les cas de leucémie chez l'enfant (57.5% suite à une greffe de sang de cordon versus 62.1% pour une greffe de moelle osseuse)¹⁵⁴.

4.3 La reconstitution du système immunitaire après une greffe allogénique

L'avènement de l'effet GvT suite à une greffe allogénique lors du traitement des cancers solides réfractaires a conduit à l'analyse de la reconstitution immunitaire à partir des cellules souches présentes dans le greffon. La reconstitution des principales populations du système immunitaire (les lymphocytes T et ses sous-populations de cellules CD4⁺ et CD8⁺, les lymphocytes B et les cellules NK) a déjà fait l'objet d'études comparatives entre la greffe de

sang de cordon à la greffe de moelle osseuse¹⁵⁴⁻¹⁵⁸. La reconstitution assure la réapparition de cellules B fonctionnelles, le développement de cellules T thymiques et périphériques. Elle permet également la restauration des cellules effectrices, telles que les cellules T cytotoxiques et les cellules NK. Finalement, elle réinstalle la présentation des antigènes et rebâtit le répertoire du système immunitaire¹⁵⁹.

Les lymphocytes B (CD19⁺) sont originaires de la moelle osseuse et expriment un récepteur à l'antigène spécifique sur leur membrane. À la suite de l'interaction avec leur antigène, les lymphocytes B se différencient en plasmocytes qui se spécialisent dans la sécrétion d'anticorps pour ensuite générer des cellules mémoires. Les lymphocytes T ont pour origine la moelle osseuse et mûrissent dans le thymus. Il existe plusieurs sous-populations bien distinctes de cellules T. Les sous-populations sont les cellules T CD8⁺ cytotoxiques et CD4⁺ «*helper*». Les cellules T CD8⁺ assurent la lyse des cellules cibles et les lymphocytes T CD4⁺ orientent la réponse immunitaire vers les voies T_H1, T_H2 ou T_H17 en fonction des cytokines présentes dans leur environnement. Ces deux sous-populations cellulaires font partie du système immunitaire adaptatif.

Les cellules NK participent à la fois au système immunitaire inné et adaptatif. Ce sont des lymphocytes cytotoxiques de type granulaire originaires de la moelle osseuse, mais n'exprimant aucun récepteur spécifique à l'antigène. La réaction cytolytique des cellules NK est dirigée contre les cellules tumorales, les cellules infectées ou altérées par un virus (diminution de l'expression du complexe majeur d'histocompatibilité). Les cellules NK possèdent deux sous-populations basées sur la densité du récepteur CD56 à la surface de la cellule : les cellules CD56^{bright} et les cellules CD56^{dim}¹⁶⁰.

La reconstitution immunitaire à la suite d'une greffe de sang de cordon ou de moelle osseuse est similaire^{154,158,159}. Peu de lymphocytes B et T sont détectables après la greffe. Par contre, le nombre de cellules B CD19⁺ revient à la normale 3 mois après la greffe de sang de cordon, comparativement à 6 mois pour une greffe de moelle osseuse^{154,156}. La reconstitution de la sous-population de lymphocytes T CD8⁺ est plus lente (médiane de 7.7 mois) que les lymphocytes T CD4⁺ (médiane de 5.1 mois) lors d'une greffe de sang de cordon^{154,156}. Lors d'une greffe de cellules souches provenant de la moelle osseuse, la vitesse de reconstitution est inversée (2.8 mois pour les cellules T CD8⁺ versus 6 mois pour les cellules T CD4⁺)¹⁵⁴. La population de lymphocytes T régulatrices (CD25⁺ FOXP3⁺ CD4⁺) revient à la normale après 1

mois pour ces deux types de greffe¹⁵⁵. Les cellules NK sont les premières à atteindre ou même excéder les décomptes observés chez le groupe contrôle après seulement 1 mois^{156,161-163}. Les cellules NK représentent près de 80% des lymphocytes du sang périphérique durant les 100 premiers jours post-transplantation¹⁵⁸. Les cellules NK CD56^{bright} prédominent et sont considérées comme les précurseurs des cellules NK CD56^{dim}^{164,165}. Elles possèdent un faible potentiel cytolytique, mais elles sécrètent une grande quantité de cytokines, tel que l'IFN- γ . La sous-population CD56^{dim} surexprime les récepteurs activateurs comparativement au contrôle sain, mais cette sous-population exprime FasL et produit normalement la perforine et le granzyme^{155,157,158}. L'activité anti-tumorale et cytolytique des cellules NK n'est donc pas compromise ni altérée à la suite d'une greffe de cellules souches hématopoïétiques allogéniques. Avec une greffe de sang de cordon, la reconstitution des cellules NK est particulièrement riche en une sous-population aux propriétés anti-tumorales¹⁵⁵.

Chapitre 5 : Les cellules Natural Killer

5.1 L'origine des cellules Natural Killer

Les cellules NK ont d'abord été découvertes chez les rongeurs au début des années 70¹⁶⁶⁻¹⁶⁹. L'observation de la lyse sur des cellules tumorales murines par des cellules non phagocytiques mena à la caractérisation des cellules NK^{166,167}. La cellule NK est définie fonctionnellement et histologiquement comme un large lymphocyte granulaire capable d'éliminer non-spécifiquement les cellules cibles, dont les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe I sont sous-exprimées à leur surface. Les termes « Natural » et « Killer » représentent à l'origine cette capacité naturelle de ces lymphocytes à tuer spontanément des cellules tumorales chez un animal non-immunisé. La cytotoxicité naturelle des cellules NK a été associée au mécanisme de cytotoxicité cellulaire dépendant de l'anticorps (ADCC)^{168,169}. Toutefois, chez l'homme, la présence d'une sous-population de lymphocytes naturellement cytotoxiques a d'abord été interprétée comme un simple artefact de laboratoire^{170,171}.

5.2 Le développement des cellules NK

Les cellules NK humaines peuvent facilement être distinguées des autres cellules mononuclées du sang par une analyse phénotypique, car elles expriment l'antigène CD56 à leur surface^{172,173} et ne possèdent aucun des marqueurs conventionnels qui caractérisent les lymphocytes T (CD3) et B (CD19), ainsi que les monocytes (CD14). Elles sont donc définies comme étant CD56⁺CD3⁻CD19⁻CD14⁻¹⁶⁵.

Il est possible de diviser les cellules NK en deux grandes sous-populations (c.-à-d., CD56^{bright} et CD56^{dim}) en fonction de la densité du CD56 à leur surface¹⁷⁴. La grande majorité des cellules CD56^{bright} sont retrouvées dans les tissus lymphoïdes secondaires (c.-à-d., ganglions et amygdales), tandis que plus de 90% des cellules CD56^{dim} sont isolées dans le sang et le foie^{94,175}. Tout comme les autres leucocytes, les cellules NK dérivent des cellules progénitrices du système hématopoïétique, les cellules CD34⁺. Cependant, il est possible de générer des cellules CD56^{bright} uniquement à partir d'une sous-population de cellules souche

bien précise; la sous-population $CD34^+CD45RA^+$, qui représente seulement 1% de la population $CD34^+$ dans la moelle osseuse et moins de 10% dans le sang¹⁷⁶. Ainsi, des études sur le développement des cellules NK humaines suggèrent que la sous-population de cellules progénitrices hématopoïétiques $CD34^+CD45RA^+$ dérivée de la moelle osseuse et du sang périphérique entre dans les tissus lymphoïdes secondaires¹⁷⁶. Dans ces organes, les progéniteurs des cellules NK sont activés afin de se différencier en cellules $CD56^{bright}$ (c.-à-d., immatures), puis $CD56^{dim}$ (c.-à-d., matures)^{164,165}. Les cellules NK $CD56^{dim}$ retournent dans la circulation sanguine, tandis qu'une partie des cellules $CD56^{bright}$ demeurent dans les organes lymphoïdes secondaires^{94,175}.

5.3 Caractérisation fonctionnelle des cellules NK dans le sang périphérique

Les cellules NK représentent 5 à 15% des cellules mononuclées du sang périphérique humain^{174,177}. La densité des $CD56$ et $CD16$ à la surface membranaire des cellules NK¹⁷⁷, définissent deux populations de cellules NK avec des fonctions distinctes^{165,174} (Figure 4) : la production de cytokines ou l'activité cytolytique. Ces fonctions ne sont pas mutuellement exclusives. Dans le sang périphérique humain, environ 90% des cellules NK sont caractérisées par les marqueurs $CD3^-CD56^{dim}CD16^{bright}$ et ce sont les cellules possédant la plus grande activité cytolytique, tandis que 10% des cellules NK sont $CD3^-CD56^{bright}CD16^{nég/dim}$ et ont des propriétés de cellules « *helper* » en raison de leur production de cytokines^{165,177}. De plus, la morphologie cellulaire des deux sous-populations diffère : les cellules NK $CD56^{dim}CD16^{bright}$ sont plus larges et granulaires que les cellules $CD56^{bright}CD16^{nég/dim}$ ^{165,177}.

Le $CD56$ est une glycoprotéine de 175 à 185 kDa associée à une molécule d'adhésion des cellules neurales. Le $CD16$, aussi nommé $Fc\gamma RIII$, est une glycoprotéine transmembranaire de la superfamille des Ig atteignant 50 à 70 kDa. Ce récepteur reconnaît les fragments Fc des IgG et il est exprimé par les cellules NK, les monocytes et les neutrophiles.

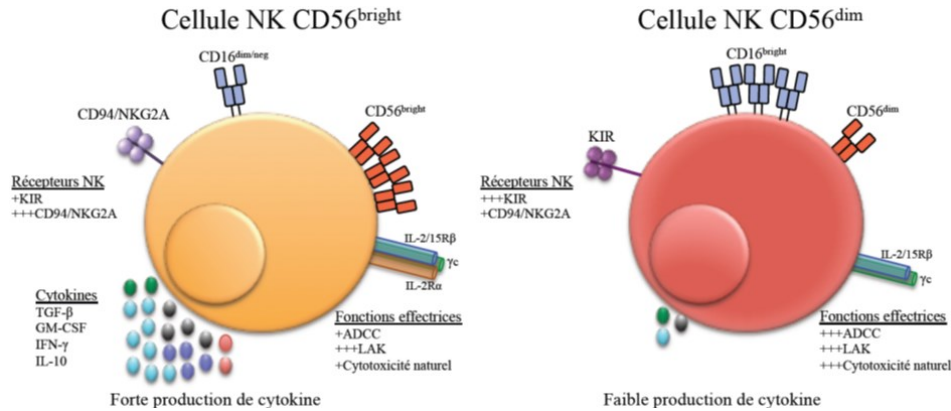


Figure 4 – Caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles des deux sous-populations des cellules NK.

Les cellules NK CD56^{bright}CD16^{neg/dim} sont la principale source de cytokines immunorégulatrices, mais possèdent un faible potentiel cytotoxique. Elles expriment à leur surface des faibles niveaux de KIR, mais un fort niveau de CD94/NKG2A, contrairement aux cellules NK CD56^{dim}CD16^{bright} dont les niveaux de KIR sont élevés à la surface cellulaire et le CD94/NKG2A est faiblement présent. Ces dernières produisent également des faibles niveaux de cytokines, mais ont un fort potentiel cytotoxique naturel et médient la lyse par ADCC. Le pouvoir cytotoxique de ces deux sous-populations de cellule NK contre les cellules tumorales est augmenté par l'IL-2 (Lymphokine activated killer cell – LAK). Cooper et al. Blood 2001¹⁷⁴

Il a été démontré par l'équipe de Cooper que les cellules NK CD56^{bright}CD16^{neg/dim}, contrairement aux CD56^{dim}CD16^{bright}, sont les principales productrices de cytokines et de chimiokines (c.-à-d., l'IFN-γ, le TGF-β, l'IL-10 et le GM-CSF) en réponse à une stimulation¹⁷⁴. La production de cytokines et la prolifération des cellules NK CD56^{bright}CD16^{neg/dim} sont assurées par leur grande affinité pour l'IL-2 présente dans leur environnement^{165,178}. Toutefois, selon l'étude réalisée par De Maria, dans les 2 à 4 premières heures suivant une infection, l'IFN-γ est produite par la sous-population CD56^{dim}CD16^{bright}. Ce n'est seulement qu'après 16 heures de stimulation que les cellules NK CD56^{bright}CD16^{neg/dim} prennent le relais et sécrètent l'IFN-γ¹⁷⁹. Elles assurent une large production de molécules pro-inflammatoires ou immunosuppressives qui varient selon le type de la stimulation, de la virulence et de la durée de la stimulation¹⁷⁹.

La fonction lytique naturelle contre les cellules cibles est majoritairement assurée par les cellules NK CD56^{dim}CD16^{bright}¹⁶⁵. Cependant, à la suite d'une activation *in vitro* par l'IL-2, l'activité cytolytique est comparable pour les deux sous-populations de cellules NK^{165,178}. La cytotoxicité des cellules NK est associée au mécanisme d'ADCC, par la liaison du CD16 (FcγRIII) à l'anticorps lié à la surface de la cellule cible résultant d'une réponse immunitaire contre un antigène^{180,181}. Puisque les cellules CD56^{dim} expriment plus fortement CD16, l'ADCC attendue est plus importante que pour les cellules CD56^{bright}. Les cellules NK peuvent lyser les cellules cibles soit par la libération de leurs granules cytotoxiques contenant de la perforine et du granzyme¹⁸² soit par induction directe de l'apoptose médiée par TRAIL. Les différentes voies cytotoxiques seront décrites ultérieurement dans la section 5.5. Il a également été démontré que le CD16 favorise la mort cellulaire par la voie FasL¹⁸³.

Les cellules NK sont considérées comme des composantes à la fois du système immunitaire inné et adaptatif¹⁸⁴. Les cellules NK combattent les infections bactériennes et virales et assurent l'immunosurveillance contre les tumeurs¹⁸⁵⁻¹⁸⁷.

5.4 Activation ou inhibition des cellules NK - Les super-familles de récepteurs

L'activation des fonctions cytotoxiques des cellules NK est régulée par la balance entre les différents signaux inhibiteurs et activateurs, ainsi qu'entre les molécules d'adhésion et de co-stimulation présentes à la surface membranaire des cellules NK. Elles sont activées par: la détection de protéines virales, la présence de protéines de stress à la surface cellulaire, la liaison avec une cellule dendritique activée ou par la présence de cytokines pro-inflammatoires dans l'environnement cellulaire. La reconnaissance de diverses composantes de microorganismes (motifs moléculaires associés aux pathogènes - PAMPs), par les récepteurs Toll-like (TLR) présents à la surface plasmique ou dans les phagolysosomes et les endosomes (TLR3, TLR7, TLR8, TLR9) permettent d'augmenter la production d'IFN-γ, d'activer les cellules dendritiques immatures et de stimuler l'activité cytotoxique des cellules NK¹⁸⁸⁻¹⁹⁰. Les cellules NK sont régulées par deux groupes de récepteurs inhibiteurs et/ou activateurs subdivisés en trois super-familles (Tableau III et Tableau IV):

- 1) les récepteurs de la superfamille des Ig (KIR)^{191,192};
- 2) les récepteurs de la superfamille des Lectines de type-C (CD94/NKG2)^{193,194};

3) les récepteurs de cytotoxicité naturelle (c.-à-d., NCR : NKp30, NKp44 et NKp46)¹⁹⁵⁻¹⁹⁷.

Les groupes 1 et 2 sont impliqués dans la reconnaissance du CMH de classe I.

Tableau III - Les différents récepteurs activateurs exprimés chez la cellule NK

| Récepteurs activateurs | | Ligands |
|--------------------------------------|-------|-------------------------------|
| NKG2D | | MICA/B |
| | | ULBP1, 2, 3 |
| Natural Cytotoxicity Receptors (NCR) | NKp30 | B7-H6 |
| | NKp44 | NKp44L |
| | NKp46 | Héparine sulfate |
| DNAM-1 | | PVR (CD155), Nectin-2 (CD112) |
| FcγRIIIa (CD16a) | | Fragment Fc des anticorps |

Tableau IV - Les différents récepteurs inhibiteurs exprimés chez la cellule NK

| Récepteurs inhibiteurs | Ligands (CMH de classe I) |
|------------------------|---------------------------|
| KIR2DL1 | HLA-C groupe 2 |
| KIR2DL2/3 | HLA-C groupe 1 |
| KIR3DL1 | HLA-Bw4 |
| CD94/NKG2A | HLA-E |

Les récepteurs Killer Immunoglobuline (Ig)-like (KIR) sont des glycoprotéines transmembranaires exprimées sur les cellules NK. Ils sont considérés comme la clé de la régulation des cellules NK puisqu'il existe des KIR inhibiteurs et des KIR activateurs. Lorsqu'ils se lient aux molécules de CMH de classe I, l'activité cytotoxique des cellules NK est inhibée (pour les récepteurs inhibiteurs). Une défaillance dans l'expression du CMH de classe I à la surface d'une cellule active les cellules NK exprimant le KIR correspondant.

Représentant une famille de gènes très polymorphiques, 15 gènes KIR sont répertoriés chez l'homme, dont deux pseudogènes. Les KIR sont différenciés en fonction de leur structure membranaire et leur nomenclature est basée sur le nombre de domaines (D) Ig-like dans la région extracellulaire, ainsi que la longueur de la chaîne cytoplasmique. Il existe 11 KIR à deux domaines Ig-like et 4 KIR à trois domaines Ig-like. Les KIR à longue chaîne cytoplasmique (L) sont considérés comme des récepteurs inhibiteurs (KIR2DL et KIR3DL) à l'exception du KIR2DL4¹⁹¹. KIR2DL4 est uniquement exprimé sur les cellules NK CD56^{bright} et sa fonction est associée à l'activation de la production de cytokines plutôt qu'à l'activité cytotoxique des cellules effectrices. Les KIR à chaîne courte (S) sont des récepteurs activateurs (KIR2DS et KIR3DS)¹⁹¹. Le déterminant de leur fonction respective est la présence de la séquence ITAM ou ITIM au niveau de leur queue cytoplasmique. Les récepteurs activateurs recrutent une molécule accessoire possèdent la séquence ITAM (immunoreceptor tyrosine-based activation motif – DAP10; DAP12; CD3ζ), tandis que les récepteurs inhibiteurs possèdent la séquence ITIM (immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif). La phosphorylation des tyrosines de l'ITAM permet l'activation du récepteur, contrairement à l'ITIM qui agit en signal inhibiteur lorsque ses tyrosines sont déphosphorylées¹⁹². Toutes les cellules NK expriment entre 2 et 9 récepteurs et au minimum 1 récepteur KIR inhibiteur. Les KIR inhibiteurs ont une plus forte affinité avec leur ligand que les KIR activateurs, ce qui explique pourquoi leur effet prédomine sur celui des KIR activateurs.

Un des membres de la superfamille des Lectines de type-C humain est le complexe de gènes des cellules NK, les récepteurs CD94/NKG2. Ils se retrouvent à la surface des cellules NK et sur quelques lymphocytes T¹⁹⁸⁻²⁰⁰. Ces récepteurs sont impliqués dans la reconnaissance du CMH de classe I²⁰¹. Le CD94 est codé par un seul gène, tandis qu'il existe 4 gènes codant pour les molécules NKG2 (NKG2A/B, NKG2C, NKG2E et NKG2D/F)^{201,202}. La molécule CD94 joue le rôle de chaperon en permettant le transport de l'un des membres de la famille NKG2. L'hétérodimère CD94/NKG2A/B est un récepteur inhibiteur possédant la séquence ITIM^{193,194}. Les récepteurs activateurs de la superfamille des Lectines de type-C regroupent l'hétérodimère CD94/NKG2C et CD94/NKG2E. La molécule NKG2D fait également partie des récepteurs activateurs²⁰³, mais contrairement aux autres complexes de gènes, elle ne forme pas de dimère avec le CD94²⁰¹. Il a été démontré que le récepteur inhibiteur CD94/NKG2A

possède une plus forte affinité que le récepteur activateur CD94/NKG2C pour le ligand HLA-E.

Les récepteurs assurant le déclenchement de la cytotoxicité, dite naturelle des cellules NK sont peu connus. Les récepteurs de cytotoxicité naturelle (NCR) ont pour caractéristiques 1) d'être exprimés uniquement sur les cellules NK et 2) d'engager la voie cytotoxique des cellules à la suite à leur activation.

Ce n'est qu'à la fin des années 90 que les trois premiers NCR ont été découverts. Le premier NCR fut identifié par l'équipe de Moretta en 1997¹⁹⁵. Ayant un poids moléculaire de 46 kDa, l'expression du NKp46 est restreinte aux cellules NK. Lorsque le NKp46 est activé, les cellules NK mobilisent leurs canaux calciques (qui jouent un rôle important dans les différentes voies cytotoxiques), initient l'activité cytolytique et déclenchent la production de cytokines. Toutefois, l'engagement et le recrutement de ces différentes voies effectrices ne sont possibles que si les signaux d'activation reçus par la cellule NK, surpassent les signaux inhibiteurs¹⁹⁵. Il a été démontré que le blocage du récepteur NKp46 inhibe partiellement l'activité cytolytique des cellules NK. Ce résultat suggère la fonction de NKp46 est redondante et que ce dernier coopère avec un ou plusieurs autres NCR afin d'optimiser la réponse cytotoxique des cellules NK¹⁹⁵.

À l'instar de NKp46, le NCR NKp44 est uniquement exprimé à la surface membranaire des cellules NK. Cependant, NKp44 est restreint aux cellules NK activées. Il apparaît progressivement lors de l'activation des cellules effectrices et assure l'effet cytotoxique. Lorsque des anticorps monoclonaux sont utilisés contre le NKp44, une inhibition partielle de l'activité cytotoxique est observée. Cependant, lorsque NKp44 et NKp46 sont bloqués simultanément, l'activité cytotoxique est inhibée de moitié. Ces deux molécules agissent en synergie dans le processus de lyse indépendamment du CMH¹⁹⁶ et l'inhibition partielle de l'activité cytotoxique suggère l'existence d'un troisième NCR.

En 1999, un troisième NCR a été identifié par l'équipe de Moretta¹⁹⁷. Avec un poids moléculaire de 30 kDa, ce dernier est exprimé par tous les types de cellules NK qu'elles soient activées ou non, tout comme le NKp46. Le NKp30 coopère avec ses deux homologues (c.-à-d., le NKp46 et/ou le NK44) et induit la cytotoxicité chez les cellules effectrices contre les cellules cibles. De plus, le NKp30 élimine des cellules cibles sur lesquelles, les deux autres récepteurs n'ont aucun effet significatif¹⁹⁷. Tout comme les KIR activateurs, les trois NCR

recrutent une molécule accessoire possèdent un motif ITAM (DAP12) qui assure leur activation.

Ainsi, la cytotoxicité des cellules NK est attribuable aux différents récepteurs activateurs présents à leur surface et appartenant aux trois super-familles de récepteurs. Toutefois, lorsque les récepteurs inhibiteurs reconnaissent et lient leurs ligands spécifiques (le CMH de classe I), les fonctions cytolytiques sont inhibées. Ce mécanisme d'inhibition prévient l'élimination des cellules saines, tout en assurant la reconnaissance des cellules dont le CMH de classe I est aberrant ou tout simplement absent à la suite d'une infection virale ou de la transformation cellulaire. Les cellules NK ont pour effet d'assurer une immunosurveillance contre les cellules tumorales et préviennent donc le développement des cancers.

5.5 Les voies cytotoxiques

Lorsque les signaux activateurs surpassent les signaux inhibiteurs, les fonctions cytolytiques sont activées et conduisent à la mort de la cellule cible. Les cellules NK peuvent induire la mort des cellules cibles par deux principales voies cytotoxiques : 1) via l'induction de l'apoptose médiée par les récepteurs de mort de la cellule cible (FAS et DR4 et DR5) (Tableau V) et 2) via le relargage des granules cytotoxiques et la libération de perforine et de granzyme.

5.5.1 Induction de l'apoptose de la cellule cible via les récepteurs de mort cellulaire

Les cellules NK expriment à leur surface le FAS-L (CD178), une glycoprotéine homotrimérique transmembranaire membre de la famille des récepteurs du facteur de nécrose tumorale (TNF). FAS-L induit la trimérisation du récepteur de mort FAS (glycoprotéine monomérique transmembranaire - aussi connu sous Apo-1 et CD95) exprimé à la surface de certaines cellules cibles. Cette liaison FAS-FAS-L permet l'activation du domaine de mort (FADD, Fas-associated protein death domain) de la partie cytoplasmique de FAS. Ce complexe s'associe ensuite avec la forme inactivée de la caspase-8 (c.-à-d., procaspase-8) et assure son clivage amorçant la cascade protéolytique (c.-à-d., activation de la caspase-3) conduisant à l'apoptose de la cellule cible. Les cellules n'exprimant pas FAS ne peuvent déclencher la cascade protéolytique par l'activation de FAS-L présent sur les cellules NK. Le

blocage du récepteur FAS sur des cellules cibles diminue l'activité cytolytique des cellules NK, sans l'inhiber totalement.

L'apoptose peut être induite par TRAIL, le ligand des récepteurs de mort DR4 et DR5. Membre de la superfamille du facteur de nécrose tumorale, TRAIL est exprimé à la membrane des cellules NK activées. La liaison de TRAIL à son récepteur présent sur la cellule cible soit TRAIL-R1 et TRAIL-R2 (aussi connu sous DR4 et DR5 respectivement) induit l'apoptose des cellules cibles par la cascade des caspases.

Tableau V - Les différents ligands des récepteurs de mort exprimés sur les cellules NK et leurs récepteurs

| Ligands des récepteurs de mort cellulaire | Récepteurs |
|---|------------|
| TRAIL | DR4 – DR5 |
| FAS-L | FAS |

5.5.2 Le relargage des granules cytotoxiques

La liaison de la cellule effectrice à la cellule cible permet la formation d'une synapse immunologique. Le relargage de protéines monomériques de 65 kDa, du nom de perforines, par exocytose des granules à la jonction formée entre les deux cellules assure la création de pores dans la membrane de la cellule cible. Le changement de conformation des perforines est dépendant du calcium (Ca^{2+}). Les pores créés par les perforines jouent ainsi le rôle de porte d'entrée pour des sérines protéases, telles que les granzymes. Une fois dans le cytoplasme, les molécules de granzyme entament le clivage de la procaspase-8, ce qui enclenche la cascade de caspases aboutissant à l'apoptose de la cellule. Chez l'humain, huit granzymes sont à ce jour répertoriés. Les granzymes de type A et B sont les deux sérines protéases les mieux caractérisées. En utilisant des anticorps spécifiques aux granzymes, par coloration intracellulaire, l'équipe de Bratke a pu élucider les différentes composantes granulaires dans les sous-populations de cellules NK. Les cellules NK $CD56^{dim}CD16^{bright}$ expriment fortement les granzymes A et B contrairement aux $CD56^{bright}CD16^{neg/dim}$. La perforine et les granzymes agissent en synergie assurant un effet cytotoxique optimal, mais possèdent des rôles distincts dépendamment de la situation à laquelle le système fait face. Les souris « Knock-Out » pour la

perforine, tout comme les enfants avec une absence congénitale de perforine, ne peuvent survivre aux infections en raison d'un désordre hématologique (c.-à-d., hyper-inflammation du système causée par une production incontrôlée de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IFN- γ et le TNF- α par les monocytes, les lymphocytes T et les cellules NK activées) contrairement aux souris déficientes pour les granzymes. L'activation de la voie de dégranulation est observable par l'expression du récepteur CD107a/b à la surface des cellules NK en réponse à un contact avec des cellules cibles.

5.6 Régulation de la fonction effectrice des cellules NK

La fonction des cellules NK est régulée par la présence dans l'environnement de cytokines (l'IL-2, l'IL-15 et les IFN de type I), mais également la présence de faibles quantités de cellules dendritiques.

5.6.1 Les cytokines régulatrices de la fonction des cellules NK

Comme il a été discuté au préalable au chapitre 2 (Section 2.3), l'IL-2 joue un rôle primordial dans la stimulation du système immunitaire. L'IL-2 stimule la prolifération et la survie des cellules NK et augmente leur activité cytotoxique. Les cellules NK CD56^{bright} et CD56^{dim} expriment le récepteur à l'IL-2 mais répondent différemment à l'IL-2. La population CD56^{bright} exprime le récepteur de haute affinité à l'IL-2 composé de la chaîne IL-2R α (chaîne p55; CD25), IL-2R β (chaîne p75, CD122) et de la chaîne IL-2R γ (chaîne p64; CD132)²⁰⁴; l'IL-2 induit la prolifération et la production de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IFN- γ , par les cellules CD56^{bright}. L'IL-2 induit également une transformation fonctionnelle de la population CD56^{bright} (augmentation de l'expression de leurs KIR, des NCR ainsi que le niveau de perforine¹⁷⁵). Les cellules NK CD56^{dim} expriment seulement les chaînes IL-2R β et IL-2R γ du récepteur à l'IL-2 (récepteur d'affinité intermédiaire) et l'IL-2 induit une faible prolifération de cette population. Toutefois, l'activité cytotoxique des deux populations de cellules NK est augmentée par l'IL-2 à dose moyenne ou forte. Elle permet la maturation des cellules NK CD56^{bright} en amplifiant l'expression des récepteurs activateurs CD16, NKG2D et des NCR à la surface membranaire, ainsi que le niveau de perforine^{94,165,175,178,205-209}.

Les cellules NK expriment le récepteur à l'IL-15 qui est composé des chaînes β et γ , du récepteur à l'IL-2 et d'une chaîne α spécifique à l'IL-15. Tout comme l'IL-2, l'IL-15 augmente l'activité cytotoxique des cellules NK, mais stimule préférentiellement la prolifération des cellules NK CD56^{bright} 209. L'IL-15 joue un rôle important dans l'homéostasie des cellules NK; elle assure la différenciation des cellules CD56^{bright} en cellules NK CD56^{dim}. De plus, cette cytokine favorise la survie des cellules NK en augmentant l'expression des protéines membres de la famille du Bcl-2 (Bcl-x1), ce qui les protège de l'apoptose²¹⁰.

Les interférons de type I stimulent la prolifération des cellules NK, augmentent l'activité cytotoxique des cellules NK^{211,212}, stimulent la production d'IL-15 (par les macrophages)^{213,214}, augmentent le niveau d'expression de TRAIL et de FAS-L^{215, 216} et augmentent la dégranulation face aux cellules cibles²¹⁷.

5.6.2 La régulation des fonctions des cellules NK par les cellules dendritiques

En réponse à une infection virale ou bactérienne, les cellules dendritiques jouent un rôle important dans le déclenchement de la réponse immunitaire innée et adaptative par leur capacité à produire de nombreuses cytokines pro-inflammatoires telles que les interférons de type I ou le TNF- α . De plus, elles produisent des chemokines qui permettent le recrutement des cellules effectrices sur le site de l'infection (c.-à-d., RANTES, MIP-1 β , CXCL10, IL-8) (Tableau VI)²¹⁸. Les cellules NK sont sensibles aux chemokines et cytokines sécrétées par les cellules dendritiques. De façon réciproque, les cellules NK activées permettent la maturation des cellules dendritiques en cellules présentatrices d'antigène²¹². Les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC) sont spécialisées dans la production de grandes quantités d'IFN de type I, en réponse à une stimulation virale. L'IFN- α produit et sécrété par les pDC activées augmente l'expression du marqueur CD69 à la surface des cellules NK. L'interaction entre les pDC et les cellules NK accentue la lyse des cellules cibles, assure la production d'IFN- γ par les cellules effectrices (c.-à-d., Les cellules NK) et augmente la production d'IFN- α des pDC. Une boucle d'activation est enclenchée, engage la maturation des pDC et permet le recrutement de cellules immunitaires au site d'intérêt. Par conséquent, les pDC représentent un outil de choix pour stimuler l'activité cytolytique des cellules NK.

Chapitre 6 : Les cellules dendritiques plasmacytoïdes

6.1 Caractéristiques phénotypiques des cellules dendritiques plasmacytoïdes

Paul Langerhans a fait la découverte de la première cellule dendritique dans les années 1868. Leur morphologie cellulaire semblable aux dendrites observée sur les cellules nerveuses leur a valu l'attribution du nom de cellule dendritique. Par leur reconnaissance des pathogènes les cellules dendritiques jouent un rôle essentiel dans l'initiation des réponses immunitaires innées et adaptatives.

On distingue plusieurs populations de cellules dendritiques selon leurs molécules de surface et leurs fonctions respectives. Les cellules dendritiques myéloïdes (mDC) et les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC) sont les deux principales populations de cellules dendritiques circulant dans le sang périphérique. Les pDC représentent 0.01% à 0.08% des cellules mononuclées du sang périphérique. Ces cellules sont également présentes dans le foie, la moelle osseuse, les ganglions et les amygdales²¹⁹. Elles expriment spécifiquement les marqueurs BDCA2⁺ (CD303) et BDCA4⁺ (CD304), ainsi que CD123 et HLA-DR. Les pDC expriment spécifiquement les récepteurs de type Toll-like, TLR7 et TLR9, dans leur compartiment endosomal²²⁰. En réponse à la stimulation des TLR par des ARN ou ADN viraux ou bactériens, les pDC produisent de grandes quantités d'IFN de type I, ainsi que du TNF- α et des chemokines qui recrutent et activent les effecteurs de la réponse immunitaire (Tableau VI)²²¹. Les pDC produisent de 100 à 1000 fois plus d'IFN de type I²²², que tous les autres types cellulaires, incluant les cellules NK, ainsi que les lymphocytes T et B. Les composantes virales sont détectées par les TLR endosomaux (TLR-7 et TLR-9) qui déclenchent une cascade moléculaire conduisant à la production d'IFN de type I (IFN- α); ceci enclenche la maturation des pDC en cellules présentatrices d'antigènes. On retrouve les pDC dans le sang, les ganglions, les poumons, la rate et la peau.

Tableau VI – Molécules produites et sécrétées par les pDC suite à l'exposition à un virus ou à un agent agoniste synthétique

| Molécules sécrétées par les pDC |
|--|
| Interférons : |
| IFN- α |
| IFN- β |
| IFN- κ |
| IFN- λ |
| IFN- ω |
| Chemokines : |
| CXCL10 |
| MCP-1 (CCL2) |
| MIP-1 α (CCL3) |
| MIP-1 β (CCL4) |
| RANTES (CCL5) |
| IL-8 |
| Cytokines pro-inflammatoires : |
| IL-6 |
| TNF- α |
| Autres : |
| HMGB-1 |
| Osteopontin |
| HBD-1 |

6.2 L'origine des cellules dendritiques plasmacytoïdes

Les pDC se développent à partir des précurseurs d'origine lymphoïde et myéloïde présents dans la moelle osseuse; les pDC sont majoritairement considérés comme étant des

cellules d'origine lymphoïde puisqu'elles expriment des marqueurs associés aux lymphocytes T et B immatures (T-cell receptor alpha et lambda 5)²²³. Plusieurs cytokines contribuent à leur croissance et à leur différenciation dont le facteur de croissance Flt-3L²²⁴⁻²²⁶. Trois stades de différenciation ont été caractérisés dans la moelle osseuse; le stade I est caractérisé par un phénotype CD34⁺⁺CD45^{+/++} représentant les précurseurs des pDC (pré-pDC) les plus immatures; le stade II est une sous-population considérée comme intermédiaire au niveau de la maturité avec un phénotype CD34⁺CD45^{+/++}; au stade III, le pré-pDC les plus matures sont CD34⁻CD45^{++68,227}. De plus, au cours de la maturation des pDC, l'expression des glycoprotéines transmembranaires spécifiques des pDC, BDCA-2 et BDCA-4, augmente graduellement²²⁷. Les pDC acquièrent graduellement leurs fonctions au cours de leur maturation. Les cellules du stade I ont une grande capacité d'endocytose, mais ce n'est qu'à partir du stade III que les cellules ont la capacité de produire de l'IFN- α en réponse à une stimulation²²⁷.

6.3 L'activation des cellules dendritiques plasmacytoïdes

Les pDC reconnaissent les séquences moléculaires associées aux pathogènes (PAMP-pathogen-associated molecular pattern) grâce à des récepteurs membranaires et cytoplasmiques spécifiques. Les récepteurs de type Toll-like (TLR) sont des récepteurs membranaires qui possèdent une région extracellulaire comprenant plusieurs répétitions riches en leucine (c.-à-d., LRR) où s'effectue la liaison du ligand. Les pDC expriment spécifiquement les TLR-7 et -9, localisés dans les endosomes. Le TLR-7 a pour ligand l'ARN viral simple brin, tandis que le TLR-9 reconnaît les séquences dinucléotides non-méthylées CpG associées à l'ADN bactérien et viral. Au niveau cytoplasmique, les pDC expriment des récepteurs de type NLR (NOD-like) et RIG-1 like helicase qui reconnaissent les ARN viraux double brin.

Les pDC expriment de façon constitutive le facteur de transcription IRF-7 (interferon-regulatory transcription factor-7). La voie de signalisation des TLR aboutit à la phosphorylation et l'activation de ce facteur de transcription qui est responsable de la production rapide et en grande quantité d'IFN de type I par les pDC. De plus, la présence de récepteurs à l'IFN sur les pDC est à l'origine d'une boucle autocrine qui amplifie la sécrétion

d'IFN de type I. L'activation des TLR induit également l'activation du facteur de transcription NF- κ B qui induit la production de l'IL-6, de l'IL-8 et du TNF- α .

Les pDC produisent de grandes quantités de cytokines dans les premières 24 heures suivant leur activation, puis, elles se différencient en cellules présentatrices d'antigènes (CPA).

6.4 La maturation en cellules présentatrices d'antigènes

Le changement conformationnel et fonctionnel des pDC est dû à une stimulation autocrine; les cytokines produites en réponse à l'activation des TLR induisent la différenciation des pDC en CPA. Normalement, une pDC non-stimulée possède d'un réticulum endoplasmique volumineux, et a une conformation structurelle ronde et lisse comme un lymphocyte, tout en étant plus large que ce dernier. En réponse à une stimulation, la morphologie cellulaire change et les cellules acquièrent des dendrites. De plus, la maturation des pDC en CPA est caractérisée par une augmentation de l'expression des molécules de co-stimulation des cellules T soit le CD40, le CD54 (ICAM-1), le CD80, le CD86 et HLA-DR²²⁸.

De ce fait, les pDC ont la capacité d'initier et de réguler la réponse anti-virale des lymphocytes T. Une déplétion des pDC affecte le délai de recrutement des lymphocytes T au site de l'infection²²⁹. Les molécules de co-stimulation (CD54, CD80 et CD86) jouent un rôle majeur dans l'activation des cellules T. L'augmentation du CD54 à la surface des pDC activées permet la formation de synapses immunologiques à la suite de la liaison de cette molécule aux récepteurs de co-stimulation LFA-1 présents sur les cellules T. Ce contact physique entre les deux cellules assure une activation optimale des cellules T²³⁰⁻²³³. De plus, une étude menée sur un modèle murin a démontré qu'une déficience au niveau de cette synapse immune ne peut activer les lymphocytes T et qu'une augmentation du nombre d'antigènes présentés à la surface cellulaire par le HLA-DR au niveau de la cellule présentatrice d'antigène ne peut compenser l'activation du lymphocyte²³⁴. Le résultat est le même lorsque l'on diminue à la surface de la CPA, le niveau de CD80 et de CD86²³⁵.

Les pDC matures, tout comme les autres cellules dendritiques, ont la capacité de présenter des antigènes à leur surface. Elles induisent des réponses de type T_H1 ou T_H2 selon leur état de stimulation et le contexte environnant. De plus, il a été récemment démontré que

les pDC ont la capacité de cross-présenter des antigènes viraux pour initier une réponse spécifique des lymphocytes T CD8^{228,236,237}.

Les pDC ont un rôle déterminant à la fois dans le système immunitaire inné et adaptatif. La stimulation des TLR endogènes des pDC permet la production de quantité importante d'IFN de type I (IFN- α), mais également de cytokines pro-inflammatoires (c.-à-d., TNF- α ; IL-6) et des chemokines inflammatoires (c.-à-d., CCL3; CCL4; CXCL10)²¹⁹. En réponse à une stimulation autocrine à l'IFN- α , les pDC produisent spécifiquement les chemokines CXCL10 et CCL2. Ces chemoattractants assurent le recrutement des leucocytes directement au site d'infection. Les cellules NK répondent principalement au CCL4 et les lymphocytes T activés au CXCL10²¹⁹. L'interaction entre les pDC et les cellules NK augmente l'activité cytotoxique des cellules NK, essentielle à la lyse des cellules cibles et assure la maturation des pDC dû à l'enclenchement d'une boucle d'activation par l'IFN- α . La maturation des pDC en cellules présentatrices d'antigènes permet le recrutement des cellules immunitaires à la source tumorale.

Chapitre 7 : Sensibilité des cellules de neuroblastome face aux cellules NK

Le taux de survie des enfants atteints de neuroblastome à haut risque est d'environ 66% après un traitement très agressif⁷⁷. Le protocole thérapeutique actuel inclut de la chimiothérapie, de la radiothérapie, une greffe de cellules souches hématopoïétiques et une immunothérapie à base d'anticorps monoclonal anti-GD2. Malgré tout, environ un tiers des patients rechutent, ce qui indique que des cellules tumorales échappent à ces traitements. De nouvelles stratégies thérapeutiques sont donc nécessaires par les enfants qui ont une maladie réfractaire à ces traitements.

Les cellules NK ont le potentiel de reconnaître et d'éliminer les cellules tumorales. Ces caractéristiques fonctionnelles leur permettent de jouer un rôle déterminant dans le traitement contre les cancers. C'est pourquoi, de nombreuses études s'intéressent à l'immunothérapie basée sur les cellules NK pour vaincre le cancer.

L'équipe de Main²³⁸, au milieu des années 80, fut la première à soulever l'hypothèse que le neuroblastome chez l'homme pourrait être susceptible à une activité cytolytique médiée par les cellules NK. Un fait connu à cette époque était le faible niveau d'expression de HLA de type I à la surface membranaire des cellules de neuroblastome faisant d'elles une cible de choix pour les cellules NK mais une cible réfractaire à la lyse par les lymphocytes T cytotoxiques²³⁸.

En 1989, l'équipe d'Alvarado a étudié l'effet des cellules NK chez trois groupes de patients âgés de 11 mois à 18 ans atteints de diverses tumeurs solides, incluant le neuroblastome, le rhabdomyosarcome, le sarcome ostéogénique, le rétinoblastome, la tumeur de Wilm, le neurofibrosarcome, le sarcome d'Ewing et le mélanome. Cette étude confirmait la susceptibilité du neuroblastome à la lyse par les cellules NK et le potentiel thérapeutique de ces effecteurs à la suite de leur stimulation par des cytokines, comme l'IFN- α et l'IL-2²³⁹. Une autre étude, réalisée par l'équipe de Rossi en 1994, a confirmé que les cellules de neuroblastome sont sensibles à la lyse médiée par les cellules NK activées par des cytokines (IL-2 et IL-12)²⁴⁰.

En 2004, Castriconi et son équipe ont évalué la sensibilité à la lyse médiée par les cellules NK des cellules de neuroblastome fraîchement isolées comparativement à des lignées cellulaires de neuroblastome (c.-à-d., HTLA230, GI-LI-N, SH-SYS4). Les cellules tumorales provenaient de 8 enfants avec un diagnostic de neuroblastome de stade IV, purifiées à partir d'un prélèvement de moelle osseuse. Les résultats obtenus montrent que la sensibilité à la lyse par les cellules NK des tumeurs de patients est variable et plus faible que celle des lignées cellulaires. Ils ont de plus établi le rôle important des NCR tels le NKp46 et le NKp30 dans la lyse des cellules de neuroblastome par les cellules NK¹⁸⁶.

Finalement, il a été démontré que plusieurs lignées cellulaires de neuroblastome sont insensibles à la lyse induite par le TRAIL sous forme soluble²⁴¹⁻²⁴³. Cependant, en 2013 l'équipe de Sheard a établi que les cellules de neuroblastome sont sensibles à la lyse induite par TRAIL lorsque ce ligand est membranaire et exprimé sur les cellules NK activées par l'IL-2 et l'IL-15. Les cellules de neuroblastome expriment à leur surface les récepteurs de mort TRAIL-R1 (DR4) et TRAIL-R2 (DR5) qui, lorsqu'ils sont activés, induisent l'apoptose de la cellule. Cette étude démontre que les voies apoptotiques induites par TRAIL et par la dégranulation jouent un rôle important dans l'élimination des cellules de neuroblastome par les cellules NK activées²⁴⁴.

HYPOTHÈSE ET OBJECTIFS

Hypothèse

Nous posons l'hypothèse que l'effet cytolytique des cellules NK vis-à-vis des cellules de neuroblastome (NB) peut être augmenté par la stimulation des cellules NK par l'IFN- α ou par des cellules dendritiques plasmacytoïdes activées. L'activation des cellules NK permettrait d'éliminer les TIC et, par conséquent, de réduire les risques de rechute tumorale.

Objectifs

Nous proposons de tester *in vitro* l'augmentation de l'activité anti-tumorale des cellules NK en réponse à leur activation par des cellules dendritiques plasmacytoïdes stimulées par un ligand du TLR-9.

Nous comparerons l'activité cytotoxique des cellules NK vis-à-vis les cellules de neuroblastome en l'absence de stimulation, à la suite de leur co-culture avec des cellules dendritiques activées, de leur stimulation par l'IFN- α et en présence d'anticorps anti-GD2 (ADCC). Ces résultats nous permettront de déterminer la meilleure approche thérapeutique permettant d'éradiquer les cellules de neuroblastome, et en particulier les TIC. Ces résultats serviront de base pour l'élaboration de futurs essais cliniques visant à réduire les risques de rechute pour les enfants atteints de neuroblastome à haut risque.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

Matériels et Méthodes

La section Matériels et Méthodes est incluse dans l'article.

Afin de finaliser la publication, une expérience consistant à bloquer l'IFN de type I sur les pDC mis en co-culture avec les cellules NK est en cours. Les tests statistiques seront ensuite appliqués (c.-à-d., Friedman's test with Dunn's post-test).

RÉSULTATS

Résultats

La section Résultats est incluse dans l'article

ARTICLE

Cordeau et al.

TLR9-STIMULATED PLASMACYTOID DENDRITIC CELLS INDUCE STRONG NATURAL KILLER CELL CYTOTOXICITY AGAINST NEUROBLASTOMA

Martine Cordeau*†, Martin Lelaidier*†, Assila Belounis*†, Yasmine Kadri-Madjer*, Sabine Herblot*§, Paulo Cordeiro* and Michel Duval*‡§

From the *Groupe de Recherche En Transplantation et Immunologie du Sang de Cordon (GRETISC), Centre de cancérologie Charles-Bruneau, Centre de recherche du CHU Sainte-Justine; † Département de Microbiologie et d'Immunologie; § Pédiatrie; and ‡ Sciences Biomédicales, Université de Montréal, Québec, Canada.

Keywords: neuroblastoma, immunotherapy, Natural Killer cell, plasmacytoid dendritic cell, tumor-initiating cell, GD2, TRAIL

Running title: Harnessing the immune system to cure childhood neuroblastoma

Correspondence address:

Sabine Herblot

Phone: 514-345-4931 ex: 3910

CHU Sainte-Justine - 3175, Côte Sainte-Catherine, Montréal, Québec, Canada

ABSTRACT

Neuroblastoma (NB) is the second most frequent pediatric cancer after cerebral tumors. Despite recent advances in targeted anti-disialoganglioside (GD2) immunotherapy, about one third of patients with high risk NB still undergo disease progression or relapse. Therapeutic failure has been associated with the presence of NB tumor initiating cells (TIC) as well as GD2 negative cells. Therefore, novel therapeutic strategies need to be highly efficient to eradicate both TIC and GD2 negative NB tumor cells. Harnessing the anti-tumor activity of natural killer (NK) cells against tumor cells is a promising therapeutic avenue that has been first discovered to treat hematological cancers, but that also could be exploited to fight solid tumors. Here we reveal that NB cells, including TIC (CD133⁺ cells) and GD2-negative cells, are highly sensitive to activated NK cell-mediated lysis. Maximal anti-NB activity was obtained following co-culture of peripheral blood NK cells with Toll-like receptor-activated plasmacytoid dendritic cells (pDC). Following activation by pDC, NK cells acquired a unique phenotype and killing properties that are not reproduced by cytokine stimulation alone. In addition, we determined that multiple pathways are involved in NB lysis, including TRAIL mediated apoptosis of targets and release of cytolytic granules via DNAM-1-mediated NK cell activation. Importantly, we observed an additive effect between anti-GD2 antibody-dependent cytotoxicity and pDC-activated NK cell cytotoxicity against NB cell lines. Our results, therefore, demonstrate that pDC-mediated NK cell activation can complement anti-GD2 immunotherapy and overcome the resistance of GD2-negative cells. We propose that the future success of immunotherapy for NB should involve the combination of treatment strategies in a minimal residual disease setting.

INTRODUCTION

Neuroblastoma (NB), a tumor of the autonomic nervous system, is the most frequent extracranial pediatric solid tumor, occurring mostly in children before 5 years of age^{1,2}. Seventy five percent of NB patients older than one year of age present a high-risk metastatic disease³ and despite multimodality therapy, the overall survival at 2 years is only 66%⁴⁻⁷. Therefore, one third of patients with high-risk NB present a relapsed or refractory NB and all of them die from their disease. The therapeutic challenges to cure these patients are the eradication of disialoganglioside (GD2) negative tumor cells that escape current immunotherapy regimen and the elimination of tumor initiating cells (TIC) that are resistant to chemotherapy and responsible for tumor relapse.

The treatment of NB is based on whether the tumor is low, intermediate or high-risk according to the Children Oncology Group's risk-group assignment. For high-risk NB, aggressive therapeutic regimen includes chemotherapy, surgery, external beam radiotherapy, myeloablative chemotherapy followed by autologous hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) and differentiation therapy with 13-cis-retinoic acid. Recently, immunotherapy using specific anti-GD2 monoclonal antibody (mAb), granulocyte/monocyte-colony stimulating factor (GM-CSF) and interleukin-2 (IL-2) post autologous HSCT improved the survival of high-risk NB patients (66% vs 46% overall survival at 2 years)⁷. It has been shown that the efficacy of anti-GD2 immunotherapy depends on complement activation and antibody-mediated cellular cytotoxicity (ADCC) by innate immune cells, primarily natural killers (NK) cells^{8,9}. The major role of NK cells in NB eradication has been demonstrated both *in vitro* and in mouse models of NB¹⁰⁻¹⁴. However, NK cell activation by cytokines or monoclonal antibodies against NB surface antigens were required for NK-cell mediated cytotoxicity against NB tumors. Indeed, the clinical response to anti-GD2 mAb immunotherapy has been recently associated with the presence of a self Killer Immunoglobulin Like Receptors (KIR)-ligand mismatch, demonstrated the role of NK cells in this clinical response¹⁵. Nonetheless, about 33% of high risk NB patients relapse following anti-GD2 immunotherapy revealing the limits of single-target immunotherapeutic approaches. Our recent study of GD2-expression on NB tumors indicated that NB relapse is associated with a low percentage of GD2 positive cells within the primary tumor¹⁶ (manuscript submitted). Therefore, new therapeutic approaches

have to be developed to eradicate GD2-negative tumor cells that escape current immunotherapeutic regimen.

Another therapeutic challenge in NB is the eradication of TIC to prevent tumor relapse. The presence of TIC within the NB has been associated with poor prognosis, metastasis and relapse¹⁷⁻¹⁹. TIC possess functional characteristics of stem cells, such as self-renewal, the ability to differentiate into multiple cell types and spread into multiple metastasis, as well as resistance to chemotherapy²⁰⁻²⁶. TIC are positive for CD133 marker and present different genotyping characteristics as compared to CD133⁻ NB cells²⁷⁻²⁹. Nonetheless, Castriconi *et al.* have shown that CD133⁺ TIC are as sensitive as CD133 negative cells to activated NK cell-mediated cytotoxicity³⁰. Therefore, NK cell based immunotherapeutic approaches might be efficient to kill both differentiated and TIC NB cells upon appropriate activation.

The anti-tumoral activity of NK cells is increased in the presence of cytokines such as interferon alpha (IFN- α), IL-2 and IL-15, but also in the presence of low amounts of activated dendritic cells³¹. In particular, the high amounts of type I IFN produced by plasmacytoid dendritic cells (pDC) make them an attractive tool to initiate NK cell responses against cancer cells^{32,33}. pDC specifically express Toll-like receptors (TLR)-7 and 9 and respond to TLR stimulation by secreting chemokines and cytokines that orchestrate both innate and adaptive immune responses^{31,32}. Several TLR-9 ligands have been developed for immune stimulation against a variety of cancers and are presently tested clinically³⁴. Infusion of activated pDC has also been tested in melanoma patients and demonstrated that activated pDC were able to induce specific T-cell responses³⁵. However, the therapeutic potential of pDC to induce anti-tumor NK cell responses remains to be explored.

In this study, we explored NK cell cytotoxicity against NB tumor cells following NK cell stimulation by TLR9-activated-pDC or IFN- α and compared this killing activity with ADCC mediated by NK cells in presence of anti-GD2 mAb. Cytotoxic assays were performed against NB cells expressing different levels of GD2 and CD133 antigens. We also explored the involvement in NK cell lysis of NB tumors of several cytotoxic mechanisms including TRAIL mediated apoptosis as well as cytotoxic granule release via activating-NK cell receptor binding.

MATERIALS AND METHODS

NB cell lines

NB cell lines SJNB-7 was a gift from Dr. Daniel Sinnett, SK-N-AS and SK-N-DZ were supplied by Dr. Herve Sartelet. SJNB-7 cells were derived from a primary adrenal gland tumor while SK-N-AS and SK-N-DZ cell lines were derived from bone marrow metastasis of children with high-risk NB. All cell lines were cultured in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Wisent Bioproduct, St-Bruno, QC) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) (Wisent Bioproducts, St-Bruno, QC) and 1% antibiotic-antimycotic solution (Invitrogen, Burlington, ON) and in a humidified atmosphere (5% CO₂) at 37 degrees Celsius. Passages were performed when confluency reached 80-90%.

Peripheral blood NK cell and pDC isolation

NK cells and pDCs were isolated from peripheral blood samples from healthy adult volunteers. Blood samples were collected in sodium heparinized tubes (BD Biosciences, Mississauga, ON). Written informed consent was obtained for all participants in accordance with the Declaration of Helsinki after CHU Sainte Justine's institutional review board approval. Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated by gradient centrifugation (Ficoll-Paque Plus, GE Health Care Life Sciences, Pittsburgh, PA). NK cells and pDC were isolated by negative magnetic selection (StemCell Technologies, Vancouver, BC), in accordance with the manufacturer's instructions. The purity of the enriched populations was assessed by flow cytometry and was always above 90%.

NK cell stimulation

Purified NK cells were cultured in RPMI-1640 (Invitrogen, Burlington, ON) supplemented with 10% FBS, at a concentration of 1×10^6 cells/mL, in 96-well round bottom plates for 18-24 hours. NK cells were either unstimulated or stimulated by IL-15 (20ng/mL) (Miltenyi Biotec Inc., Auburn, CA), IFN- α (1000 IU/mL) (Merck, Kirkland, QC) or IL-2 (20

IU/mL) (Novartis Pharmaceuticals Canada, Dorval, QC). For NK/pDC co-cultures, purified NK cells and pDCs were mixed in a ratio of 10:1 and CpG oligodeoxynucleotides (10µg/mL) (ODN 2216, InvivoGen, San Diego, CA) was added. For transwells experiments, NK/pDC co-cultures were performed in 24-well plates using ThinCert insert (Greiner Bio-One, Germany) with 0.4µm pore size. For IFN-α blocking experiments, non-specific binding on NK cells was first blocked by adding 2 µg of mouse IgG2a followed by the addition of mouse anti-human IFN-α/β Receptor chain 2 (20µg/mL) (PBL Assay Science, Piscataway, NJ) into pDC/NK cell co-cultures.

NK cell-mediated cytotoxicity assays

NK cell-mediated cytotoxicity assays were performed by flow cytometry as described previously¹⁶. Briefly, NB cell lines were labeled with CFSE, 10,000 labeled cells were plated per well in 96-well flat bottom plates and, then, incubated overnight to allow cells to adhere. For ADCC experiments, anti-GD2 ch14.18 chimeric monoclonal antibody (1µg/mL) (National Cancer Institute) was added to NB target cells for 30 minutes before the cytotoxic assay. Unstimulated and activated NK cells were incubated with target NB cells at different effector:target (E:T) ratios (1:1; 2.5:1; 5:1; 10:1) in triplicate. After a brief centrifugation to ensure contact between effector and tumor cells, cells were incubated at 37°C for 3 hours. NB cells were then trypsinized and collected; Countbright counting beads and propidium iodide (Invitrogen, Burlington, ON) were added to each sample; viable NB cells were counted by flow cytometry on a BD Fortessa (BD Biosciences, San Jose, CA). For SK-N-DZ cell line, staining with an anti-CD133 conjugated mAb (Miltenyi Biotec, Auburn, CA) was performed before the acquisition. Data analyses were performed using the FlowJo program (Tree Star, Ashland, OR). The percentages of specific cell lysis were calculated using the following formula:

$$\frac{[(\text{Absolute No. of CFSE}^+ \text{ PI cells in control} - \text{Absolute No. of CFSE}^+ \text{ PI cells in sample}) / (\text{Absolute No. of CFSE}^+ \text{ PI cells in control})] \times 100}{1} = \% \text{ of lysis}$$

For blocking experiments using mAb against TRAIL, DNAM1 and NKGD2, non-specific binding on NK cells was first blocked by adding 2 µg of mouse isotype-matched IgG

for 10 min at room temperature, followed by the addition of 20 µg/mL of specific anti-human TRAIL, DNAM-1 (BD Biosciences, Mississauga, ON) or NKG2D (a gift from Amgen, Mississauga, ON) mAbs for 30 min at room temperature before performing cytotoxic assays.

Phenotype analysis of NB cell lines and activated NK cells

The phenotype of SJNB-7, SK-N-AS and SK-N-DZ cell lines was assessed by flow cytometry using the following markers: HLA-ABC-PE (BD Biosciences, San Jose, CA), TRAIL-R1 (DR4, CD261)-APC, TRAIL-R2 (DR5, CD262)-PE (BioLegend, San Diego, CA), CD95 (Fas/Apo-1)-FITC (BD Biosciences, San Jose, CA) and CD178 (FasL, CD95L)-PE (Caltag, Burlington, ON). Dead cells were excluded by 7-AAD staining (BD Pharmingen, Mississauga, ON).

Following overnight stimulation, NK cells were stained with the following antibodies: CD69-FITC, CD95 (FAS)-FITC, CD16-FITC (BD Biosciences, San Jose, CA), CD56-FITC, CD336 (NKp44)-PE (BioLegend, San Diego, CA), CD253 (TRAIL)-PE, CD178 (FasL)-PE, CD314 (NKG2D)-PE, CD16-PE/Cy7 (BD Biosciences, San Jose, CA), CD56-APC, CD335 (NKp46)-Brilliant Violet 421, CD337 (NKp30)-Alexa Fluor 647 (BioLegend, San Diego, CA), and dead cells were excluded using 7-AAD staining. For perforin and granzyme intracellular staining, NK cells were first stained with the CD56-APC antibody, then fixed and permeabilized with Cytoperm/Cytofix (BD Biosciences, San Jose, CA). Perforin-FITC and Granzyme B-PE antibodies (BD Biosciences, San Jose, CA) were then incubated according to manufacturer's instructions. All acquisitions were performed on a FACS Fortessa and data analysis was performed using the FlowJo program.

NK cell-degranulation assay

Degranulation assays were performed as previously described³⁶. Briefly, activated NK cells and target cells were mixed in a 1:1 ratio in the presence of CD107a-PE antibody (BD Biosciences, San Jose, CA) and incubated for 1h at 37°C; then, GolgiStop (BD Biosciences, San Jose, CA) was added at a final concentration of 6µg/mL and incubated for an additional 4

Cordeau et al.

hours at 37°C. When required, NB target cells were first incubated with ch14.18 anti-GD2 mAb (1µg/ml) before the co-culture with NK cells. Surface expression of CD107a expression on NK cells was then assessed after staining with CD56-APC antibody and dead cells were excluded using 7-AAD. NK cells were then analyzed by flow cytometry.

Statistical analysis

Data were compared using the Friedman's test with Dunn's post-test. A value of $p < 0.05$ was considered significant with a confidence interval of 99% (GraphPad Software, San Diego, CA).

RESULTS:**Neuroblastoma cell lines**

Three NB cell lines were investigated differing by their surface expression of GD2 and CD133 surface markers. As shown in Table I, SJNB-7 cells did not express GD2, while 20% of SK-N-AS and 98% SK-N-DZ cells expressed this specific marker. Seventy percent of SK-N-DZ cells express the CD133 surface marker characteristic of the TIC phenotype while SK-N-AS and SJNB7 cells were negative for CD133. These phenotypic profiles reflect the heterogeneity of NB tumors¹⁶.

Table I- Percentage of surface expression surface expression of GD2 and CD133 of three different NB cell lines

| Surface expression | SJNB-7 | SK-N-AS | SK-N-DZ |
|--------------------|--------|---------|---------|
| GD2 | 0% | 20% | 98% |
| CD133 ⁺ | 0% | 0% | 70% |

NK cell anti-NB activity is enhanced by TLR-9-activated pDC

We tested the ability of unstimulated or activated NK cells to kill NB cell lines using *in vitro* cytotoxicity assays. In the absence of NK cell activation, we observed that all three NB cell lines were resistant to NK cell mediated lysis (Figure 1A). Interestingly, co-culture of NK cells with TLR-9-activated pDC significantly increased the cell cytolytic capability towards all three NB cell lines (up to 80% of specific lysis of SK-N-DZ and SK-N-AS cells and up to 60% of specific lysis of SJNB7 cells at a E:T ratio of 10:1). Since activated pDC (a-pDC) secrete high amounts of type I interferons, we compared cytolytic activities of NK cells following IFN- α stimulation with that of NK cells co-cultured with activated-pDC. Stimulation of NK cells with IFN- α increased their cytolytic activity against SK-N-DZ and SK-N-AS NB cell lines, but to a lesser extent than NK cells stimulated by activated-pDC. Of note, the SJNB7 cell line remained resistant to IFN- α stimulated NK cell mediated lysis while these cells were sensitive to NK cell-mediated lysis following pDC/NK co-culture. These results suggest that NK cell stimulation by TLR-9-activated pDC do not only rely on IFN- α secretion by pDC.

Importantly, CD133⁺ SK-N-DZ cells were as sensitive as CD133⁻ cells to NK cell-mediated lysis when NK cells were stimulated by activated pDC (Figure 1B). This result indicates that NK cell-mediated immunotherapy has the potential to eradicate TIC as well as more differentiated NB tumor cells.

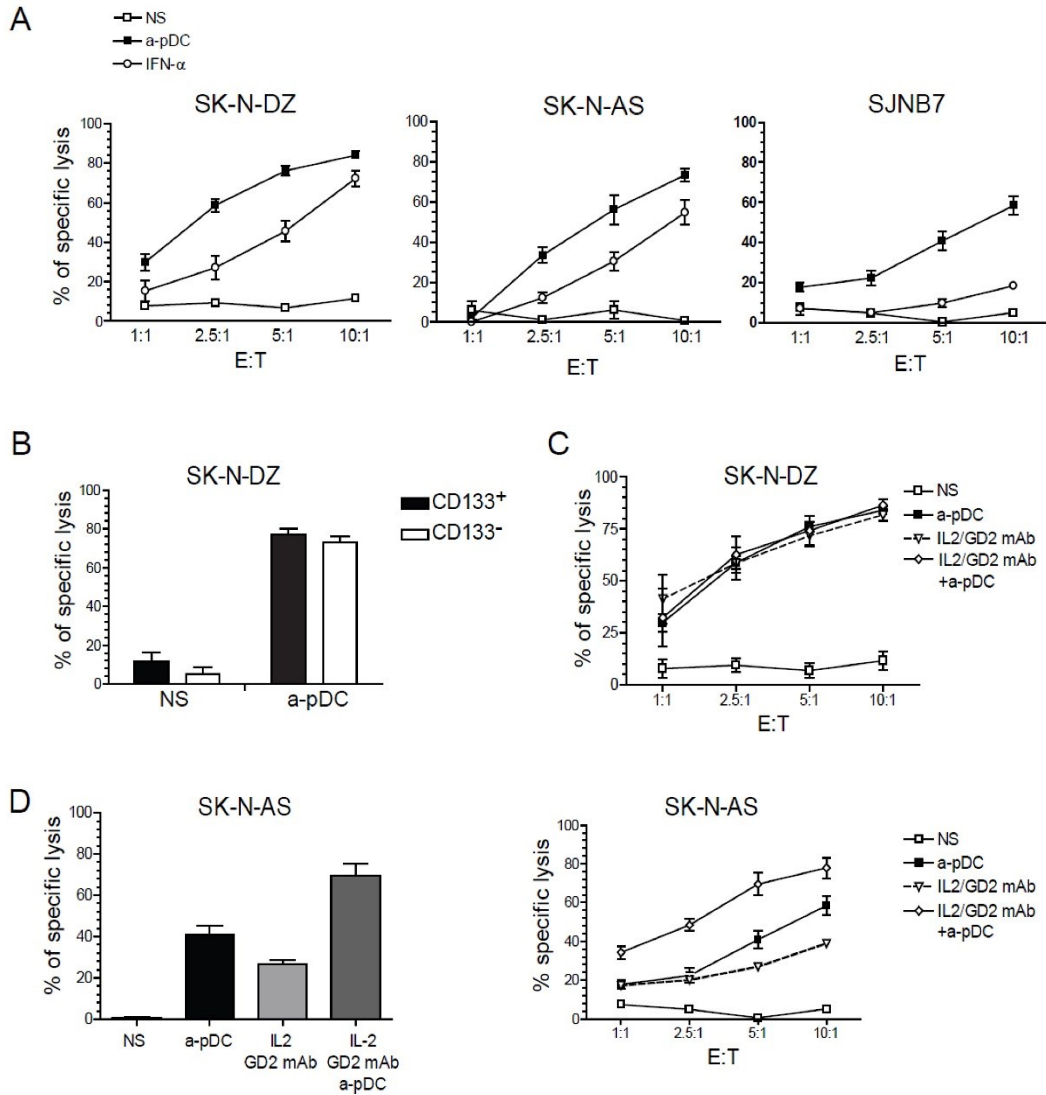
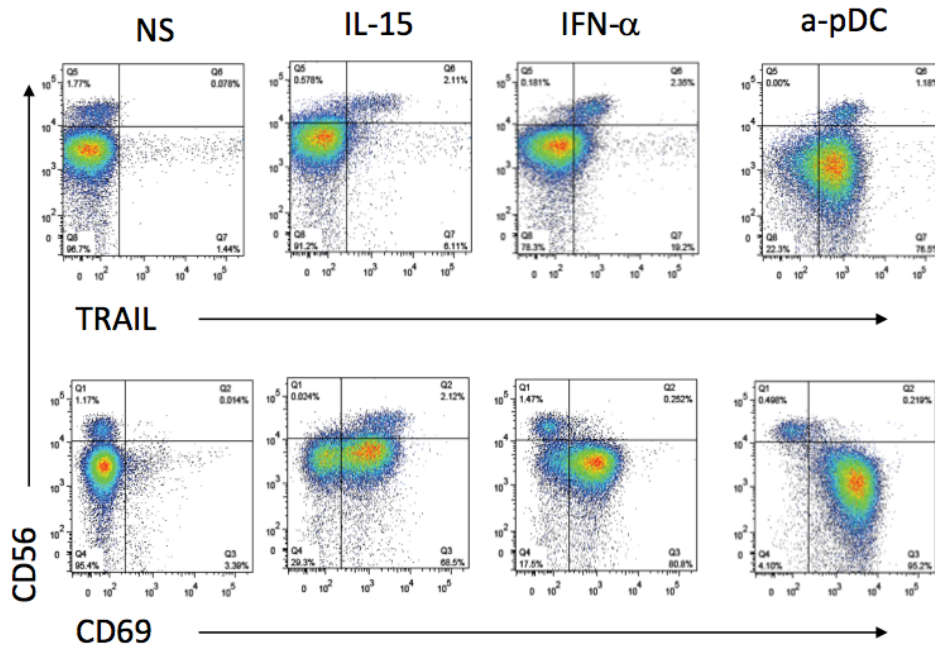


Figure 1: NK cell-mediated lysis of NB cell lines following activation with TLR9-stimulated pDC.

In vitro cytotoxic assays were performed against 3 NB cell lines differing by the expression of CD133 and GD2 (SK-N-DZ: 70% CD133⁺, 98% GD2⁺; SK-N-AS: 0% CD133⁺, 20% GD2⁺; SJNB7: 0% CD133⁺, 0% GD2⁺). NK cells and pDC were purified from peripheral blood samples and NK cells were stimulated with IL-15, IFN- α or TLR9-stimulated pDC (a-pDC) for 18-24h before cytotoxic assays. A – Analysis of NK cell cytotoxicity against SN-N-DZ, SK-N-AS and SJNB7 cells. B – Cytotoxicity of CD133⁺ and CD133⁻ SK-N-DZ cells. C – Comparison of anti-GD2 mediated ADCC with activated NK cell cytotoxicity against SK-N-DZ cells. D – Additive effect of anti-GD2 mAb-mediated and activated NK cell cytotoxicity against SK-N-AS cells. All graphs represent mean of specific lysis of 3-5 experiments with standard error bars.

Stimulation of NK cells by TLR-9-activated pDC can overcome anti-GD2 ADCC resistance

We next compared the killing capacity of pDC-activated NK cells with that of anti-GD2 ADCC mediated by IL-2 stimulated NK cells. With SK-N-DZ cells, which uniformly expressed the GD2 antigen, we observed that pDC-activated NK cells and anti-GD2 ADCC were equally efficient to kill NB tumor cells (Figure 1C). Furthermore, the addition of anti-GD2 mAb on target cells did not increase the anti-tumor efficacy of NK cells activated by pDC. On the opposite, when SK-N-AS cell line was used as target (20% of these cells are GD2⁺), we observed a lower efficacy of anti-GD2 ADCC (30% specific lysis at a 5:1 E:T ratio), while NK cells stimulated by TLR-9-activated pDC achieved a 40% specific lysis at a 5:1 E:T ratio. Interestingly, we observed an additive effect when we combined anti-GD2 and pDC-activated NK cells (up to 70% specific lysis at a 5:1 ratio) (Figure 1D). Therefore, our results suggest that NK cell activation by activated pDC combined with anti-GD2 immunotherapy may be efficient to eradicate both GD2⁺ NB cells as well as anti-GD2 resistant targets in patients with high-risk NB.



Supplement figure S1: NK cells co-cultured with TLR-9-activated pDC up-regulated TRAIL and CD69.

Flow cytometry analysis of NK cell phenotype following overnight stimulation with IL-15, IFN- α or TLR-9-stimulated pDC (a-pDC). Representative dot plots analysis of immune-stainings with anti-CD56, anti-CD69 and anti-TRAIL antibodies (gated on CD3⁻ cells).

TLR-9-activated pDC induced a strong up-regulation of TRAIL as well as IFN- γ production by NK cells

We next investigated the mechanisms involved in NK cell activation by TLR9-activated pDC and whether type I interferons were responsible for the increased anti-tumor activity of NK cells. We first assessed by flow cytometry the phenotype of freshly isolated NK cells stimulated by either TLR-9-activated pDC, IFN- α or IL-15. We observed that co-culture of NK cells with TLR-9-activated pDC induced a strong up-regulation of CD69 expression marker on NK cells (Figure 2A). As assessed by the mean intensity of fluorescence (MFI), the CD69 up-regulation was significantly higher on NK cells co-cultured with TLR-9-activated pDC than the up-regulation obtained with IFN- α or IL-15 stimulation. Of note, all CD56^{dim} NK cells up-regulated CD69 when co-cultured with TLR-9-activated pDC, while only a subset of CD56^{dim} NK cells (30-70% of cells depending on donors) up-regulated CD69 upon overnight IFN- α and IL-15 stimulations (Supplemental Figure S1). On the opposite, we did not observe any up-regulation of natural cytotoxicity receptors (NCR, NKp44, NKp46, NKp30), NKGD2, Granzyme B or Perforin following NK cell stimulation by TLR-9-activated pDC (Figure 2A and Supplemental Figure S2). We also investigated the up-regulation of TRAIL expression following NK cell stimulation and observed that TLR-9-activated pDC triggered the strongest increase of the surface expression of TRAIL as compared with IFN- α and IL-15 stimulation (Figure 2A). Finally, we observed a high production of IFN- γ by NK cells following co-culture with TLR-9-activated pDC while overnight IFN- α stimulation did not induce IFN- γ secretion by NK cells (Figure 2B). Collectively, these results indicate that NK cell activation by TLR-9-activated pDC is distinct from IFN- α or IL-15 stimulations as assessed by different up-regulation of activation markers and IFN- γ production.

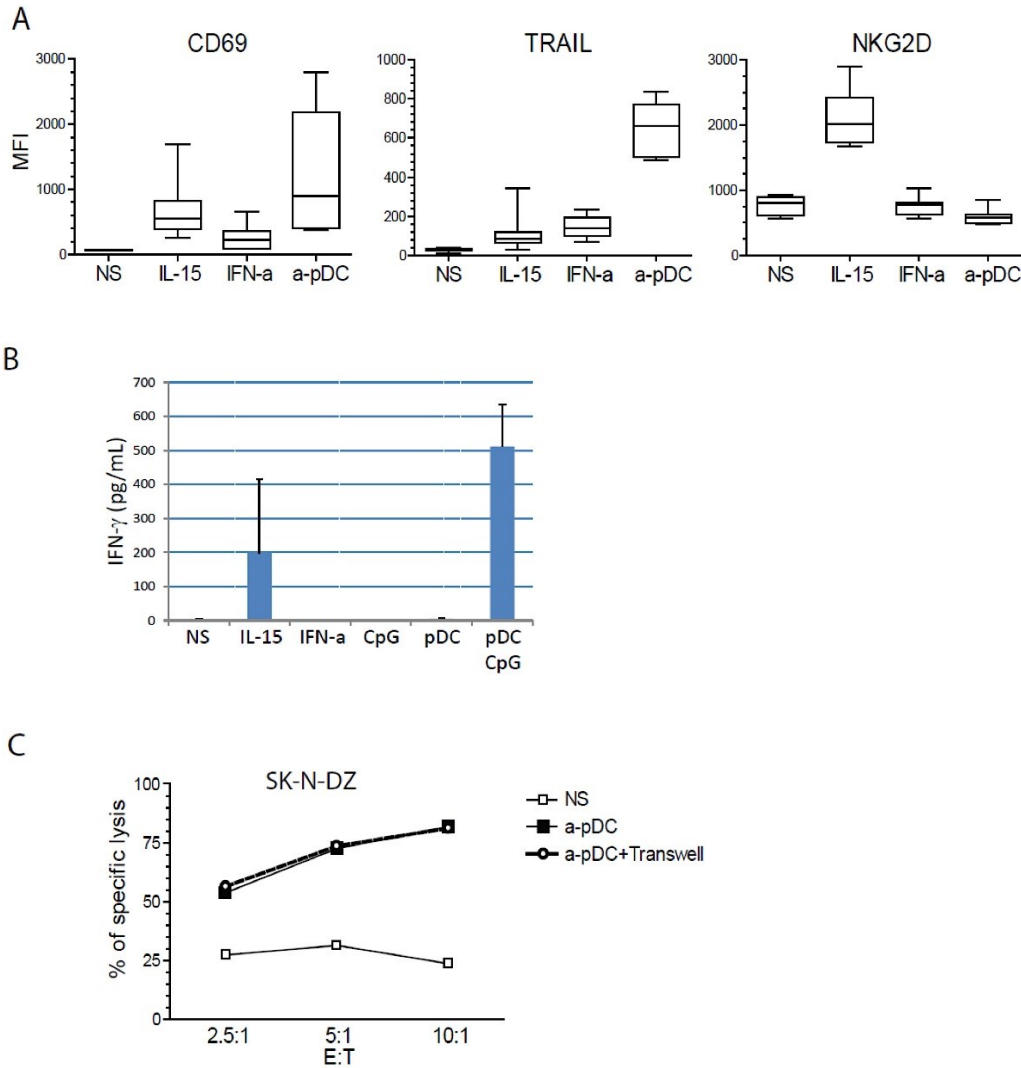


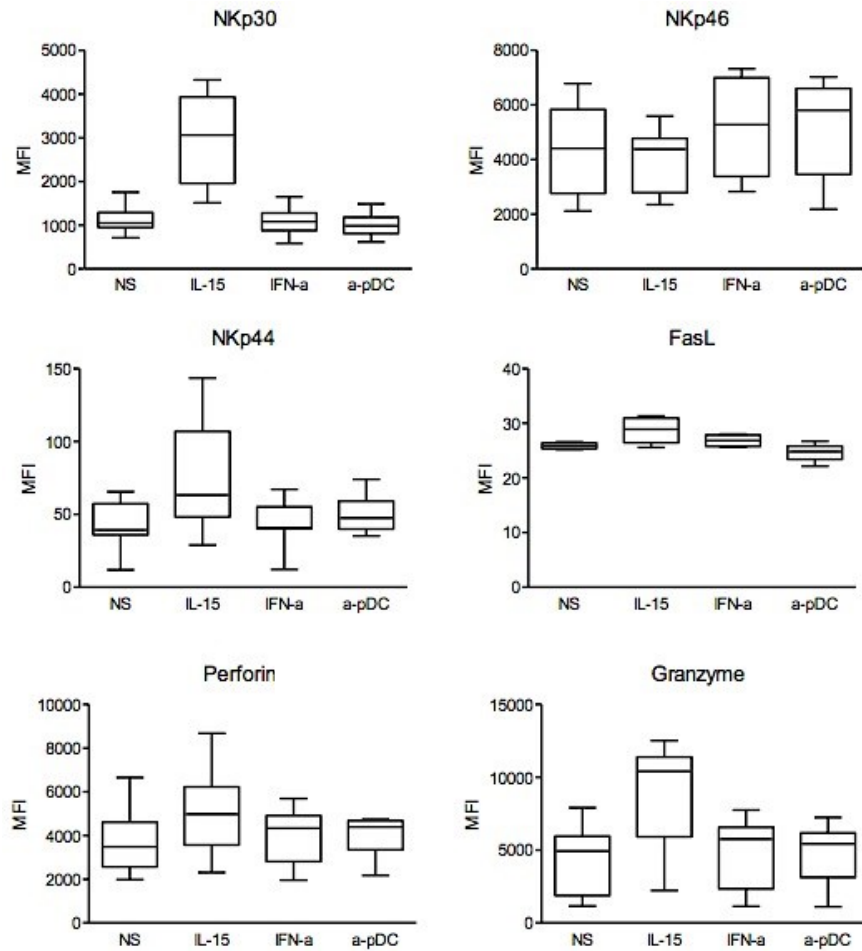
Figure 2: TLR9-stimulated pDC induce CD69 and TRAIL expression on NK cells, as well as IFN- γ production.

A – Phenotype analysis of NK cells following overnight stimulation with IL-15, IFN- α or co-culture with TLR9-stimulated pDC (a-pDC). Box plots represent the distribution of MFI for CD69 and TRAIL immune-staining (first and third quartiles, median and standard error bars) (n=5-10 independent experiments with different donors of NK and pDC cells). B – IFN- γ production was measured by ELISA in the supernatant of NK cell medium following overnight stimulation. Means of 4-6 independent experiments are represented with standard error bars. C – Analysis of NK cell cytotoxicity following NK cell activation with TLR9-stimulated pDC in contact or in transwells. Graphs represent the mean of 3 independent experiments with standard error bars.

NK cell activation by TLR-9-activated pDC is contact independent

Our results raised the question whether soluble factors secreted by activated pDC or cellular contact between NK cells and activated pDC were required to activate NK cell and

increase NK cell-mediated cytotoxicity against NB tumor cells. Using transwell experiments, we observed identical NK cell-mediated lysis against SK-N-DZ cells when NK cells were stimulated in conventional co-culture or without contact (Figure 2C). However, TRAIL and CD69 up-regulations on activated NK cells were significantly lower when NK cells and pDC were not in contact (transwell), indicating that cell contact may favor maximal NK cell activation (Supplemental Figure S3). These results, therefore, indicate that soluble factors, secreted by TLR-9-activated pDC, are mainly responsible for enhanced NK cell-mediated cytotoxicity against NB cell lines and that cellular contact between NK and pDC is not absolutely required for NK cell cytotoxicity against NB cells.



Supplement Figure S2: TLR-9-activated pDC do not induce the up-regulation of natural cytotoxicity receptors, NKGD2, Granzyme B or Perforine on NK cells.

Flow cytometry analysis of NK cell phenotype following overnight stimulation with IL-15, IFN- α or TLR-9-stimulated pDC (a-pDC). Box plots represent the distribution of MFI for indicated surface markers (first and third quartiles, median and standard error bars) (n = 5-10).

NB cell killing is mediated by multiple lysis pathways

Depending on target cells and NK cell activation status, NK cell mediated lysis of tumor cells could be mediated by several lysis pathways, including release of cytotoxic granules in response to activating receptor signaling, and/or death receptor mediated apoptosis³⁷. To investigate what are the lytic pathways involved in NK cell-mediated lysis of NB cells, we, first, investigated the capacity of activated NK cells to release their cytotoxic granules against NB cell lines, using CD107a mobilization assays. We observed that, in the presence of NB cell lines, 20 to 40% of NK cells stimulated by TLR9-activated pDC expressed the CD107a marker. As expected, the percentage of degranulation against anti-GD2 coated target cells was proportional to the percentage of cells expressing GD2 (SK-N-DZ being the most sensitive and SJNB7 the most resistant to anti-GD2 mediated lysis). Interestingly, using SK-N-AS cell line as target, we observed an additive effect of NK cell stimulation by TLR-9-activated pDC and anti-GD2 mediated degranulation leading to up to near 80% of NK cells expressing CD107a (Figure 3). This result is in good agreement with our observation in cytotoxic assays (Figure 1D). We explored the role of DNAM-1 in the release of cytotoxic granules by activated NK cells using blocking antibodies. We observed that blocking the interaction of DNAM-1 with its ligand (PVR or nectin2) reduced the specific lysis by 60% (Figure 4A). Collectively these results indicate that the perforin/granzyme pathway is involved in NB lysis by activated NK cells.

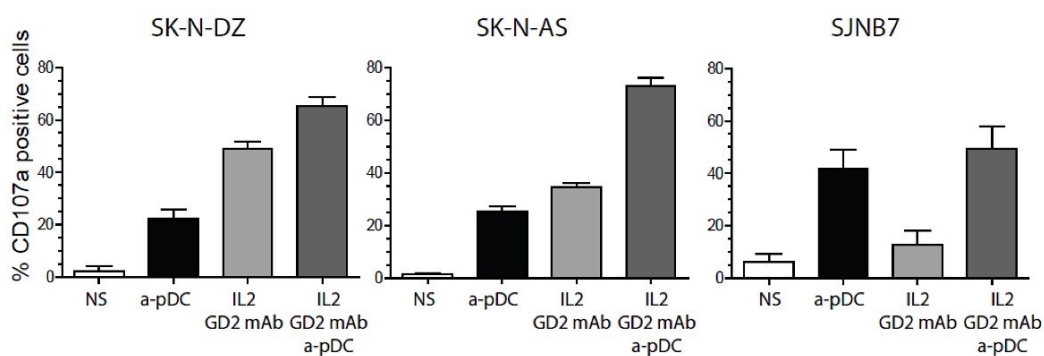


Figure 3: NK cells stimulated with TLR9-activated pDC release cytotoxic granules against NB target cells.

Degranulation assays were performed with overnight-stimulated NK cells with IL-2 or TLR-9-stimulated pDC (a-pDC). CD107a surface expression was analyzed by flow cytometry and graphs represent means of CD107a MFI on NK cells (gated on CD56⁺CD3⁻ cells) with standard error bars (n=3 independent experiments).

Since TLR-9-activated pDC increased TRAIL expression on NK cells, we next investigated whether TRAIL-death receptor interaction play a role in NB lysis. Using a specific anti-TRAIL blocking antibody, we observed that activated NK cell-mediated specific lysis is reduced by 50%. In addition, the inhibition of NK cell mediated cytotoxicity mediated by the anti-TRAIL blocking antibody was directly correlated with the level of expression of TRAIL-R2 (DR5); indeed, DR5 expression was highest in SJNB7 cell line and we observed a near complete inhibition of cytotoxicity using blocking anti-TRAIL antibody (Figure 4). Since NB cell line did not express FAS (Figure 4), the role of FAS-induced apoptosis in activated NK cell cytotoxicity was not further investigated.

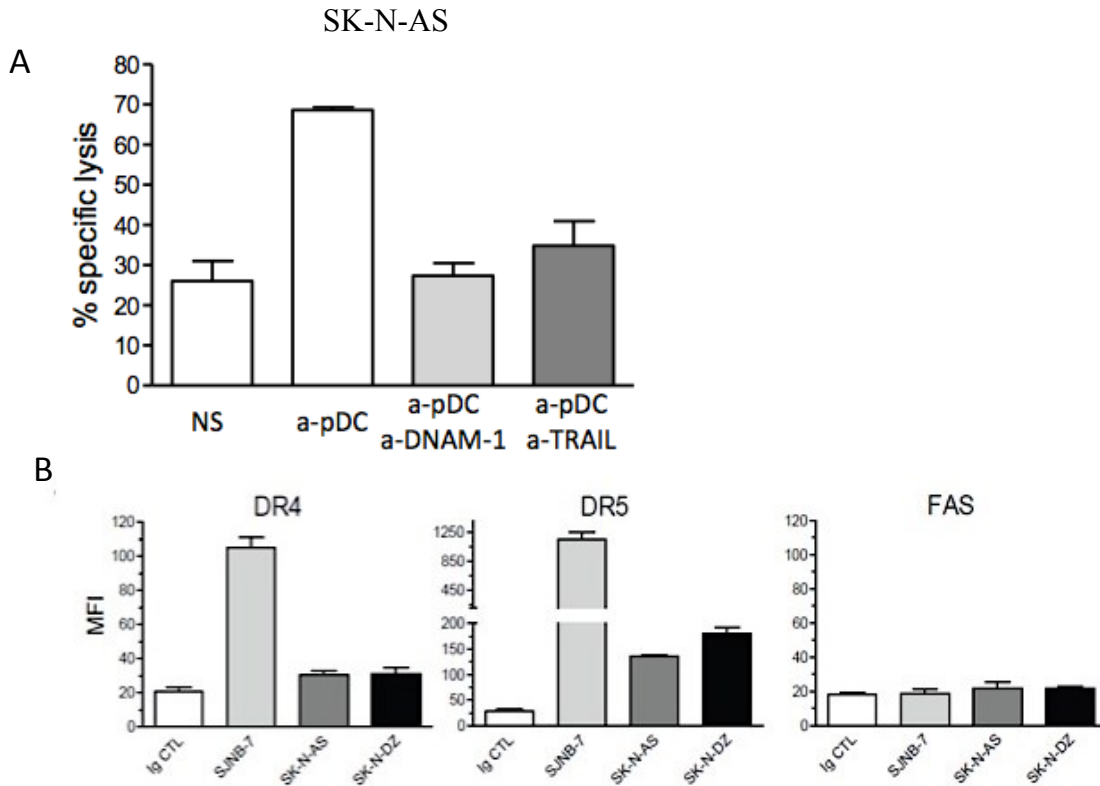
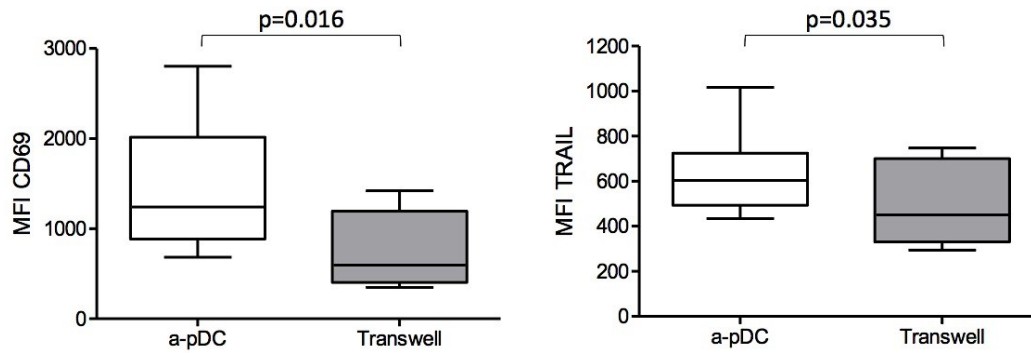


Figure 4: Multiple lytic pathways are involved in NB cell lysis by activated NK cells.

A – Cytotoxic assays were performed in presence or in absence of blocking antibody against DNAM-1 or TRAIL following overnight stimulation with TLR-9-stimulated pDC (a-pDC). Graphs represent mean of 2 independent experiments. B – Phenotypic analysis of SK-N-DZ, SK-N-AS and SJNB7 cell lines for indicated surface antigens. Graphs represent means of MFI (n=3) with standard error bars.



Supplement Figure S3: Contact between NK cell and pDC induced stronger CD69 and TRAIL up-regulation on activated NK cell.

Analysis of NK cell phenotype following NK cell activation with TLR9-stimulated pDC (a-pDC) in contact or in transwells (n = 4-6).

DISCUSSION

Our study reveals that NB cell killing by NK cells requires activation of NK cells and, that high NK cell cytolytic activity is obtained by co-culture of NK cells with TLR-9-activated pDC. We further show that both CD133⁺ TIC and GD2-negative NB cells are sensitive to NK cell-mediated lysis indicating that NK cell-based immunotherapy may be efficient to cure chemotherapy-resistant patients as well as patients relapsing following anti-GD2 targeted immunotherapy.

Current protocols for high-risk NB patients include chemotherapy, surgery and radiotherapy, followed by hematopoietic stem cell rescue and finally anti-GD2 immunotherapy to eliminate residual disease. While this regimen has significantly improved the outcome of high-risk NB patients, one third of them still relapse and die from their disease⁷. Tumor relapse has been attributed to the presence of TIC that are responsible for long-term maintenance of tumor growth due to their self-renewal property as well as their low proliferative capacity^{17,18,28,29}. As a consequence, TIC are resistant to chemotherapy and play a major role in tumor progression, metastasis and relapse. Several reports indicate that TIC are present within the CD133⁺ subset of tumor cells, making this marker relevant to study the response of TIC novel therapeutic strategies. According to previous results on medulloblastoma cell lines³⁰, we demonstrate that CD133⁺ NB cells are as sensitive as CD133⁻ NB cells to activate NK cell-mediated lysis. Therefore, NK cell-based immunotherapy will be able to eradicate both TIC and more differentiated tumor cells and therefore will decrease the risk of relapse for children with high-risk NB. Importantly, immunotherapeutic strategies have a greater chance of succeeding in patients with a low tumor burden, probably because of the higher effector to target cell ratio^{38,39}. Therefore, the most favorable therapeutic window for immunotherapy is post-HSCT, when the tumor load has been reduced by the aggressive chemotherapy of the conditioning regimen. We and others have shown that NK cells are the first immune effectors that appear following HSCT, being present in the blood as early as one month post-HSCT^{40,41}. We demonstrate here that NK cells need activation to fulfill their anti-tumor function against NB and that the best cytotoxic activity is obtained following stimulation by activated pDC. Indeed, NK cell activation by pDC induces highest up-regulation of CD69 and TRAIL, as well as highest cytotoxicity as compared to cytokine

stimulation. The combination of cytokine and chemokine production by activated pDC may be responsible for enhanced cytolytic functions of NK cells, while the detailed molecular mechanisms remain to be determined^{42,43}.

We also reveal in the present study that NK cells stimulated by TLR-9-activated pDC can efficiently kill GD2-negative NB cells, indicating that adequate stimulation of NK cells can bypass the resistance to mAb anti-GD2 mediated immunotherapy. We previously showed using anti-GD2 immune-staining of NB tumor samples that low expression GD2 within the tumor may be one of the causes of therapeutic failure in patients receiving anti-GD2 immunotherapy¹⁶. We show here that a GD2-negative NB cell line (SJNB7) is efficiently killed by pDC-activated NK cells. In addition, we observed an additive effect between anti-GD2 mediated ADCC and NK cell mediated lysis using SK-N-AS cell line (20% GD2⁺) when NK cells were stimulated by activated pDC. Therefore, NK cell stimulation by activated pDC and anti-GD2 immunotherapy appear complementary and, together, may reduce the risk of tumor relapse in patients with low frequency of GD2 positive tumor cells. It has been shown that anti-GD2-mediated ADCC needs the concomitant stimulation of immune effectors, i.e. NK cells and granulocytes by IL-2 and GM-CSF respectively, to be efficient against NB tumor cells⁴⁴⁻⁴⁶. In addition, recent reports have shown that KIR/HLA mismatch between NK and NB cells is required for ADCC to be effective⁴⁷, indicating that NK cell inhibitory signals have to be decreased to get NK cell anti-tumor functions against NB. These results demonstrate that NK cell activation is a pre-requisite for NB killing activity against NB. We show that TLR-9-activated pDC may be an alternative to IL-2 and GM-CSF administration that can, in addition, circumvent KIR/HLA mismatch constraint. Taken together, these results indicate that pDC are promising tools to initiate NK cell mediated anti-tumor responses following HSCT in high-risk NB patients. Recent advances in the development of clinical grade TLR ligands will make possible the targeted stimulation of pDC to get increase NK cell-mediated tumor lysis³⁴. In addition, human pDC can also be produced by *in vitro* differentiation of hematopoietic stem cell progenitors and adoptively transfer in patients after short *in vitro* activation with TLR ligands. We have in hands such a method offering the opportunity to produce human pDC from purified cord blood CD34⁺ cells⁴⁸. These *in vitro*

differentiated pDC were as efficient as autologous pDC isolated from peripheral blood to induce NK cell anti-tumor activity.

In summary, our results pave the way for future pre-clinical and clinical studies of immunotherapeutic strategies combining anti-GD2 mAb and pDC-mediated activation of NK cells. This combination should be highly efficient to eradicate both TIC and GD2 negative NB cells and therefore increase the cure rate of high-risk NB patients.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the Charles-Bruneau Foundation, FRQS (Fond de recherche du Québec en Santé), CHU Sainte-Justine Foundation and the Fondation des Étoiles.

The authors thank Dr. Elie Haddad, Dr. Pierre Terra and Dr. Herve Sartelet for critical reading of this manuscript and helpful comments. The authors thank research nurses Yves-Line Delva, Caroline Tra, Catherine Desjean, Christine de Castelbajac and Marie St-Jacques, as well as Lubomir Alexandrov for sharing his expertise in the statistical analysis.

Declaration of interest: The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of the paper.

Abbreviations: ADCC: antibody-dependent cellular cytotoxicity; E:T: effector against target; HSCT: hematopoietic stem cells transplantation; GD2: disialoganglioside; GvT: graft versus tumor; IFN: interferon; KIR: killer immunoglobulin like receptor; NB: neuroblastoma; NK: natural killer cell; PBMC: peripheral blood mononuclear cells; pDC: plasmacytoid dendritic cell; TLR: Toll-like receptor; TNF: tumor necrosis factor

REFERENCES:

- 1 Brodeur, G. M. *et al.* Revisions of the international criteria for neuroblastoma diagnosis, staging, and response to treatment. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 11, 1466-1477 (1993).
- 2 Maris, J. M., Hogarty, M. D., Bagatell, R. & Cohn, S. L. Neuroblastoma. *Lancet* 369, 2106-2120, doi:10.1016/S0140-6736(07)60983-0 (2007).
- 3 Maris, J. M. Recent advances in neuroblastoma. *The New England journal of medicine* 362, 2202-2211, doi:10.1056/NEJMra0804577 (2010).
- 4 Ladenstein, R. *et al.* Multivariate analysis of risk factors in stage 4 neuroblastoma patients over the age of one year treated with megatherapy and stem-cell transplantation: a report from the European Bone Marrow Transplantation Solid Tumor Registry. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 16, 953-965 (1998).
- 5 Brodeur, G. M. Neuroblastoma: biological insights into a clinical enigma. *Nature reviews. Cancer* 3, 203-216, doi:10.1038/nrc1014 (2003).
- 6 Wagner, L. M. & Danks, M. K. New therapeutic targets for the treatment of high-risk neuroblastoma. *Journal of cellular biochemistry* 107, 46-57, doi:10.1002/jcb.22094 (2009).
- 7 Yu, A. L. *et al.* Anti-GD2 antibody with GM-CSF, interleukin-2, and isotretinoin for neuroblastoma. *The New England journal of medicine* 363, 1324-1334, doi:10.1056/NEJMoa0911123 (2010).
- 8 Barker, E. *et al.* Effect of a chimeric anti-ganglioside GD2 antibody on cell-mediated lysis of human neuroblastoma cells. *Cancer research* 51, 144-149 (1991).
- 9 Zeng, Y. *et al.* Anti-neuroblastoma effect of ch14.18 antibody produced in CHO cells is mediated by NK-cells in mice. *Molecular immunology* 42, 1311-1319, doi:10.1016/j.molimm.2004.12.018 (2005).
- 10 Lode, H. N. *et al.* Natural killer cell-mediated eradication of neuroblastoma metastases to bone marrow by targeted interleukin-2 therapy. *Blood* 91, 1706-1715 (1998).
- 11 Neal, Z. C. *et al.* Enhanced activity of hu14.18-IL2 immunocytokine against murine NXS2 neuroblastoma when combined with interleukin 2 therapy. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 10, 4839-4847, doi:10.1158/1078-0432.CCR-03-0799 (2004).
- 12 Alvarado, C. S. *et al.* Natural killer cells in children with malignant solid tumors. Effect of recombinant interferon-alpha and interleukin-2 on natural killer cell function against tumor cell lines. *Cancer* 63, 83-89 (1989).
- 13 Castriconi, R. *et al.* Human NK cell infusions prolong survival of metastatic human neuroblastoma-bearing NOD/scid mice. *Cancer immunology, immunotherapy : CII* 56, 1733-1742, doi:10.1007/s00262-007-0317-0 (2007).
- 14 Cho, D. *et al.* Cytotoxicity of activated natural killer cells against pediatric solid tumors. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 16, 3901-3909, doi:10.1158/1078-0432.CCR-10-0735 (2010).
- 15 Delgado, D. C. *et al.* Genotypes of NK cell KIR receptors, their ligands, and Fcγ receptors in the response of neuroblastoma patients to Hu14.18-IL2 immunotherapy. *Cancer research* 70, 9554-9561, doi:10.1158/0008-5472.CAN-10-2211 (2010).

- 16 Terzic, T. *et al.* Expression of Disialoganglioside GD2 in neuroblastic tumors: a prognostic value for patients undergoing anti-GD2 immunotherapy (2014).
- 17 Sartelet, H. *et al.* CD133 expression is associated with poor outcome in neuroblastoma via chemoresistance mediated by the AKT pathway. *Histopathology* 60, 1144-1155, doi:10.1111/j.1365-2559.2012.04191.x (2012).
- 18 Tong, Q. S. *et al.* Expression and clinical significance of stem cell marker CD133 in human neuroblastoma. *World journal of pediatrics : WJP* 4, 58-62, doi:10.1007/s12519-008-0012-z (2008).
- 19 Hansford, L. M. *et al.* Neuroblastoma cells isolated from bone marrow metastases contain a naturally enriched tumor-initiating cell. *Cancer research* 67, 11234-11243, doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-0718 (2007).
- 20 Reya, T., Morrison, S. J., Clarke, M. F. & Weissman, I. L. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* 414, 105-111, doi:10.1038/35102167 (2001).
- 21 Tan, B. T., Park, C. Y., Ailles, L. E. & Weissman, I. L. The cancer stem cell hypothesis: a work in progress. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 86, 1203-1207, doi:10.1038/labinvest.3700488 (2006).
- 22 Hirschmann-Jax, C. *et al.* A distinct "side population" of cells with high drug efflux capacity in human tumor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 14228-14233, doi:10.1073/pnas.04000671010400067101 [pii] (2004).
- 23 Mahller, Y. Y. *et al.* Neuroblastoma cell lines contain pluripotent tumor initiating cells that are susceptible to a targeted oncolytic virus. *PLoS One* 4, e4235 (2009).
- 24 Zhang, L. *et al.* In vivo antitumor and antimetastatic activity of sunitinib in preclinical neuroblastoma mouse model. *Neoplasia* 11, 426-435 (2009).
- 25 Khalil, M. A. *et al.* Neuroblastoma stem cells - mechanisms of chemoresistance and histone deacetylase inhibitors. *Neoplasma* 59, 737-746, doi:10.4149/neo_2012_093 (2012).
- 26 Liu, G. *et al.* Analysis of gene expression and chemoresistance of CD133+ cancer stem cells in glioblastoma. *Molecular cancer* 5, 67, doi:10.1186/1476-4598-5-67 (2006).
- 27 Coulon, A. *et al.* Functional sphere profiling reveals the complexity of neuroblastoma tumor-initiating cell model. *Neoplasia* 13, 991-1004 (2011).
- 28 Friedman, G. K. & Gillespie, G. Y. Cancer Stem Cells and Pediatric Solid Tumors. *Cancers* 3, 298-318, doi:10.3390/cancers3010298 (2011).
- 29 Cournoyer, S. *et al.* Genotype analysis of tumor-initiating cells expressing CD133 in neuroblastoma. *Genes, chromosomes & cancer* 51, 792-804, doi:10.1002/gcc.21964 (2012).
- 30 Castriconi, R. *et al.* Both CD133+ and CD133- medulloblastoma cell lines express ligands for triggering NK receptors and are susceptible to NK-mediated cytotoxicity. *European journal of immunology* 37, 3190-3196, doi:10.1002/eji.200737546 (2007).
- 31 Gerosa, F. *et al.* The reciprocal interaction of NK cells with plasmacytoid or myeloid dendritic cells profoundly affects innate resistance functions. *J Immunol* 174, 727-734 (2005).
- 32 Lande, R. & Gilliet, M. Plasmacytoid dendritic cells: key players in the initiation and regulation of immune responses. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1183, 89-103, doi:10.1111/j.1749-6632.2009.05152.x (2010).
- 33 Liu, Y. J., Kanzler, H., Soumelis, V. & Gilliet, M. Dendritic cell lineage, plasticity and cross-regulation. *Nature immunology* 2, 585-589, doi:10.1038/89726 (2001).

- 34 Aranda, F. *et al.* Trial Watch: Toll-like receptor agonists in oncological indications. *Oncoimmunology* 3, e29179, doi:10.4161/onci.29179 (2014).
- 35 Tel, J. *et al.* Natural human plasmacytoid dendritic cells induce antigen-specific T-cell responses in melanoma patients. *Cancer research* 73, 1063-1075, doi:10.1158/0008-5472.CAN-12-2583 (2013).
- 36 Alter, G., Malenfant, J. M. & Altfeld, M. CD107a as a functional marker for the identification of natural killer cell activity. *Journal of immunological methods* 294, 15-22, doi:10.1016/j.jim.2004.08.008 (2004).
- 37 Trinchieri, G. Biology of natural killer cells. *Advances in immunology* 47, 187-376 (1989).
- 38 Parmar, S., Fernandez-Vina, M. & de Lima, M. Novel transplant strategies for generating graft-versus-leukemia effect in acute myeloid leukemia. *Curr Opin Hematol* 18, 98-104, doi:10.1097/MOH.0b013e328343b858 (2011).
- 39 Pulsipher, M. A., Bader, P., Klingebiel, T. & Cooper, L. J. Allogeneic transplantation for pediatric acute lymphoblastic leukemia: the emerging role of peritransplantation minimal residual disease/chimerism monitoring and novel chemotherapeutic, molecular, and immune approaches aimed at preventing relapse. *Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation* 15, 62-71, doi:10.1016/j.bbmt.2008.11.009 (2009).
- 40 Charrier, E. *et al.* Reconstitution of maturing and regulatory lymphocyte subsets after cord blood and BMT in children. *Bone marrow transplantation* 48, 376-382, doi:10.1038/bmt.2012.176 (2013).
- 41 Renard, C. *et al.* Lymphocyte subset reconstitution after unrelated cord blood or bone marrow transplantation in children. *British journal of haematology* 152, 322-330, doi:10.1111/j.1365-2141.2010.08409.x (2011).
- 42 Benlahrech, A. *et al.* Human NK Cell Up-regulation of CD69, HLA-DR, Interferon gamma Secretion and Cytotoxic Activity by Plasmacytoid Dendritic Cells is Regulated through Overlapping but Different Pathways. *Sensors (Basel)* 9, 386-403, doi:10.3390/s90100386 (2009).
- 43 Gerosa, F. *et al.* Reciprocal activating interaction between natural killer cells and dendritic cells. *The Journal of experimental medicine* 195, 327-333 (2002).
- 44 Munn, D. H. & Cheung, N. K. Interleukin-2 enhancement of monoclonal antibody-mediated cellular cytotoxicity against human melanoma. *Cancer research* 47, 6600-6605 (1987).
- 45 Hank, J. A. *et al.* Augmentation of antibody dependent cell mediated cytotoxicity following in vivo therapy with recombinant interleukin 2. *Cancer research* 50, 5234-5239 (1990).
- 46 Barker, E. & Reisfeld, R. A. A mechanism for neutrophil-mediated lysis of human neuroblastoma cells. *Cancer research* 53, 362-367 (1993).
- 47 Venstrom, J. M. *et al.* KIR and HLA genotypes are associated with disease progression and survival following autologous hematopoietic stem cell transplantation for high-risk neuroblastoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 15, 7330-7334, doi:10.1158/1078-0432.CCR-09-1720 (2009).
- 48 Charrier, E. *et al.* Impaired Interferon-Alpha Production by Plasmacytoid Dendritic Cells after Cord Blood Transplantation in Children: Implication for Post-

Cordeau et al.

transplantation Toll-Like Receptor Ligand-Based Immunotherapy. *Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation*, doi:10.1016/j.bbmt.2014.06.007 (2014).

CONCLUSION

Conclusion

En conclusion, le neuroblastome est la tumeur solide infantile la plus commune après les tumeurs cérébrales. Les neuroblastomes à risque élevé représentent 35% des diagnostics et les probabilités de survie sans rechute sont d'environ 66% à 2 ans. Les rechutes sont dues à la présence de TICs peu sensibles à la chimiothérapie et à la présence de cellules tumorales résistant à l'immunothérapie ciblée anti-GD2^{112,114,245}. Dans ce contexte, notre projet de recherche avait pour objectif d'explorer une nouvelle stratégie thérapeutique, basée sur l'activation des cellules NK. Nous avons vérifié que cette approche permet de surmonter la résistance des TIC et des cellules GD2-négatives.

Nous avons démontré que la co-culture des cellules NK avec des pDC stimulées par le CpG permet d'augmenter significativement leur activité cytotoxique vis-à-vis des cellules de neuroblastome. Suite à l'utilisation d'un *transwell*, nous avons observé que l'effet des pDC sur les cellules NK est médié par un facteur soluble. Toutefois, un contact entre ces deux types cellulaires permet une activation maximale de la cellule NK. Afin d'identifier le facteur soluble responsable de l'activation des cellules NK, une expérience est en cours consistant à bloquer l'IFN de type I (incluant l'IFN- α et β), produite en grande quantité par les pDC activées. Si l'IFN de type I ne s'avère pas concluant, le blocage de la cytokine pro-inflammatoire TNF- α serait une voie à explorer. Nous avons démontré que les cellules CD133⁺ (TIC) sont aussi sensibles que les cellules CD133⁻ à l'activité cytotoxique des cellules NK activées par les pDC, ce qui indique que l'immunothérapie basé sur les cellules NK activées a le potentiel d'éliminer les TIC. Les cellules de neuroblastome exprimant le marqueur GD2 à leur surface sont aussi efficacement lysées par ADCC médiée par l'anticorps monoclonal anti-GD2 que par les cellules NK activées par les pDC. En revanche, les cellules GD2⁻ échappent à l'ADCC médiée par l'anticorps anti-GD2, mais elles sont très sensibles à l'activité cytotoxique des cellules NK activée par les pDC. De plus, nous avons démontré un effet additif entre l'ADCC médiée par l'anticorps anti-GD2 et les cellules NK activées par les pDC vis-à-vis de la lignée SK-N-AS qui est constituée de 20% de cellules GD2⁺. Ces résultats permettent donc de formuler l'hypothèse que notre approche thérapeutique pourrait être complémentaire à l'immunothérapie basée sur l'anticorps monoclonal anti-GD2 et réduire les rechutes de neuroblastome à haut risque.

La stimulation des cellules NK par les pDC pourrait être utilisée très tôt après la greffe de cellules souches hématopoïétiques, lorsque la maladie résiduelle est la plus faible. En effet, le nombre et la fonction des cellules NK se reconstituent très rapidement après la greffe. En revanche, la reconstitution des pDC est plus lente après greffe de moelle, ce qui exclue la stimulation des pDC avec des ligands des TLR après la greffe. Pour pallier à cet inconvénient, le laboratoire a développé une nouvelle méthode de culture et de différenciation des cellules CD34⁺ de sang de cordon qui permet d'obtenir de grandes quantités de pDC. Ces pDC peuvent être activées *in vitro* et infusées aux patients pour obtenir une stimulation des cellules NK. Les travaux du laboratoire ont également montré que les pDC différenciées à partir des cellules CD34⁺ ou les pDC isolées du sang périphérique possèdent les mêmes propriétés de stimulation des cellules NK (Lelaidier et al., en préparation). Par ailleurs, nous avons fait la démonstration que le contact entre les cellules NK et les pDC n'est pas nécessaire pour assurer la lyse des cellules de neuroblastome. L'indépendance de contact suggère qu'une ou plusieurs molécules produites et sécrétées dans le milieu par les pDC activées augmentent l'effet cytotoxique des cellules NK contre le neuroblastome. Les interférons de type I, qui sont produits en grande quantité par les pDC activées, pourraient participer à cette stimulation mais ne sont pas les seuls responsables. Il serait donc important de déterminer quelles sont les cytokines ou chémokines produites par les pDC qui sont à l'origine de la stimulation des cellules NK. Une injection d'un cocktail de molécules pour activer les cellules NK simplifierait la thérapie chez les patients.

Nos résultats obtenus *in vitro* sur des lignées cellulaires de neuroblastome permettent de proposer une étude préclinique sur un modèle murin de neuroblastome. Les souris immuno-déficientes *Nod/scid/γc^{-/-}* (NSG) seront utilisées pour tester notre nouvelle approche thérapeutique *in vivo* car elles permettent de greffer un système immunitaire et des tumeurs humaines sans réaction de rejet. Afin de mimer le développement du neuroblastome, une xéngreffe orthotopique sera réalisée : les cellules de neuroblastome humain seront implantées dans la capsule surrénale des souris préalablement greffées avec des cellules souches hématopoïétiques humaines. Les souris seront traitées par injections (i) d'anticorps monoclonal anti-GD2, (ii) des pDC activées au CpG ou (iii) une combinaison des deux. Cette

étude préclinique servira de base à l'élaboration d'essais cliniques visant à augmenter le taux de survie des enfants atteints de neuroblastome à haut risque.

Bibliographie

- 1 Virchow, R. L. K. *Die Krankhaften Geschwulste*. Vol. 11 149-50 (A. Hirschwald, 1864).
- 2 Pepper, W. A. A study of congenital sarcoma of the liver and suprarenal with report of a case. *The American Journal of Sciences* **121**, 287-299 (1901).
- 3 Hutchison, R. On suprarenal sarcoma in children with metastases to the skull. *Quarterly Journal of Medicine* **1**, 33-38 (1907).
- 4 Wright, J. H. Neurocytoma or neuroblastoma, a kind of tumor not generally recognized. *The Journal of Experimental Medicine* **12**, 556-561 (1910).
- 5 Liu, A. & Niswander, L. A. Bone morphogenetic protein signalling and vertebrate nervous system development. *Nature reviews. Neuroscience* **6**, 945-954, doi:10.1038/nrn1805 (2005).
- 6 Colas, J. F. & Schoenwolf, G. C. Towards a cellular and molecular understanding of neurulation. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* **221**, 117-145, doi:10.1002/dvdy.1144 (2001).
- 7 Smith, J. L. & Schoenwolf, G. C. Neurulation: coming to closure. *Trends in neurosciences* **20**, 510-517 (1997).
- 8 Detrick, R. J., Dickey, D. & Kintner, C. R. The effects of N-cadherin misexpression on morphogenesis in *Xenopus* embryos. *Neuron* **4**, 493-506 (1990).
- 9 Takeichi, M., Inuzuka, H., Shimamura, K., Fujimori, T. & Nagafuchi, A. Cadherin subclasses: differential expression and their roles in neural morphogenesis. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* **55**, 319-325 (1990).
- 10 Dickinson, M. E., Krumlauf, R. & McMahon, A. P. Evidence for a mitogenic effect of Wnt-1 in the developing mammalian central nervous system. *Development* **120**, 1453-1471 (1994).
- 11 Muroyama, Y., Fujihara, M., Ikeya, M., Kondoh, H. & Takada, S. Wnt signaling plays an essential role in neuronal specification of the dorsal spinal cord. *Genes & development* **16**, 548-553, doi:10.1101/gad.937102 (2002).
- 12 Ikeya, M., Lee, S. M., Johnson, J. E., McMahon, A. P. & Takada, S. Wnt signalling required for expansion of neural crest and CNS progenitors. *Nature* **389**, 966-970, doi:10.1038/40146 (1997).
- 13 Liem, K. F., Jr., Tremml, G., Roelink, H. & Jessell, T. M. Dorsal differentiation of neural plate cells induced by BMP-mediated signals from epidermal ectoderm. *Cell* **82**, 969-979 (1995).
- 14 Liu, S. *et al.* 'Cross-talk' between Schwannian stroma and neuroblasts promotes neuroblastoma tumor differentiation and inhibits angiogenesis. *Cancer letters* **228**, 125-131, doi:10.1016/j.canlet.2005.01.056 (2005).
- 15 LaBonne, C. Vertebrate development: wnt signals at the crest. *Current biology : CB* **12**, R743-744 (2002).
- 16 Milunsky, A. *et al.* Multivitamin/folic acid supplementation in early pregnancy reduces the prevalence of neural tube defects. *JAMA : the journal of the American Medical Association* **262**, 2847-2852 (1989).

- 17 Czeizel, A. E. & Dudas, I. Prevention of the first occurrence of neural-tube defects by periconceptional vitamin supplementation. *The New England journal of medicine* **327**, 1832-1835, doi:10.1056/NEJM199212243272602 (1992).
- 18 Gilbert, S. F. *Developmental Biology*. 6 edn, 695 (Sinauer Associates Inc., 2000).
- 19 Shimada, H. *et al.* The International Neuroblastoma Pathology Classification (the Shimada system). *Cancer* **86**, 364-372 (1999).
- 20 Ambros, I. M. *et al.* Role of ploidy, chromosome 1p, and Schwann cells in the maturation of neuroblastoma. *The New England journal of medicine* **334**, 1505-1511, doi:10.1056/NEJM199606063342304 (1996).
- 21 Peuchmaur, M. *et al.* Revision of the International Neuroblastoma Pathology Classification: confirmation of favorable and unfavorable prognostic subsets in ganglioneuroblastoma, nodular. *Cancer* **98**, 2274-2281, doi:10.1002/cncr.11773 (2003).
- 22 Park, J. R., Eggert, A. & Caron, H. Neuroblastoma: biology, prognosis, and treatment. *Hematology/oncology clinics of North America* **24**, 65-86, doi:10.1016/j.hoc.2009.11.011 (2010).
- 23 Shimada, H. *et al.* International neuroblastoma pathology classification for prognostic evaluation of patients with peripheral neuroblastic tumors: a report from the Children's Cancer Group. *Cancer* **92**, 2451-2461 (2001).
- 24 Shimada, H. *et al.* Histopathologic prognostic factors in neuroblastic tumors: definition of subtypes of ganglioneuroblastoma and an age-linked classification of neuroblastomas. *Journal of the National Cancer Institute* **73**, 405-416 (1984).
- 25 Stiller, C. A. & Parkin, D. M. International variations in the incidence of neuroblastoma. *International journal of cancer. Journal international du cancer* **52**, 538-543 (1992).
- 26 London, W. B. *et al.* Evidence for an age cutoff greater than 365 days for neuroblastoma risk group stratification in the Children's Oncology Group. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **23**, 6459-6465, doi:10.1200/JCO.2005.05.571 (2005).
- 27 Linet, M. S., Ries, L. A., Smith, M. A., Tarone, R. E. & Devesa, S. S. Cancer surveillance series: recent trends in childhood cancer incidence and mortality in the United States. *Journal of the National Cancer Institute* **91**, 1051-1058 (1999).
- 28 Wilkins, J. R., 3rd & Hundley, V. D. Paternal occupational exposure to electromagnetic fields and neuroblastoma in offspring. *American journal of epidemiology* **131**, 995-1008 (1990).
- 29 Bunin, G. R., Ward, E., Kramer, S., Rhee, C. A. & Meadows, A. T. Neuroblastoma and parental occupation. *American journal of epidemiology* **131**, 776-780 (1990).
- 30 Kramer, S., Ward, E., Meadows, A. T. & Malone, K. E. Medical and drug risk factors associated with neuroblastoma: a case-control study. *Journal of the National Cancer Institute* **78**, 797-804 (1987).
- 31 Schwartzbaum, J. A. Influence of the mother's prenatal drug consumption on risk of neuroblastoma in the child. *American journal of epidemiology* **135**, 1358-1367 (1992).
- 32 Kinney, H., Faix, R. & Brazy, J. The fetal alcohol syndrome and neuroblastoma. *Pediatrics* **66**, 130-132 (1980).
- 33 Connelly, J. M. & Malkin, M. G. Environmental risk factors for brain tumors. *Current neurology and neuroscience reports* **7**, 208-214 (2007).

- 34 Colon, N. C. & Chung, D. H. Neuroblastoma. *Advances in pediatrics* **58**, 297-311, doi:10.1016/j.yapd.2011.03.011 (2011).
- 35 Maris, J. M. *et al.* Familial predisposition to neuroblastoma does not map to chromosome band 1p36. *Cancer research* **56**, 3421-3425 (1996).
- 36 Hogarty, M. D. *et al.* Identification of a 1-megabase consensus region of deletion at 1p36.3 in primary neuroblastomas. *Medical and pediatric oncology* **35**, 512-515 (2000).
- 37 Kushner, B. H., Hajdu, S. I. & Helson, L. Synchronous neuroblastoma and von Recklinghausen's disease: a review of the literature. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **3**, 117-120 (1985).
- 38 Voorhess, M. L. & Gardner, L. I. Urinary excretion of norepinephrine, epinephrine and 3-methoxy-4-hydroxymandelic acid by children with neuroblastoma. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* **21**, 321-335, doi:10.1210/jcem-21-3-321 (1961).
- 39 Voorhess, M. L. & Gardner, L. I. Studies of catecholamine excretion by children with neural tumors. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* **22**, 126-133, doi:10.1210/jcem-22-2-126 (1962).
- 40 Williams, C. M. & Greer, M. Homovanillic acid and vanilmandelic acid in diagnosis of neuroblastoma. *JAMA : the journal of the American Medical Association* **183**, 836-840 (1963).
- 41 Yamamoto, K. *et al.* Mass screening and age-specific incidence of neuroblastoma in Saitama Prefecture, Japan. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **13**, 2033-2038 (1995).
- 42 Schilling, F. H. *et al.* Neuroblastoma screening at one year of age. *The New England journal of medicine* **346**, 1047-1053, doi:10.1056/NEJMoa012277 (2002).
- 43 Woods, W. G. *et al.* Screening of infants and mortality due to neuroblastoma. *The New England journal of medicine* **346**, 1041-1046, doi:10.1056/NEJMoa012387 (2002).
- 44 Brodeur, G. M. *et al.* Biological aspects of neuroblastomas identified by mass screening in Quebec. *Medical and pediatric oncology* **36**, 157-159, doi:10.1002/1096-911X(20010101)36:1<157::AID-MPO1038>3.0.CO;2-F (2001).
- 45 Maris, J. M. Recent advances in neuroblastoma. *The New England journal of medicine* **362**, 2202-2211, doi:10.1056/NEJMra0804577 (2010).
- 46 De Bernardi, B. *et al.* Neuroblastoma with symptomatic spinal cord compression at diagnosis: treatment and results with 76 cases. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **19**, 183-190 (2001).
- 47 DuBois, S. G. *et al.* Metastatic sites in stage IV and IVS neuroblastoma correlate with age, tumor biology, and survival. *Journal of pediatric hematology/oncology* **21**, 181-189 (1999).
- 48 Evans, A. E. *et al.* A review of 17 IV-S neuroblastoma patients at the children's hospital of philadelphia. *Cancer* **45**, 833-839 (1980).
- 49 Escobar, M. A. *et al.* Long-term outcomes in patients with stage IV neuroblastoma. *Journal of pediatric surgery* **41**, 377-381, doi:10.1016/j.jpedsurg.2005.11.032 (2006).
- 50 DeVita, V. T., Lawrence, T. S., Rosenberg, S. A., DePinho, R. A. & Weinberg, R. A. *DeVita, Hellman, and Rosenberg's Cancer: Principles & Practice of Oncology*. (Lippincott Williams & Wilkins, 2011).

- 51 Brodeur, G. M. *et al.* International criteria for diagnosis, staging, and response to treatment in patients with neuroblastoma. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **6**, 1874-1881 (1988).
- 52 Brodeur, G. M. *et al.* Revisions of the international criteria for neuroblastoma diagnosis, staging, and response to treatment. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **11**, 1466-1477 (1993).
- 53 Cohn, S. L. *et al.* The International Neuroblastoma Risk Group (INRG) classification system: an INRG Task Force report. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **27**, 289-297, doi:10.1200/JCO.2008.16.6785 (2009).
- 54 Monclair, T. *et al.* The International Neuroblastoma Risk Group (INRG) staging system: an INRG Task Force report. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **27**, 298-303, doi:10.1200/JCO.2008.16.6876 (2009).
- 55 Davidoff, A. M. Neuroblastoma. *Seminars in pediatric surgery* **21**, 2-14, doi:10.1053/j.sempedsurg.2011.10.009 (2012).
- 56 Maris, J. (Education Session: ASCO Annual Meeting presentation, ASCO, 2007).
- 57 Perez, C. A. *et al.* Biologic variables in the outcome of stages I and II neuroblastoma treated with surgery as primary therapy: a children's cancer group study. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **18**, 18-26 (2000).
- 58 Simon, T., Spitz, R., Faldum, A., Hero, B. & Berthold, F. New definition of low-risk neuroblastoma using stage, age, and 1p and MYCN status. *Journal of pediatric hematology/oncology* **26**, 791-796 (2004).
- 59 Haas, D., Ablin, A. R., Miller, C., Zoger, S. & Matthay, K. K. Complete pathologic maturation and regression of stage IVS neuroblastoma without treatment. *Cancer* **62**, 818-825 (1988).
- 60 Nickerson, H. J. *et al.* Favorable biology and outcome of stage IV-S neuroblastoma with supportive care or minimal therapy: a Children's Cancer Group study. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **18**, 477-486 (2000).
- 61 Matthay, K. K. *et al.* Successful treatment of stage III neuroblastoma based on prospective biologic staging: a Children's Cancer Group study. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **16**, 1256-1264 (1998).
- 62 Schmidt, M. L. *et al.* Biologic factors determine prognosis in infants with stage IV neuroblastoma: A prospective Children's Cancer Group study. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **18**, 1260-1268 (2000).
- 63 Matthay, K. K. *et al.* Treatment of high-risk neuroblastoma with intensive chemotherapy, radiotherapy, autologous bone marrow transplantation, and 13-cis-retinoic acid. Children's Cancer Group. *The New England journal of medicine* **341**, 1165-1173, doi:10.1056/NEJM199910143411601 (1999).
- 64 Freemantle, S. J., Spinella, M. J. & Dmitrovsky, E. Retinoids in cancer therapy and chemoprevention: promise meets resistance. *Oncogene* **22**, 7305-7315, doi:10.1038/sj.onc.1206936 (2003).

- 65 Petkovich, P. M. Retinoic acid metabolism. *Journal of the American Academy of Dermatology* **45**, S136-142, doi:10.1067/mjd.2001.113715 (2001).
- 66 Napoli, J. L. Interactions of retinoid binding proteins and enzymes in retinoid metabolism. *Biochimica et biophysica acta* **1440**, 139-162 (1999).
- 67 Sun, S. Y. & Lotan, R. Retinoids and their receptors in cancer development and chemoprevention. *Critical reviews in oncology/hematology* **41**, 41-55 (2002).
- 68 Charrier, E. *et al.* Post-transcriptional down-regulation of Toll-like receptor signaling pathway in umbilical cord blood plasmacytoid dendritic cells. *Cellular immunology* **276**, 114-121, doi:10.1016/j.cellimm.2012.04.010 (2012).
- 69 Welch, C., Chen, Y. & Stallings, R. L. MicroRNA-34a functions as a potential tumor suppressor by inducing apoptosis in neuroblastoma cells. *Oncogene* **26**, 5017-5022, doi:10.1038/sj.onc.1210293 (2007).
- 70 Martin, S. J., Bradley, J. G. & Cotter, T. G. HL-60 cells induced to differentiate towards neutrophils subsequently die via apoptosis. *Clinical and experimental immunology* **79**, 448-453 (1990).
- 71 Piacentini, M. *et al.* Phenotype-specific "tissue" transglutaminase regulation in human neuroblastoma cells in response to retinoic acid: correlation with cell death by apoptosis. *International journal of cancer. Journal international du cancer* **52**, 271-278 (1992).
- 72 Di Vinci, A., Geido, E., Infusini, E. & Giaretti, W. Neuroblastoma cell apoptosis induced by the synthetic retinoid N-(4-hydroxyphenyl)retinamide. *International journal of cancer. Journal international du cancer* **59**, 422-426 (1994).
- 73 Ponzoni, M. *et al.* Differential effects of N-(4-hydroxyphenyl)retinamide and retinoic acid on neuroblastoma cells: apoptosis versus differentiation. *Cancer research* **55**, 853-861 (1995).
- 74 Carachi, R. Perspectives on neuroblastoma. *Pediatric surgery international* **18**, 299-305, doi:10.1007/s00383-002-0793-4 (2002).
- 75 Gilman, A. L. *et al.* Phase I study of ch14.18 with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukin-2 in children with neuroblastoma after autologous bone marrow transplantation or stem-cell rescue: a report from the Children's Oncology Group. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **27**, 85-91, doi:10.1200/JCO.2006.10.3564 (2009).
- 76 Kushner, B. H., Kramer, K. & Cheung, N. K. Phase II trial of the anti-G(D2) monoclonal antibody 3F8 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor for neuroblastoma. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **19**, 4189-4194 (2001).
- 77 Yu, A. L. *et al.* Anti-GD2 antibody with GM-CSF, interleukin-2, and isotretinoin for neuroblastoma. *The New England journal of medicine* **363**, 1324-1334, doi:10.1056/NEJMoa0911123 (2010).
- 78 Yu, A. L. *et al.* Phase I trial of a human-mouse chimeric anti-disialoganglioside monoclonal antibody ch14.18 in patients with refractory neuroblastoma and osteosarcoma. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **16**, 2169-2180 (1998).
- 79 Hank, J. A. *et al.* Augmentation of antibody dependent cell mediated cytotoxicity following in vivo therapy with recombinant interleukin 2. *Cancer research* **50**, 5234-5239 (1990).

- 80 Hank, J. A. *et al.* Treatment of neuroblastoma patients with antiganglioside GD2 antibody plus interleukin-2 induces antibody-dependent cellular cytotoxicity against neuroblastoma detected in vitro. *Journal of immunotherapy with emphasis on tumor immunology : official journal of the Society for Biological Therapy* **15**, 29-37 (1994).
- 81 Barker, E. *et al.* Effect of a chimeric anti-ganglioside GD2 antibody on cell-mediated lysis of human neuroblastoma cells. *Cancer research* **51**, 144-149 (1991).
- 82 Cheresh, D. A., Rosenberg, J., Mujoo, K., Hirschowitz, L. & Reisfeld, R. A. Biosynthesis and expression of the disialoganglioside GD2, a relevant target antigen on small cell lung carcinoma for monoclonal antibody-mediated cytolysis. *Cancer research* **46**, 5112-5118 (1986).
- 83 Cheresh, D. A., Pierschbacher, M. D., Herzig, M. A. & Mujoo, K. Disialogangliosides GD2 and GD3 are involved in the attachment of human melanoma and neuroblastoma cells to extracellular matrix proteins. *The Journal of cell biology* **102**, 688-696 (1986).
- 84 Matthay, K. K., George, R. E. & Yu, A. L. Promising therapeutic targets in neuroblastoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **18**, 2740-2753, doi:10.1158/1078-0432.CCR-11-1939 (2012).
- 85 Wu, Z. L., Schwartz, E., Seeger, R. & Ladisch, S. Expression of GD2 ganglioside by untreated primary human neuroblastomas. *Cancer research* **46**, 440-443 (1986).
- 86 Seeger, R. C. Immunology and immunotherapy of neuroblastoma. *Seminars in cancer biology* **21**, 229-237, doi:10.1016/j.semcan.2011.09.012 (2011).
- 87 Mujoo, K., Cheresh, D. A., Yang, H. M. & Reisfeld, R. A. Disialoganglioside GD2 on human neuroblastoma cells: target antigen for monoclonal antibody-mediated cytolysis and suppression of tumor growth. *Cancer research* **47**, 1098-1104 (1987).
- 88 Delgado, D. C. *et al.* Genotypes of NK cell KIR receptors, their ligands, and Fcγ receptors in the response of neuroblastoma patients to Hu14.18-IL2 immunotherapy. *Cancer research* **70**, 9554-9561, doi:10.1158/0008-5472.CAN-10-2211 (2010).
- 89 Malkovsky, M. & Sondel, P. M. Interleukin 2 and its receptor: structure, function and therapeutic potential. *Blood reviews* **1**, 254-266 (1987).
- 90 Malkovsky, M. *et al.* Recombinant interleukin-2 directly augments the cytotoxicity of human monocytes. *Nature* **325**, 262-265, doi:10.1038/325262a0 (1987).
- 91 Gaffen, S. L. & Liu, K. D. Overview of interleukin-2 function, production and clinical applications. *Cytokine* **28**, 109-123, doi:10.1016/j.cyto.2004.06.010 (2004).
- 92 Ortaldo, J. R. *et al.* Effects of natural and recombinant IL 2 on regulation of IFN gamma production and natural killer activity: lack of involvement of the Tac antigen for these immunoregulatory effects. *J Immunol* **133**, 779-783 (1984).
- 93 Fehniger, T. A., Cooper, M. A. & Caligiuri, M. A. Interleukin-2 and interleukin-15: immunotherapy for cancer. *Cytokine & growth factor reviews* **13**, 169-183 (2002).
- 94 Fehniger, T. A. *et al.* CD56bright natural killer cells are present in human lymph nodes and are activated by T cell-derived IL-2: a potential new link between adaptive and innate immunity. *Blood* **101**, 3052-3057, doi:10.1182/blood-2002-09-2876 (2003).
- 95 Metcalf, D. Studies on colony formation in vitro by mouse bone marrow cells. II. Action of colony stimulating factor. *Journal of cellular physiology* **76**, 89-99, doi:10.1002/jcp.1040760113 (1970).
- 96 Wing, E. J., Magee, D. M., Whiteside, T. L., Kaplan, S. S. & Shadduck, R. K. Recombinant human granulocyte/macrophage colony-stimulating factor enhances

- monocyte cytotoxicity and secretion of tumor necrosis factor alpha and interferon in cancer patients. *Blood* **73**, 643-646 (1989).
- 97 Smith, P. D., Lamerson, C. L., Wong, H. L., Wahl, L. M. & Wahl, S. M. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor stimulates human monocyte accessory cell function. *J Immunol* **144**, 3829-3834 (1990).
- 98 Perkins, R. C., Vadhan-Raj, S., Scheule, R. K., Hamilton, R. & Holian, A. Effects of continuous high dose rhGM-CSF infusion on human monocyte activity. *American journal of hematology* **43**, 279-285 (1993).
- 99 Weisbart, R. H., Golde, D. W., Clark, S. C., Wong, G. G. & Gasson, J. C. Human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor is a neutrophil activator. *Nature* **314**, 361-363 (1985).
- 100 Gasson, J. C. *et al.* Purified human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor: direct action on neutrophils. *Science* **226**, 1339-1342 (1984).
- 101 Fleischmann, J., Golde, D. W., Weisbart, R. H. & Gasson, J. C. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor enhances phagocytosis of bacteria by human neutrophils. *Blood* **68**, 708-711 (1986).
- 102 Ho, A. D. *et al.* Activation of lymphocytes induced by recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in patients with malignant lymphoma. *Blood* **75**, 203-212 (1990).
- 103 Young, J. W., Szabolcs, P. & Moore, M. A. Identification of dendritic cell colony-forming units among normal human CD34+ bone marrow progenitors that are expanded by c-kit-ligand and yield pure dendritic cell colonies in the presence of granulocyte/macrophage colony-stimulating factor and tumor necrosis factor alpha. *The Journal of experimental medicine* **182**, 1111-1119 (1995).
- 104 Sallusto, F. & Lanzavecchia, A. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *The Journal of experimental medicine* **179**, 1109-1118 (1994).
- 105 Stanley, E. *et al.* Granulocyte/macrophage colony-stimulating factor-deficient mice show no major perturbation of hematopoiesis but develop a characteristic pulmonary pathology. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**, 5592-5596 (1994).
- 106 Sheridan, J. W. & Metcalf, D. Studies on the bone marrow colony stimulating factor (CSF): relation of tissue CSF to serum CSF. *Journal of cellular physiology* **80**, 129-140, doi:10.1002/jcp.1040800114 (1972).
- 107 Cebon, J., Layton, J. E., Maher, D. & Morstyn, G. Endogenous haemopoietic growth factors in neutropenia and infection. *British journal of haematology* **86**, 265-274 (1994).
- 108 Hamilton, J. A., Stanley, E. R., Burgess, A. W. & Shadduck, R. K. Stimulation of macrophage plasminogen activator activity by colony-stimulating factors. *Journal of cellular physiology* **103**, 435-445, doi:10.1002/jcp.1041030309 (1980).
- 109 Hamilton, J. A. GM-CSF in inflammation and autoimmunity. *Trends in immunology* **23**, 403-408 (2002).
- 110 Singh, S. K. *et al.* Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature* **432**, 396-401, doi:10.1038/nature03128 (2004).

- 111 Khalil, M. A. *et al.* Neuroblastoma stem cells - mechanisms of chemoresistance and histone deacetylase inhibitors. *Neoplasma* **59**, 737-746, doi:10.4149/neo_2012_093 (2012).
- 112 Vangipuram, S. D., Wang, Z. J. & Lyman, W. D. Resistance of stem-like cells from neuroblastoma cell lines to commonly used chemotherapeutic agents. *Pediatric blood & cancer* **54**, 361-368, doi:10.1002/pbc.22351 (2010).
- 113 Bao, S. *et al.* Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature* **444**, 756-760, doi:10.1038/nature05236 (2006).
- 114 Sartelet, H. *et al.* CD133 expression is associated with poor outcome in neuroblastoma via chemoresistance mediated by the AKT pathway. *Histopathology* **60**, 1144-1155, doi:10.1111/j.1365-2559.2012.04191.x (2012).
- 115 Chen, Y. C. *et al.* Oct-4 expression maintained cancer stem-like properties in lung cancer-derived CD133-positive cells. *PloS one* **3**, e2637, doi:10.1371/journal.pone.0002637 (2008).
- 116 Prince, M. E. *et al.* Identification of a subpopulation of cells with cancer stem cell properties in head and neck squamous cell carcinoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**, 973-978, doi:10.1073/pnas.0610117104 (2007).
- 117 O'Brien, C. A., Pollett, A., Gallinger, S. & Dick, J. E. A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. *Nature* **445**, 106-110, doi:10.1038/nature05372 (2007).
- 118 Ricci-Vitiani, L. *et al.* Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. *Nature* **445**, 111-115, doi:10.1038/nature05384 (2007).
- 119 Olempska, M. *et al.* Detection of tumor stem cell markers in pancreatic carcinoma cell lines. *Hepatobiliary & pancreatic diseases international : HBPDI* **6**, 92-97 (2007).
- 120 Li, C. *et al.* Identification of pancreatic cancer stem cells. *Cancer research* **67**, 1030-1037, doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-2030 (2007).
- 121 Bruno, S. *et al.* CD133+ renal progenitor cells contribute to tumor angiogenesis. *The American journal of pathology* **169**, 2223-2235, doi:10.2353/ajpath.2006.060498 (2006).
- 122 Ma, S. *et al.* Identification and characterization of tumorigenic liver cancer stem/progenitor cells. *Gastroenterology* **132**, 2542-2556, doi:10.1053/j.gastro.2007.04.025 (2007).
- 123 Patrawala, L. *et al.* Highly purified CD44+ prostate cancer cells from xenograft human tumors are enriched in tumorigenic and metastatic progenitor cells. *Oncogene* **25**, 1696-1708, doi:10.1038/sj.onc.1209327 (2006).
- 124 Collins, A. T., Berry, P. A., Hyde, C., Stower, M. J. & Maitland, N. J. Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells. *Cancer research* **65**, 10946-10951, doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-2018 (2005).
- 125 Miraglia, S. *et al.* A novel five-transmembrane hematopoietic stem cell antigen: isolation, characterization, and molecular cloning. *Blood* **90**, 5013-5021 (1997).
- 126 Shmelkov, S. V. *et al.* Alternative promoters regulate transcription of the gene that encodes stem cell surface protein AC133. *Blood* **103**, 2055-2061, doi:10.1182/blood-2003-06-1881 (2004).
- 127 Liu, G. *et al.* Analysis of gene expression and chemoresistance of CD133+ cancer stem cells in glioblastoma. *Molecular cancer* **5**, 67, doi:10.1186/1476-4598-5-67 (2006).

- 128 Singh, S. K. *et al.* Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer research* **63**, 5821-5828 (2003).
- 129 Cournoyer, S. *et al.* Genotype analysis of tumor-initiating cells expressing CD133 in neuroblastoma. *Genes, chromosomes & cancer* **51**, 792-804, doi:10.1002/gcc.21964 (2012).
- 130 Tong, Q. S. *et al.* Expression and clinical significance of stem cell marker CD133 in human neuroblastoma. *World journal of pediatrics : WJP* **4**, 58-62, doi:10.1007/s12519-008-0012-z (2008).
- 131 Dean, M. Cancer stem cells: Implications for cancer causation and therapy resistance. *Discovery medicine* **5**, 278-282 (2005).
- 132 Zeng, Y., Kulkarni, P., Inoue, T. & Getzenberg, R. H. Down-regulating cold shock protein genes impairs cancer cell survival and enhances chemosensitivity. *Journal of cellular biochemistry* **107**, 179-188, doi:10.1002/jcb.22114 (2009).
- 133 Sartelet, H. *et al.* Activation of the phosphatidylinositol 3'-kinase/AKT pathway in neuroblastoma and its regulation by thioredoxin 1. *Human pathology* **42**, 1727-1739, doi:10.1016/j.humpath.2011.01.019 (2011).
- 134 Sartelet, H., Oligny, L. L. & Vassal, G. AKT pathway in neuroblastoma and its therapeutic implication. *Expert review of anticancer therapy* **8**, 757-769, doi:10.1586/14737140.8.5.757 (2008).
- 135 Champlin, R. E. *et al.* Blood stem cells compared with bone marrow as a source of hematopoietic cells for allogeneic transplantation. IBMTR Histocompatibility and Stem Cell Sources Working Committee and the European Group for Blood and Marrow Transplantation (EBMT). *Blood* **95**, 3702-3709 (2000).
- 136 Broxmeyer, H. E. *et al.* Human umbilical cord blood as a potential source of transplantable hematopoietic stem/progenitor cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **86**, 3828-3832 (1989).
- 137 Gluckman, E. *et al.* Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi's anemia by means of umbilical-cord blood from an HLA-identical sibling. *The New England journal of medicine* **321**, 1174-1178, doi:10.1056/NEJM198910263211707 (1989).
- 138 Broxmeyer, H. E. *et al.* Growth characteristics and expansion of human umbilical cord blood and estimation of its potential for transplantation in adults. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **89**, 4109-4113 (1992).
- 139 Wagner, J. E. *et al.* Successful transplantation of HLA-matched and HLA-mismatched umbilical cord blood from unrelated donors: analysis of engraftment and acute graft-versus-host disease. *Blood* **88**, 795-802 (1996).
- 140 Beatty, P. G. *et al.* Marrow transplantation from related donors other than HLA-identical siblings. *The New England journal of medicine* **313**, 765-771, doi:10.1056/NEJM198509263131301 (1985).
- 141 Petersdorf, E. W. *et al.* Major-histocompatibility-complex class I alleles and antigens in hematopoietic-cell transplantation. *The New England journal of medicine* **345**, 1794-1800, doi:10.1056/NEJMoa011826 (2001).
- 142 Glucksberg, H. *et al.* Clinical manifestations of graft-versus-host disease in human recipients of marrow from HL-A-matched sibling donors. *Transplantation* **18**, 295-304 (1974).
- 143 Storb, R. *et al.* Methotrexate and cyclosporine compared with cyclosporine alone for prophylaxis of acute graft versus host disease after marrow transplantation for

- leukemia. *The New England journal of medicine* **314**, 729-735, doi:10.1056/NEJM198603203141201 (1986).
- 144 Storb, R. *et al.* Cyclosporine v methotrexate for graft-v-host disease prevention in patients given marrow grafts for leukemia: long-term follow-up of three controlled trials. *Blood* **71**, 293-298 (1988).
- 145 Ringden, O. *et al.* Methotrexate, cyclosporine, or both to prevent graft-versus-host disease after HLA-identical sibling bone marrow transplants for early leukemia? *Blood* **81**, 1094-1101 (1993).
- 146 Gratwohl, A. *et al.* The EBMT activity survey 2008: impact of team size, team density and new trends. *Bone marrow transplantation* **46**, 174-191, doi:10.1038/bmt.2010.69 (2011).
- 147 Inoue, M. *et al.* Graft-versus-tumor effect in a patient with advanced neuroblastoma who received HLA haplo-identical bone marrow transplantation. *Bone marrow transplantation* **32**, 103-106, doi:10.1038/sj.bmt.1704070 (2003).
- 148 Kanold, J. *et al.* Photopheresis in pediatric graft-versus-host disease after allogeneic marrow transplantation: clinical practice guidelines based on field experience and review of the literature. *Transfusion* **47**, 2276-2289, doi:10.1111/j.1537-2995.2007.01469.x (2007).
- 149 Jubert, C., Wall, D. A., Grimley, M., Champagne, M. A. & Duval, M. Engraftment of unrelated cord blood after reduced-intensity conditioning regimen in children with refractory neuroblastoma: a feasibility trial. *Bone marrow transplantation* **46**, 232-237, doi:10.1038/bmt.2010.107 (2011).
- 150 Dalle, J. H. *et al.* Results of an unrelated transplant search strategy using partially HLA-mismatched cord blood as an immediate alternative to HLA-matched bone marrow. *Bone marrow transplantation* **33**, 605-611, doi:10.1038/sj.bmt.1704433 (2004).
- 151 Gluckman, E. *et al.* Outcome of cord-blood transplantation from related and unrelated donors. Eurocord Transplant Group and the European Blood and Marrow Transplantation Group. *The New England journal of medicine* **337**, 373-381, doi:10.1056/NEJM199708073370602 (1997).
- 152 Rubinstein, P. *et al.* Outcomes among 562 recipients of placental-blood transplants from unrelated donors. *The New England journal of medicine* **339**, 1565-1577, doi:10.1056/NEJM199811263392201 (1998).
- 153 Barker, J. N. *et al.* Survival after transplantation of unrelated donor umbilical cord blood is comparable to that of human leukocyte antigen-matched unrelated donor bone marrow: results of a matched-pair analysis. *Blood* **97**, 2957-2961 (2001).
- 154 Renard, C. *et al.* Lymphocyte subset reconstitution after unrelated cord blood or bone marrow transplantation in children. *British journal of haematology* **152**, 322-330, doi:10.1111/j.1365-2141.2010.08409.x (2011).
- 155 Charrier, E. *et al.* Reconstitution of maturing and regulatory lymphocyte subsets after cord blood and BMT in children. *Bone marrow transplantation* **48**, 376-382, doi:10.1038/bmt.2012.176 (2013).
- 156 Giraud, P. *et al.* Immune reconstitution and outcome after unrelated cord blood transplantation: a single paediatric institution experience. *Bone marrow transplantation* **25**, 53-57, doi:10.1038/sj.bmt.1702089 (2000).

- 157 Beziat, V. *et al.* Fully functional NK cells after unrelated cord blood transplantation. *Leukemia* **23**, 721-728, doi:10.1038/leu.2008.343 (2009).
- 158 Merindol, N., Charrier, E., Duval, M. & Soudeyns, H. Complementary and contrasting roles of NK cells and T cells in pediatric umbilical cord blood transplantation. *Journal of leukocyte biology* **90**, 49-60, doi:10.1189/jlb.0111007 (2011).
- 159 Guillaume, T., Rubinstein, D. B. & Symann, M. Immune reconstitution and immunotherapy after autologous hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* **92**, 1471-1490 (1998).
- 160 Kindt, T. J., Goldsby, R. A. & Osborne, B. A. *Immunologie: Le cours de Janis Kuby avec questions de révision*. 6e édition edn, 684 (DUNOD, 2008).
- 161 Thomson, B. G. *et al.* Analysis of engraftment, graft-versus-host disease, and immune recovery following unrelated donor cord blood transplantation. *Blood* **96**, 2703-2711 (2000).
- 162 Klein, A. K. *et al.* T-Cell recovery in adults and children following umbilical cord blood transplantation. *Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation* **7**, 454-466 (2001).
- 163 Jacobs, R. *et al.* CD16- CD56+ natural killer cells after bone marrow transplantation. *Blood* **79**, 3239-3244 (1992).
- 164 Fehniger, T. A. & Caligiuri, M. A. Ontogeny and expansion of human natural killer cells: clinical implications. *International reviews of immunology* **20**, 503-534 (2001).
- 165 Nagler, A., Lanier, L. L., Cwirla, S. & Phillips, J. H. Comparative studies of human FcRIII-positive and negative natural killer cells. *J Immunol* **143**, 3183-3191 (1989).
- 166 Kiessling, R., Klein, E. & Wigzell, H. "Natural" killer cells in the mouse. I. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Specificity and distribution according to genotype. *European journal of immunology* **5**, 112-117, doi:10.1002/eji.1830050208 (1975).
- 167 Kiessling, R., Klein, E., Pross, H. & Wigzell, H. "Natural" killer cells in the mouse. II. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Characteristics of the killer cell. *European journal of immunology* **5**, 117-121, doi:10.1002/eji.1830050209 (1975).
- 168 Herberman, R. B., Nunn, M. E. & Lavrin, D. H. Natural cytotoxic reactivity of mouse lymphoid cells against syngeneic acid allogeneic tumors. I. Distribution of reactivity and specificity. *International journal of cancer. Journal international du cancer* **16**, 216-229 (1975).
- 169 Herberman, R. B., Nunn, M. E., Holden, H. T. & Lavrin, D. H. Natural cytotoxic reactivity of mouse lymphoid cells against syngeneic and allogeneic tumors. II. Characterization of effector cells. *International journal of cancer. Journal international du cancer* **16**, 230-239 (1975).
- 170 Rosenberg, E. B. *et al.* Lymphocyte cytotoxicity reactions to leukemia-associated antigens in identical twins. *International journal of cancer. Journal international du cancer* **9**, 648-658 (1972).
- 171 Takasugi, M., Mickey, M. R. & Terasaki, P. I. Reactivity of lymphocytes from normal persons on cultured tumor cells. *Cancer research* **33**, 2898-2902 (1973).
- 172 Lanier, L. L., Testi, R., Bindl, J. & Phillips, J. H. Identity of Leu-19 (CD56) leukocyte differentiation antigen and neural cell adhesion molecule. *The Journal of experimental medicine* **169**, 2233-2238 (1989).

- 173 Lanier, L. L., Phillips, J. H., Hackett, J., Jr., Tutt, M. & Kumar, V. Natural killer cells: definition of a cell type rather than a function. *J Immunol* **137**, 2735-2739 (1986).
- 174 Cooper, M. A. *et al.* Human natural killer cells: a unique innate immunoregulatory role for the CD56(bright) subset. *Blood* **97**, 3146-3151 (2001).
- 175 Ferlazzo, G. *et al.* The abundant NK cells in human secondary lymphoid tissues require activation to express killer cell Ig-like receptors and become cytolytic. *J Immunol* **172**, 1455-1462 (2004).
- 176 Freud, A. G. *et al.* A human CD34(+) subset resides in lymph nodes and differentiates into CD56bright natural killer cells. *Immunity* **22**, 295-304, doi:10.1016/j.immuni.2005.01.013 (2005).
- 177 Lanier, L. L., Le, A. M., Civin, C. I., Loken, M. R. & Phillips, J. H. The relationship of CD16 (Leu-11) and Leu-19 (NKH-1) antigen expression on human peripheral blood NK cells and cytotoxic T lymphocytes. *J Immunol* **136**, 4480-4486 (1986).
- 178 Caligiuri, M. A. *et al.* Functional consequences of interleukin 2 receptor expression on resting human lymphocytes. Identification of a novel natural killer cell subset with high affinity receptors. *The Journal of experimental medicine* **171**, 1509-1526 (1990).
- 179 De Maria, A., Bozzano, F., Cantoni, C. & Moretta, L. Revisiting human natural killer cell subset function revealed cytolytic CD56(dim)CD16+ NK cells as rapid producers of abundant IFN-gamma on activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**, 728-732, doi:10.1073/pnas.1012356108 (2011).
- 180 Leibson, P. J. Signal transduction during natural killer cell activation: inside the mind of a killer. *Immunity* **6**, 655-661 (1997).
- 181 Clynes, R. A., Towers, T. L., Presta, L. G. & Ravetch, J. V. Inhibitory Fc receptors modulate in vivo cytotoxicity against tumor targets. *Nature medicine* **6**, 443-446, doi:10.1038/74704 (2000).
- 182 Tomescu, C., Chehimi, J., Maino, V. C. & Montaner, L. J. Retention of viability, cytotoxicity, and response to IL-2, IL-15, or IFN-alpha by human NK cells after CD107a degranulation. *Journal of leukocyte biology* **85**, 871-876, doi:10.1189/jlb.1008635 (2009).
- 183 Eischen, C. M., Schilling, J. D., Lynch, D. H., Krammer, P. H. & Leibson, P. J. Fc receptor-induced expression of Fas ligand on activated NK cells facilitates cell-mediated cytotoxicity and subsequent autocrine NK cell apoptosis. *J Immunol* **156**, 2693-2699 (1996).
- 184 Vivier, E. *et al.* Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells. *Science* **331**, 44-49, doi:10.1126/science.1198687 (2011).
- 185 Paillard, C. *et al.* NK cytotoxicity and alloreactivity against neuroblastoma cell lines in vitro: comparison of Europium fluorometry assay and quantification by RT-PCR. *Journal of immunological methods* **380**, 56-64, doi:10.1016/j.jim.2012.03.009 (2012).
- 186 Castriconi, R. *et al.* Natural killer cell-mediated killing of freshly isolated neuroblastoma cells: critical role of DNAX accessory molecule-1-poliovirus receptor interaction. *Cancer research* **64**, 9180-9184, doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-2682 (2004).
- 187 Cho, D. *et al.* Cytotoxicity of activated natural killer cells against pediatric solid tumors. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **16**, 3901-3909, doi:10.1158/1078-0432.CCR-10-0735 (2010).

- 188 Hart, O. M., Athie-Morales, V., O'Connor, G. M. & Gardiner, C. M. TLR7/8-mediated activation of human NK cells results in accessory cell-dependent IFN-gamma production. *J Immunol* **175**, 1636-1642 (2005).
- 189 Girart, M. V., Fuertes, M. B., Domaica, C. I., Rossi, L. E. & Zwirner, N. W. Engagement of TLR3, TLR7, and NKG2D regulate IFN-gamma secretion but not NKG2D-mediated cytotoxicity by human NK cells stimulated with suboptimal doses of IL-12. *J Immunol* **179**, 3472-3479 (2007).
- 190 Sivori, S. *et al.* CpG and double-stranded RNA trigger human NK cells by Toll-like receptors: induction of cytokine release and cytotoxicity against tumors and dendritic cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 10116-10121, doi:10.1073/pnas.0403744101 (2004).
- 191 Marsh, S. G. *et al.* Killer-cell immunoglobulin-like receptor (KIR) nomenclature report, 2002. *Tissue antigens* **62**, 79-86 (2003).
- 192 Campbell, K. S. & Purdy, A. K. Structure/function of human killer cell immunoglobulin-like receptors: lessons from polymorphisms, evolution, crystal structures and mutations. *Immunology* **132**, 315-325, doi:10.1111/j.1365-2567.2010.03398.x (2011).
- 193 Carretero, M. *et al.* The CD94 and NKG2-A C-type lectins covalently assemble to form a natural killer cell inhibitory receptor for HLA class I molecules. *European journal of immunology* **27**, 563-567, doi:10.1002/eji.1830270230 (1997).
- 194 Brooks, A. G., Posch, P. E., Scorzelli, C. J., Borrego, F. & Coligan, J. E. NKG2A complexed with CD94 defines a novel inhibitory natural killer cell receptor. *The Journal of experimental medicine* **185**, 795-800 (1997).
- 195 Sivori, S. *et al.* p46, a novel natural killer cell-specific surface molecule that mediates cell activation. *The Journal of experimental medicine* **186**, 1129-1136 (1997).
- 196 Vitale, M. *et al.* NKp44, a novel triggering surface molecule specifically expressed by activated natural killer cells, is involved in non-major histocompatibility complex-restricted tumor cell lysis. *The Journal of experimental medicine* **187**, 2065-2072 (1998).
- 197 Pende, D. *et al.* Identification and molecular characterization of NKp30, a novel triggering receptor involved in natural cytotoxicity mediated by human natural killer cells. *The Journal of experimental medicine* **190**, 1505-1516 (1999).
- 198 Aramburu, J. *et al.* A novel functional cell surface dimer (Kp43) expressed by natural killer cells and T cell receptor-gamma/delta+ T lymphocytes. I. Inhibition of the IL-2-dependent proliferation by anti-Kp43 monoclonal antibody. *J Immunol* **144**, 3238-3247 (1990).
- 199 Aramburu, J., Balboa, M. A., Izquierdo, M. & Lopez-Botet, M. A novel functional cell surface dimer (Kp43) expressed by natural killer cells and gamma/delta TCR+ T lymphocytes. II. Modulation of natural killer cytotoxicity by anti-Kp43 monoclonal antibody. *J Immunol* **147**, 714-721 (1991).
- 200 Perez-Villar, J. J. *et al.* Functional ambivalence of the Kp43 (CD94) NK cell-associated surface antigen. *J Immunol* **154**, 5779-5788 (1995).
- 201 Lazetic, S., Chang, C., Houchins, J. P., Lanier, L. L. & Phillips, J. H. Human natural killer cell receptors involved in MHC class I recognition are disulfide-linked heterodimers of CD94 and NKG2 subunits. *J Immunol* **157**, 4741-4745 (1996).

- 202 Plougastel, B. & Trowsdale, J. Cloning of NKG2-F, a new member of the NKG2
family of human natural killer cell receptor genes. *European journal of immunology*
27, 2835-2839, doi:10.1002/eji.1830271114 (1997).
- 203 Bauer, S. *et al.* Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-
inducible MICA. *Science* **285**, 727-729 (1999).
- 204 Voss, S. D., Sondel, P. M. & Robb, R. J. Characterization of the interleukin 2 receptors
(IL-2R) expressed on human natural killer cells activated in vivo by IL-2: association
of the p64 IL-2R gamma chain with the IL-2R beta chain in functional intermediate-
affinity IL-2R. *The Journal of experimental medicine* **176**, 531-541 (1992).
- 205 Nagler, A., Lanier, L. L. & Phillips, J. H. Constitutive expression of high affinity
interleukin 2 receptors on human CD16-natural killer cells in vivo. *The Journal of*
experimental medicine **171**, 1527-1533 (1990).
- 206 Warren, H. S., Kinnear, B. F., Kastelein, R. L. & Lanier, L. L. Analysis of the
costimulatory role of IL-2 and IL-15 in initiating proliferation of resting (CD56dim)
human NK cells. *J Immunol* **156**, 3254-3259 (1996).
- 207 Loza, M. J. & Perussia, B. The IL-12 signature: NK cell terminal CD56+high stage
and effector functions. *J Immunol* **172**, 88-96 (2004).
- 208 Lotzova, E., Savary, C. A. & Herberman, R. B. Induction of NK cell activity against
fresh human leukemia in culture with interleukin 2. *J Immunol* **138**, 2718-2727 (1987).
- 209 Carson, W. E. *et al.* Interleukin (IL) 15 is a novel cytokine that activates human natural
killer cells via components of the IL-2 receptor. *The Journal of experimental medicine*
180, 1395-1403 (1994).
- 210 Huntington, N. D. *et al.* IL-15 trans-presentation promotes human NK cell
development and differentiation in vivo. *The Journal of experimental medicine* **206**,
25-34, doi:10.1084/jem.20082013 (2009).
- 211 Orange, J. S. & Biron, C. A. Characterization of early IL-12, IFN- α beta, and TNF
effects on antiviral state and NK cell responses during murine cytomegalovirus
infection. *J Immunol* **156**, 4746-4756 (1996).
- 212 Gerosa, F. *et al.* The reciprocal interaction of NK cells with plasmacytoid or myeloid
dendritic cells profoundly affects innate resistance functions. *J Immunol* **174**, 727-734
(2005).
- 213 Nguyen, K. B. *et al.* Coordinated and distinct roles for IFN- α beta, IL-12, and IL-
15 regulation of NK cell responses to viral infection. *J Immunol* **169**, 4279-4287
(2002).
- 214 Brassard, D. L., Grace, M. J. & Borden, R. W. Interferon- α as an
immunotherapeutic protein. *Journal of leukocyte biology* **71**, 565-581 (2002).
- 215 Sato, K. *et al.* Antiviral response by natural killer cells through TRAIL gene induction
by IFN- α /beta. *European journal of immunology* **31**, 3138-3146,
doi:10.1002/1521-4141(200111)31:11<3138::AID-IMMU3138>3.0.CO;2-B
(2001).
- 216 Liang, S., Wei, H., Sun, R. & Tian, Z. IFN α regulates NK cell cytotoxicity through
STAT1 pathway. *Cytokine* **23**, 190-199 (2003).
- 217 Benlahrech, A. *et al.* Human NK Cell Up-regulation of CD69, HLA-DR, Interferon
gamma Secretion and Cytotoxic Activity by Plasmacytoid Dendritic Cells is Regulated
through Overlapping but Different Pathways. *Sensors (Basel)* **9**, 386-403,
doi:10.3390/s90100386 (2009).

- 218 Campbell, J. J. *et al.* Unique subpopulations of CD56+ NK and NK-T peripheral blood lymphocytes identified by chemokine receptor expression repertoire. *J Immunol* **166**, 6477-6482 (2001).
- 219 Megjugorac, N. J., Young, H. A., Amrute, S. B., Olshalsky, S. L. & Fitzgerald-Bocarsly, P. Virally stimulated plasmacytoid dendritic cells produce chemokines and induce migration of T and NK cells. *Journal of leukocyte biology* **75**, 504-514, doi:10.1189/jlb.0603291 (2004).
- 220 Iwasaki, A. & Medzhitov, R. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nature immunology* **5**, 987-995, doi:10.1038/ni1112 (2004).
- 221 Fitzgerald-Bocarsly, P., Dai, J. & Singh, S. Plasmacytoid dendritic cells and type I IFN: 50 years of convergent history. *Cytokine & growth factor reviews* **19**, 3-19, doi:10.1016/j.cytogfr.2007.10.006 (2008).
- 222 Siegal, F. P. *et al.* The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood. *Science* **284**, 1835-1837 (1999).
- 223 Colonna, M., Trinchieri, G. & Liu, Y. J. Plasmacytoid dendritic cells in immunity. *Nature immunology* **5**, 1219-1226, doi:10.1038/ni1141 (2004).
- 224 Blom, B., Ho, S., Antonenko, S. & Liu, Y. J. Generation of interferon alpha-producing predendritic cell (Pre-DC)2 from human CD34(+) hematopoietic stem cells. *The Journal of experimental medicine* **192**, 1785-1796 (2000).
- 225 Chen, W. *et al.* Thrombopoietin cooperates with FLT3-ligand in the generation of plasmacytoid dendritic cell precursors from human hematopoietic progenitors. *Blood* **103**, 2547-2553, doi:10.1182/blood-2003-09-3058 (2004).
- 226 Pulendran, B. *et al.* Flt3-ligand and granulocyte colony-stimulating factor mobilize distinct human dendritic cell subsets in vivo. *J Immunol* **165**, 566-572 (2000).
- 227 Martin-Martin, L. *et al.* Immunophenotypical, morphologic, and functional characterization of maturation-associated plasmacytoid dendritic cell subsets in normal adult human bone marrow. *Transfusion* **49**, 1692-1708, doi:10.1111/j.1537-2995.2009.02170.x (2009).
- 228 Tel, J. *et al.* The chemotherapeutic drug oxaliplatin differentially affects blood DC function dependent on environmental cues. *Cancer immunology, immunotherapy : CII* **61**, 1101-1111, doi:10.1007/s00262-011-1189-x (2012).
- 229 Wolf, A. I. *et al.* Plasmacytoid dendritic cells are dispensable during primary influenza virus infection. *J Immunol* **182**, 871-879 (2009).
- 230 Smits, H. H. *et al.* Intercellular adhesion molecule-1/LFA-1 ligation favors human Th1 development. *J Immunol* **168**, 1710-1716 (2002).
- 231 Anderson, M. E. & Siahhan, T. J. Targeting ICAM-1/LFA-1 interaction for controlling autoimmune diseases: designing peptide and small molecule inhibitors. *Peptides* **24**, 487-501 (2003).
- 232 Dustin, M. L. & Springer, T. A. T-cell receptor cross-linking transiently stimulates adhesiveness through LFA-1. *Nature* **341**, 619-624, doi:10.1038/341619a0 (1989).
- 233 Salomon, B. & Bluestone, J. A. LFA-1 interaction with ICAM-1 and ICAM-2 regulates Th2 cytokine production. *J Immunol* **161**, 5138-5142 (1998).
- 234 Abraham, C., Griffith, J. & Miller, J. The dependence for leukocyte function-associated antigen-1/ICAM-1 interactions in T cell activation cannot be overcome by expression of high density TCR ligand. *J Immunol* **162**, 4399-4405 (1999).

- 235 Jiga, L. P., Bauer, T. M., Chuang, J. J., Opelz, G. & Terness, P. Generation of tolerogenic dendritic cells by treatment with mitomycin C: inhibition of allogeneic T-cell response is mediated by downregulation of ICAM-1, CD80, and CD86. *Transplantation* **77**, 1761-1764 (2004).
- 236 Tel, J. *et al.* Human plasmacytoid dendritic cells are equipped with antigen-presenting and tumoricidal capacities. *Blood* **120**, 3936-3944, doi:10.1182/blood-2012-06-435941 (2012).
- 237 Hoeffel, G. *et al.* Antigen crosspresentation by human plasmacytoid dendritic cells. *Immunity* **27**, 481-492, doi:10.1016/j.immuni.2007.07.021 (2007).
- 238 Main, E. K., Lampson, L. A., Hart, M. K., Kornbluth, J. & Wilson, D. B. Human neuroblastoma cell lines are susceptible to lysis by natural killer cells but not by cytotoxic T lymphocytes. *J Immunol* **135**, 242-246 (1985).
- 239 Alvarado, C. S. *et al.* Natural killer cells in children with malignant solid tumors. Effect of recombinant interferon-alpha and interleukin-2 on natural killer cell function against tumor cell lines. *Cancer* **63**, 83-89 (1989).
- 240 Rossi, A. R., Pericle, F., Rashleigh, S., Janiec, J. & Djeu, J. Y. Lysis of neuroblastoma cell lines by human natural killer cells activated by interleukin-2 and interleukin-12. *Blood* **83**, 1323-1328 (1994).
- 241 Hopkins-Donaldson, S. *et al.* Loss of caspase-8 expression in highly malignant human neuroblastoma cells correlates with resistance to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis. *Cancer research* **60**, 4315-4319 (2000).
- 242 Eggert, A. *et al.* Resistance to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induced apoptosis in neuroblastoma cells correlates with a loss of caspase-8 expression. *Cancer research* **61**, 1314-1319 (2001).
- 243 Yang, X. *et al.* Induction of caspase 8 by interferon gamma renders some neuroblastoma (NB) cells sensitive to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) but reveals that a lack of membrane TR1/TR2 also contributes to TRAIL resistance in NB. *Cancer research* **63**, 1122-1129 (2003).
- 244 Sheard, M. A. *et al.* Membrane-bound TRAIL supplements natural killer cell cytotoxicity against neuroblastoma cells. *J Immunother* **36**, 319-329, doi:10.1097/CJI.0b013e31829b4493 (2013).
- 245 Terzic, T. *et al.* *Expression of Disialoganglioside GD2 in neuroblastic tumors: a prognostic value for patients undergoing anti-GD2 immunotherapy* (2014).

ANNEXE

Pediatric Blood and Cancer – Brief report.

Frequency of GD2-negative tumor cells correlates with subsequent relapse in patients with neuroblastoma treated with anti-GD2 immunotherapy

Tatjana Terzic¹, Martine Cordeau¹, Sabine Herblot¹, Pierre Teira², Sonia Cournoyer¹, Mona Beaunoyer³, Dominique Valteau-Couanet⁴, Michel Peuchmaur⁵, Michel Duval¹, Herve Sartelet^{1,5}

¹ Département de pathologie et centre de recherche, Centre Hospitalier Universitaire Sainte-Justine, Montréal, Canada

² Département d'héματο-oncologie, Centre de Cancérologie Charles-Bruneau, Centre Hospitalier Universitaire Sainte-Justine, Université de Montréal, Canada

³ Département de chirurgie, Centre Hospitalier Universitaire Sainte-Justine, Montréal, Canada

⁴ Département d'oncologie pédiatrique, Institut Gustave Roussy, Villejuif, France

⁵ Département de pathologie, Centre Hospitalier Universitaire Robert-Debré, Paris, and Université Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, Paris, France

Corresponding author: H Sartelet

Address: Département de pathologie, Centre Hospitalier Universitaire Robert-Debré, 48, Boulevard Sérurier, Paris, France

Tel (0)1 40 03 23 72

Running title: Heterogeneity of GD2 expression in neuroblastic tumors

Keywords: disialoganglioside, GD2, neuroblastoma, immunotherapy, immunohistochemistry

Abstract

While the use of anti GD2 monoclonal antibody has improved the survival of patients with high-risk neuroblastoma, one-third still relapse and subsequently die. We quantified tumor cell GD2 expression in 152 patients with neuroblastic tumors. The proportion of tumor cells expressing GD2 cells differed from patient to patient. In 20 patients receiving anti-GD2 immunotherapy, GD2-negative cell frequency correlated with subsequent relapse. The frequency of GD2 negative cells in neuroblastoma cell lines also correlated with resistance to anti-GD2 mediated natural killer cell cytotoxicity. The presence of GD2-negative tumor cells is a prognostic factor in neuroblastoma patients treated with anti-GD2 immunotherapy.

Introduction

Neuroblastic tumors (NTs) are the most common extracranial solid tumors in children [1, 2]. Among NTs, high-risk tumors are responsible for 15% of all cancer-related deaths in children under 15 years of age [2-4]. NT risk factors include age, stage and *MYCN* amplification [5-7]. Immunotherapy significantly improves survival of high-risk NT patients [8]. The immunotherapeutic regimen combines a chimeric human-murine monoclonal antibody (ch14.18) targeting disialoganglioside GD2, a cell surface tumor-associated antigen, together with granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and interleukin-2 (IL-2). Ch14.18 triggers both complement-mediated and antigen-dependent natural killer (NK) cell-mediated cytotoxicity (ADCC) against GD2 positive NT cells [9, 10]. Nonetheless, one third of patients with high-risk neuroblastoma (NB) still relapse, indicating that some tumor cells escape anti-GD2-mediated tumor lysis [8]. Therefore, we quantified GD2 expression on NT tumor samples and evaluated its prognostic significance in patients receiving anti-GD2 immunotherapy.

Results

Patients and Tumor Samples

Tumor samples were collected from 152 NT patients at the Centre Hospitalier Universitaire (CHU) Sainte-Justine, Montreal, from 1991 to 2008. All the patients were enrolled in the Children's Oncology Group (COG) studies and treated according to their risk group. Informed consent approved by the institutional review board was obtained from all patients. NT samples were classified according the International Neuroblastoma Pathology Classification (**Table I**). Mean age at diagnosis was 33 months (range 0-183) and median follow-up duration was 67 months (range 0-218). For ten patients, their tumors were studied both before and after chemotherapy. Twenty patients were treated with chemotherapy, followed by surgery for the primary tumor, high-dose chemotherapy and autologous stem cell transplantation, radiotherapy of the primary tumor bed and immunotherapy with five cycles of ch14.18 antibody in combination with alternating GM-CSF and IL-2 associated with six cycles of isotretinoin.

GD2 expression

We used tissue micro array (TMA) [11] prepared from 152 NT formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) tumor samples, 45 control normal tissues (41 adrenal glands and 4 sympathetic ganglia) and 33 paired metastases to quantify GD2 expression. TMAs were constructed using four tissue cores (diameter 0.6 mm) transferred onto a recipient paraffin block using a tissue arrayer. FFPE sections were dewaxed, rehydrated and antigen retrieval was performed. Sections were stained using an anti-GD2 monoclonal antibody (clone14G2A, BD Biosciences, Mississauga, ON) recognizing the same epitope as ch14.18. Antibody binding was detected using the streptavidin–biotin method and 3,3'-diaminobenzidine as chromogen. Slides were counterstained with hematoxylin. Immunostaining scores were established by optical analysis of samples containing more than 100 neuroblasts. Cells with a membranous or cytoplasmic staining for GD2 were considered positive. The percentage of positive cells in each sample was assessed and a score of “0”, “1+”, “2+”, “3+” and “4+” was given when 0%, 1-25%, 26-50%, 51-75% and 76-100% of tumor cells, respectively, showed

positive expression (**Supplementary Figure 1**), assessed independently by two experienced pathologists (H.S. and M.P.) blinded to patients' data and a consensus regarding controversial cases was reached with the help of a double-headed microscope. No expression of GD2 was observed in normal cells from sympathetic ganglia and adrenal medulla (**Supplementary Figure 1**). Twenty-one fresh frozen specimens were stained by direct apposition of anti-GD2 on the slides. There was no significant difference in GD2 scores between frozen and TMA from the same patients using Spearman correlation values.

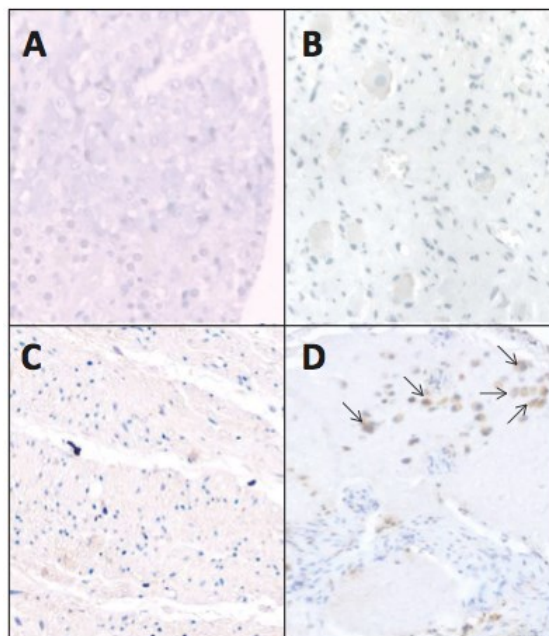
Table I: Clinicopathological features of patients and mean GD2 immunostaining scores

| | | Number of patients (percentage) | Mean GD2 immunostaining score |
|--------------------------|---------------|------------------------------------|----------------------------------|
| Total | | 152 | 1.76 |
| INPC | NB | NBu | 7 |
| | | NBpd | 68 |
| | | NBd | 10 |
| | GNB | iGNB | 31 |
| | | nGNB | 5 |
| | GN | 8 | 0.84 |
| Clinical stage | 1 | 37 (25) | 1.67 |
| | 2 | 26 (17) | 1.90 |
| | 3 | 15 (10) | 1.56 |
| | 4 | 64 (42) | 1.85 |
| | 4s | 10 (7) | 1.33 |
| MYCN status (n = 109) | non amplified | 93 (85) | 1.66 |
| | amplified | 16 (15) | 1.81 |
| Age at diagnosis | <18 months | 60(40) | 1.71 |
| | >18 months | 92 (60) | 1.79 |
| Follow-up | alive | 118 (77) | 1.80 |
| | dead | 34 (23) | 1.61 |
| Immunotherapy | no relapse | 15 (10) | 2.55 |
| | relapse | 5 (3) | 1.2 |

INPC: International Neuroblastoma Pathology Classification, NB: neuroblastoma, GNB: ganglioneuroblastoma, Nbu: neuroblastoma undifferentiated, NB: neuroblastoma, pd: poorly differentiated, NBd: neuroblastoma differentiating, iGNB: intermixed ganglioneuroblastoma, nGNB: nodular ganglioneuroblastoma, GN: ganglioneuroma

As expected, GD2 expression was observed in almost all (96%) NTs and GD2 was only expressed by neuroblastic cells [12, 13]. GD2 immunostaining scores were significantly higher in neuroblastomas than in ganglioneuroblastomas ($p < 0.04$ using Student's t-test) and

ganglioneuromas ($p < 0.003$) and in undifferentiated neuroblastomas when compared with poorly differentiated neuroblastomas ($p < 0.01$) (**Supplementary Figure 1** and **Table I**). In the same patient, GD2 expression was similar in tumor and metastases (1.76 vs. 1.69) and before and after chemotherapy (2.33 vs. 2.0 respectively). There was no correlation between GD2 expression scores and age at diagnosis, clinical stage or the presence of *MYCN* amplification (**Table I**).



Supplementary Figure 1: GD2 is specifically expressed in neuroblasts. Paired normal tissue (adrenal gland (A) and sympathetic ganglia (B)) without any expression of GD2. Ganglioneuroma without expression of GD2 in Schwannian cells but with very rare expression of this protein in ganglion cells (C). Intermixed Ganglioneuroblastoma with expression of GD2 only in neuroblasts (D).

GD2 expression and subsequent relapse after anti-GD2 immunotherapy

Twenty patients received anti-GD2 immunotherapy. Five of these patients relapsed. In four of them, GD2 was expressed in less than 25% of tumor cells at diagnosis (**Figure 1A**). GD2 expression score was significantly lower in patients who subsequently relapsed (mean score 1.20 vs. 2.55, $p < 0.02$). These data suggest that the resistance to anti-GD2 immunotherapy is related to the presence of tumor GD2 negative cells.

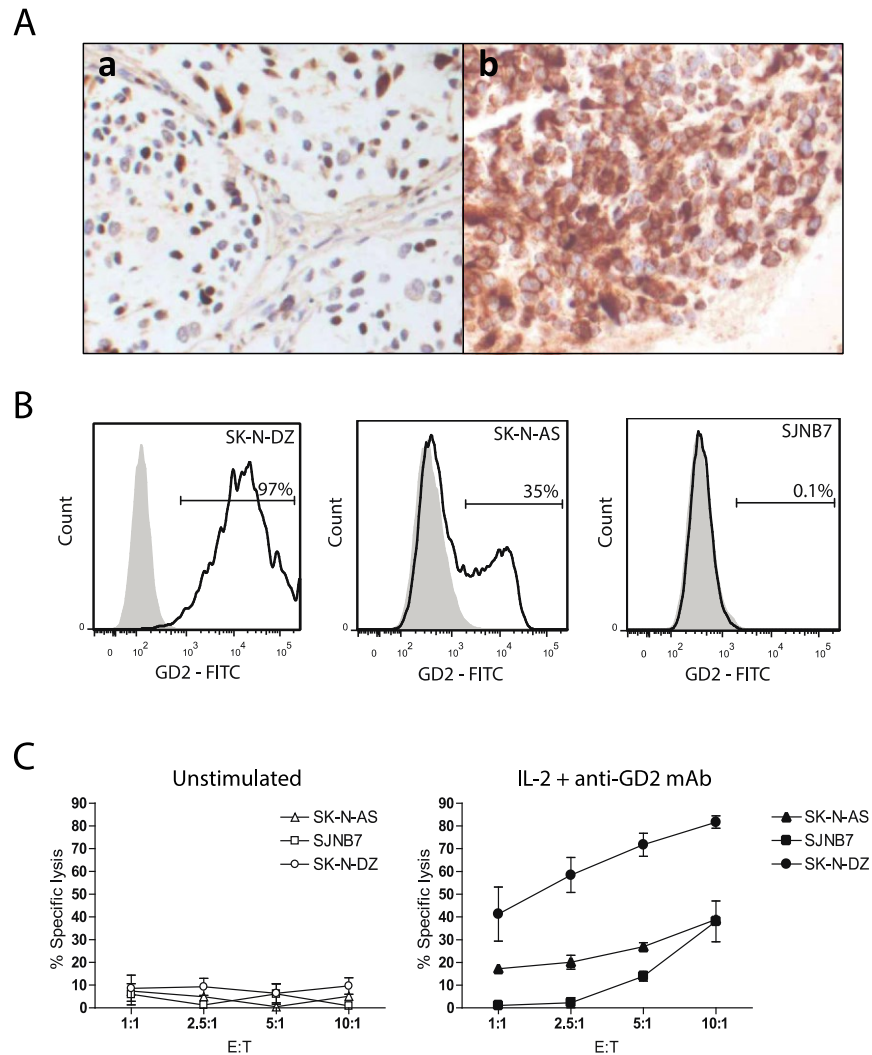


Figure 1. Heterogeneity of GD2 expression in neuroblastoma. GD2 differential expression in tumor samples from relapsing versus non-relapsing patients receiving anti-GD2 immunotherapy (A). Representative immunostainings of NB tumors at diagnosis from patients receiving anti-GD2 immunotherapy. A poorly differentiated neuroblastoma in a patient who relapsed (a) had an estimated score of 2+, i.e., 26-50 % of cells stained with GD2; an undifferentiated neuroblastoma in a patient who did not relapse (b) had a score of 4+, 76-100% of cells expressed GD2.

Resistance to NK cell-mediated ADCC depends on the percentage of GD2 negative neuroblastoma cells (B, C). Using three different NB cell lines differing by the proportion of GD2 positive cells, we assessed NK cell-mediated cytotoxicity in the presence of ch14.18 mAb and IL2 to mimic the clinical situation. (A) Representative flow cytometry analysis of GD2 surface expression on SK-N-DZ, SK-N-AS and SJNB7 cells. (B) Specific lysis of NB cell lines by NK cells in the absence (left panel) or presence of anti-GD2 mAb ch14.18 (right panel). The mean of three independent experiments is shown with standard error bars.

NK cell-mediated ADCC efficacy depends on GD2 expression on NB cells lines

Three NT cell lines (SK-N-DZ, SK-N-AS, SJNB7) were labelled with anti-GD2 mAb (14G2A), and an FITC-conjugated goat anti-mouse secondary antibody (BD Biosciences Mississauga, ON). Stained samples were analyzed using flow cytometry (Fortessa cytometer, BD Biosciences, San Jose, CA) and FlowJo software (TreeStar, Ashland, OR). NK cell-mediated cytotoxicity assays were performed as described previously [14], using CFSE labeling of target cells in the presence or absence of anti-GD2 mAb (ch14.18, 1 μ g/mL, National Cancer Institute). NK cells were purified using negative magnetic selection (purity above 90%). Effector and target cells were incubated in triplicate for three hours. Viable cells were counted after propidium iodide exclusion of dead cells and addition of Countbright counting beads (Invitrogen, Brulington, ON).

As shown in **Figure 1B**, 98% of SK-N-DZ, 20% of SK-N-AS and 0% of SJNB7 cells expressed GD2. All three NT cell lines are insensitive to NK-mediated lysis in the absence of ch14.18 and IL-2. In the presence of anti-GD2 and IL-2, tumor cell lines that less frequently express GD2 were more resistant to NK cell-mediated lysis (**Figure 1C**).

Discussion

Our analysis of GD2 expression by NT cells offers new insights into the causes of resistance to anti-GD2 immunotherapy. We confirm older data showing that GD2 expression is specific to NT and that almost all NT samples express GD2 [13, 15]. The proportion of tumor cells expressing GD2 has not been studied before. We found that not all cells within a tumor express GD2. The proportion of GD2-expressing cells does not differ between primary tumor and metastases or before and after chemotherapy. The proportion of GD2-positive cells was higher in neuroblastoma than in ganglioneuroblastoma and higher in undifferentiated than in differentiated neuroblastoma, but was not correlated with age, clinical stage and *MYCN* amplification.

Most importantly, we report a correlation between the proportion of GD2-negative cells at diagnosis and subsequent relapse in patients treated with immunotherapy. Accordingly, the proportion of GD2-negative cells within NT cell lines was correlated with the resistance to NK cell-mediated ADCC *in vitro*. If the presence of GD2-negative tumor cells within the tumor is in fact the cause of immunotherapy failure, relapsing tumors would be expected to express low levels of GD2 [16, 17]. However, Kramer et al. showed that GD2 was still expressed in relapsed tumors following immunotherapy with 3F8 monoclonal antibody [15]. Unfortunately, we did not have access to biopsies from relapsed patients to confirm whether their GD2 expression differed before and after treatment with ch14.18 anti-GD2 mAb.

In conclusion, relapse was correlated with the proportion of GD2-negative tumor cells in 20 patients treated with anti-GD2 mAb. Further studies are needed to confirm these data on a larger cohort of patients and to study GD2 expression in relapsed neuroblastoma. Indeed, these data may have consequences in personalizing immunotherapy for patients with high-risk neuroblastoma.

Conflict of interest statement: We declare that we have no conflict of interest

Acknowledgements: This work has been supported by the Charles-Bruneau Foundation.

References

1. Park, J.R., R. Bagatell, W.B. London, J.M. Maris, S.L. Cohn, K.K. Matthey, M. Hogarty, and C.O.G.N. Committee, *Children's Oncology Group's 2013 blueprint for research: neuroblastoma*. *Pediatr Blood Cancer*, 2013. **60**(6): p. 985-93.
2. Maris, J.M., M.D. Hogarty, R. Bagatell, and S.L. Cohn, *Neuroblastoma*. *Lancet*, 2007. **369**(9579): p. 2106-20.
3. Maris, J.M., *Recent advances in neuroblastoma*. *N Engl J Med*, 2010. **362**(23): p. 2202-11.
4. Linet, M.S., L.A. Ries, M.A. Smith, R.E. Tarone, and S.S. Devesa, *Cancer surveillance series: recent trends in childhood cancer incidence and mortality in the United States*. *J Natl Cancer Inst*, 1999. **91**(12): p. 1051-8.
5. Cohn, S.L., A.D. Pearson, W.B. London, T. Monclair, P.F. Ambros, G.M. Brodeur, A. Faldum, B. Hero, T. Iehara, D. Machin, V. Mosseri, T. Simon, A. Garaventa, V. Castel, K.K. Matthey, and I.T. Force, *The International Neuroblastoma Risk Group (INRG) classification system: an INRG Task Force report*. *J Clin Oncol*, 2009. **27**(2): p. 289-97.
6. Mugishima, H., *Current status of molecular biology and treatment strategy for neuroblastoma*. *Int J Clin Oncol*, 2012. **17**(3): p. 189.
7. Schleiermacher, G., V. Mosseri, W.B. London, J.M. Maris, G.M. Brodeur, E. Attiyeh, M. Haber, J. Khan, A. Nakagawara, F. Speleman, R. Noguera, G.P. Tonini, M. Fischer, I. Ambros, T. Monclair, K.K. Matthey, P. Ambros, S.L. Cohn, and A.D. Pearson, *Segmental chromosomal alterations have prognostic impact in neuroblastoma: a report from the INRG project*. *Br J Cancer*, 2012. **107**(8): p. 1418-22.
8. Yu, A.L., A.L. Gilman, M.F. Ozkaynak, W.B. London, S.G. Kreissman, H.X. Chen, M. Smith, B. Anderson, J.G. Villablanca, K.K. Matthey, H. Shimada, S.A. Grupp, R. Seeger, C.P. Reynolds, A. Buxton, R.A. Reisfeld, S.D. Gillies, S.L. Cohn, J.M. Maris, and P.M. Sondel, *Anti-GD2 antibody with GM-CSF, interleukin-2, and isotretinoin for neuroblastoma*. *N Engl J Med*, 2010. **363**(14): p. 1324-34.
9. Navid, F., M. Armstrong, and R.C. Barfield, *Immune therapies for neuroblastoma*. *Cancer Biol Ther*, 2009. **8**(10): p. 874-82.
10. Navid, F., V.M. Santana, and R.C. Barfield, *Anti-GD2 antibody therapy for GD2-expressing tumors*. *Curr Cancer Drug Targets*, 2010. **10**(2): p. 200-9.
11. Kononen, J., L. Bubendorf, A. Kallioniemi, M. Barlund, P. Schraml, S. Leighton, J. Torhorst, M.J. Mihatsch, G. Sauter, and O.P. Kallioniemi, *Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens*. *Nat Med*, 1998. **4**(7): p. 844-7.
12. Modak, S. and N.K. Cheung, *Disialoganglioside directed immunotherapy of neuroblastoma*. *Cancer Invest*, 2007. **25**(1): p. 67-77.
13. Wu, Z.L., E. Schwartz, R. Seeger, and S. Ladisch, *Expression of GD2 ganglioside by untreated primary human neuroblastomas*. *Cancer Res*, 1986. **46**(1): p. 440-3.
14. Cao, L.F., L. Krymskaya, V. Tran, S. Mi, M.C. Jensen, S. Blanchard, and M. Kalos, *Development and application of a multiplexable flow cytometry-based assay to quantify cell-mediated cytotoxicity*. *Cytometry A*, 2010. **77**(6): p. 534-45.
15. Kramer, K., W.L. Gerald, B.H. Kushner, S.M. Larson, M. Hameed, and N.K. Cheung, *Disialoganglioside G(D2) loss following monoclonal antibody therapy is rare in*

- neuroblastoma*. Clin Cancer Res, 1998. **4**(9): p. 2135-9.
16. Delgado, D.C., J.A. Hank, J. Kolesar, D. Lorentzen, J. Gan, S. Seo, K. Kim, S. Shusterman, S.D. Gillies, R.A. Reisfeld, R. Yang, B. Gadbaw, K.B. DeSantes, W.B. London, R.C. Seeger, J.M. Maris, and P.M. Sondel, *Genotypes of NK cell KIR receptors, their ligands, and Fcgamma receptors in the response of neuroblastoma patients to Hu14.18-IL2 immunotherapy*. Cancer Res, 2010. **70**(23): p. 9554-61.
 17. Tarek, N., J.B. Le Luque, M.M. Gallagher, J. Zheng, J.M. Venstrom, E. Chamberlain, S. Modak, G. Heller, B. Dupont, N.K. Cheung, and K.C. Hsu, *Unlicensed NK cells target neuroblastoma following anti-GD2 antibody treatment*. J Clin Invest, 2012. **122**(9): p. 3260-70.