

Université de Montréal

L'ingénierie des cellules NK entant que nouvelle immunothérapie ciblée contre le
rhabdomyosarcome

Par

Soraya Benhaddou

Département de microbiologie, infectiologie et immunologie

Faculté de médecine

Mémoire présenté en vue de l'obtention du grade de

Maitrise en microbiologie et immunologie

Juin 2023

© Soraya Benhaddou, 2023

Université de Montréal

Département de microbiologie et immunologie, Faculté de médecine

Ce mémoire intitulé

**L'ingénierie des cellules NK entant que nouvelle immunothérapie ciblée contre le
rhabdomyosarcome**

Présenté par

Soraya Benhaddou

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes

Etienne Caron

Président-rapporteur

Réjean Lapointe

Membre du jury

Résumé

Le rhabdomyosarcome (RMS) est le cancer des tissus mous le plus courant chez l'enfant, et moins de 30 % des patients à haut risque obtiennent une rémission. Par conséquent, il existe un besoin pour une immunothérapie nouvelle et efficace. Les cellules tueuses naturelles (NK), avec leur capacité intrinsèque à tuer les cellules cancéreuses, représentent un outil thérapeutique prometteur. Cependant, leur efficacité clinique est limitée. Ainsi, nous proposons de concevoir ces cellules avec un récepteur antigénique chimérique (CAR) qui permettra aux cellules NK de cibler plus efficacement les cellules de RMS. De plus, nous proposons aussi de concevoir grâce à la technologie CRISPR-Cas9, des NK n'exprimant pas NKG2A, un récepteur impliqué dans l'inhibition des cellules NK par le microenvironnement tumoral.

Nous avons développé un vecteur lentiviral codant pour une construction CAR reconnaissant B7-H3 et FGFR4, deux protéines surexprimées à la surface des cellules RMS, associées à une queue intracellulaire optimisée pour l'activation des NK. Les cellules NK primaires expansées ont été transduites et triées en fonction de l'expression du CAR, conduisant à une population de cellules CAR⁺-NK enrichie. L'efficacité des deux CAR a été évaluée par des tests cytotoxiques et de dégranulation contre les lignées cellulaires de RMS, RH-30 et RD, toutes deux exprimant B7-H3 et FGFR4. Les résultats préliminaires ont montré une augmentation de la cytotoxicité de 20 % par rapport aux NK de type sauvage pour les CAR anti-B7-H3. Les cellules NK ont également été transduites pour éliminer l'expression du gène KLRC1, codant pour NKG2A, en utilisant CRISPR Cas9. Ceci a permis d'augmenter la cytotoxicité des NK de 20% à 25% comparativement aux NK qui expriment NKG2A. Nous avons aussi combiné les deux modifications génétiques, obtenant ainsi des NK qui expriment un CAR contre les cellules du RMS et n'expriment pas NKG2A. Des résultats préliminaires nous ont permis d'observer que les NK doublement modifiées étaient 60% plus cytotoxiques que les NK non-transduites et 20% plus efficaces que les CAR-NK ou les NK n'exprimant pas NKG2A.

Ce projet sera une preuve de principe qu'une thérapie hautement innovante basée sur l'ingénierie des cellules NK est efficace et applicable au cancer solide.

Mots-clés : NK, CAR, rhabdomyosarcome, NKG2A, CRISPR-Cas9, HLA-E, B7-H3, FGFR4

Abstract

Rhabdomyosarcoma (RMS) is the most common soft tissue cancer in childhood, and less than 30% of high-risk patients achieve remission. Therefore, there is a need for new and efficient immunotherapy. Natural killer (NK) cells, with their intrinsic ability to kill cancer cells, represent a promising therapeutic tool. However, their clinical efficacy is limited. Thus, we propose to engineer these cells with a Chimeric Antigen Receptor (CAR) that will allow NK cells to target RMS cells more efficiently and through the knock-out of NKG2A, a receptor involved in the inhibition of NK cells by the tumor microenvironment.

We developed a lentiviral vector coding for a CAR construct recognizing B7-H3 and FGFR4, two proteins overexpressed at the surface of RMS cells, combined to an intracellular tail optimized for NK activation. Expanded primary NK cells were transduced and sorted based on CAR expression, leading to an enriched CAR⁺-NK cells population. Efficacy of both CARs was evaluated by cytotoxic and degranulation assays against RH-30 and RD RMS cell lines, both expressing B7-H3 and FGFR4. Preliminary results showed an increase in cytotoxicity of 20% compared to wild type NK for CAR anti-B7-H3. NK cells were also knocked-out for the gene coding for NKG2A, using CRISPR Cas9, thereby increasing cytotoxicity by 20% to 25%. The combination of both genetic modifications should significantly increase the efficacy of NK-cell based therapy in RMS. Indeed, preliminary results allowed us to observe that doubly modified NKs were more than 60% more cytotoxic than non-transduced NKs and 20% more effective than CAR-NKs or NKs not expressing NKG2A.

This project will be a proof of principle that a highly innovative therapy based on NK-cell engineering is efficient and applicable to solid cancer.

Keywords : NK, CAR, rhabdomyosarcoma, NKG2A, CRISPR-Cas9, HLA-E, B7-H3, FGFR4

Table des matières

1	INTRODUCTION.....	13
1.1	L'immunothérapie comme nouveau traitement contre le cancer.....	13
1.1.1	Les inhibiteurs de point de contrôle immunitaire	14
1.1.2	Les thérapies cytokiniques.....	16
1.1.3	Les thérapies basées sur les anticorps.....	17
1.1.4	L'immunothérapie à base de cellules dendritiques	19
1.1.5	Les vaccins à néo-antigènes.....	21
1.1.6	Les virus oncolytiques	23
1.1.7	Thérapies à base de lymphocytes T	26
1.1.7.1	Les lymphocytes infiltrants les tumeurs (TILs).....	26
1.1.7.2	Thérapies à base de lymphocytes T modifiées	28
1.2	L'impact de l'hypoxie en cancers solides	37
1.2.1	Les cellules NK comme potentiel traitement contre les cancers solides.....	39
1.2.2	Rhabdomyosarcome comme modèle de tumeur solide	43
1.2.2.1	L'expression d'HLA-E par les cellules du RMS comme mécanisme d'échappement immunitaire.....	45
1.2.2.2	CRISPR-Cas comme outil contre le rhabdomyosarcome	46
1.2.2.3	L'utilisation de vecteurs lentiviraux avec enveloppe de babouin pour une transduction efficace des NK contre le RMS.....	49
1.3	Problématique, hypothèses et objectifs	51
2	MATERIEL ET MÉTHODES.....	52
2.1	Réactifs et Milieux.....	52
2.2	Conception et clonage des constructions CAR.....	53
2.3	Production virale	56
2.3.1	Titration virale.....	57
2.4	Obtention des cellules NK	57
2.5	Expansion des cellules NK	58
2.6	Transduction de cellules NK	58
2.7	Lignées cellulaires utilisées et leur mise en culture	58
2.7.1	Transduction des lignées cellulaires	59
2.7.2	Triage cellulaire et génération de clones.....	59
2.8	Essaie de cytotoxicité	60
2.9	Essaie de dégranulation et mesure de l'IFN- γ	60
2.10	Phosphoflow.....	61
2.11	Génération de sphéroïdes.....	62
2.12	Design et clonage des ARNg.....	62

2.12.1	Génération des NK KLRC1 KO	64
2.13	Digital PCR	64
3	Résultats	66
3.1	Obtention, expansion et transduction des NK primaires.....	66
3.2	Évaluation de l'expression de la construction CAR anti-FGFR4	70
3.3	Évaluation de l'efficacité des CAR-NK anti-B7-H3 contre les lignées RMS	73
3.4	Évaluation de l'efficacité des CAR-NK anti-B7-H3 contre les sphéroïdes de RMS	76
3.5	L'évolution de l'expression du CAR anti-B7-H3 à la surface des cellules NK	78
3.6	Génération de NK-KLRC1 K.O et l'évaluation de leur efficacité.....	80
3.7	Génération de NK doublement modifiée : KLRC1 K.O et CAR anti B7-H3.....	82
4	Discussion	85
4.1	Obtention, expansion et transduction des NK primaires.....	85
4.2	Évaluation de l'expression de la construction CAR anti-FGFR4	87
4.3	Évaluation de l'efficacité des CAR-NK anti-B7-H3 contre les lignées RMS	89
4.4	Évaluation de l'efficacité des CAR-NK anti-B7-H3 contre les sphéroïdes de RMS	91
4.5	L'évolution de l'expression du CAR anti-B7-H3 à la surface des cellules NK	92
4.6	Génération de NK-KLRC1 K.O et l'évaluation de leur efficacité.....	93
4.7	Génération de NK doublement modifiés : KLRC1 K.O et CAR anti B7-H3	95
5	Perspectives	97
6	Conclusions	98
7	Références bibliographiques	99

Liste des tableaux

- Tableau 1.** – Séquences d'ARN guides sélectionnées pour combiner avec CRISPR Cas963
- Tableau 2.** – Séquences des amorces utilisées pour l'amplification de la construction CAR ANTI-FGFR4.....65
- Tableau 3.** – Programme utilisé pour l'amplification de la construction CAR ANTI-FGFR465

Liste des figures

Figure 1. –	Représentation des différents mécanismes et stratégies utilisés par les thérapies à base d’anticorps.....	19
Figure 2. –	Représentation des différentes composantes du récepteur antigénique chimérique (CAR)	30
Figure 3. –	Les différentes générations de CAR.....	33
Figure 4. –	Les récepteurs activateurs et inhibiteurs exprimés à la surface des cellules NK et leurs ligands.....	40
Figure 5. –	Différents mécanismes par lesquelles les cellules eucaryotes réparent une cassure d’ADN double brins.....	48
Figure 6. –	Stratégie de clonage des scFv dans la construction CAR du vecteur lentiviral.....	56
Figure 7. –	Stratégie d’acquisition des cellules NK en cytométrie en flux.....	67
Figure 8. –	Expression de B7-H3, titration virale d’un lentivirus codant pour CAR anti B7-H3 et transduction des NKAES.	68
Figure 9. –	Titration virale et transduction des NKAES avec la construction CAR anti FGFR4.....	69
Figure 10. –	Stratégies utilisées pour la détection du CAR anti-FGFR4	70
Figure 11. –	Détection du CAR après la modification de la construction afin d’éliminer CH2CH3 et ajouter ECFP	72
Figure 12. –	Comparaison de la cytotoxicité des NK non transduits (NT) et des NK-CAR anti-B7-H3 face à RD et RH-30.....	74
Figure 13. –	Évaluation de la cytotoxicité des NK non-transduit et CAR anti-B7-H3 via la production de granules cytotoxiques et IFN- γ	75
Figure 14. –	Évaluation de la cytotoxicité des NK NT et CAR anti-B7-H3 contre des sphéroïdes	77
Figure 15. –	Évolution de l’expression du CAR anti-B7-H3 à la surface des cellules NK transduites et triées.....	79
Figure 16. –	Évaluation de l’activation des CAR-NK lors de la semaine d’expansion	80
Figure 17. –	Évaluation de l’efficacité des NK KLRC1 K.O contre les cellules RMS	81
Figure 18. –	Évaluation de l’efficacité des NK KLRC1 K.O contre les cellules RMS	82
Figure 19. –	Évaluation de l’efficacité des NK KLRC1 K.O et CAR anti-B7-H3 contre les sphéroïdes formés à partir de cellules RH-30	84

Liste des sigles et abréviations

ADCC: « Antibody-dependent cellular cytotoxicity »

ADN: acide désoxyribonucléique

AFP: Alpha-fœtoprotéine

AICD : « Activation-Induced Cell Death »

AML : Leucémie myéloïde aigue

ANGPT2 : Angiopoietine 2

APC: « Antigen Presenting Cells »

ARN: acide ribonucléique

ASCT: « Alanine Serine Cysteine Transporters »

ATP: Adenosine Triphosphate

B7-H3: « B7 homolog 3 protein »

BiTE : « Bispecific T-cell Engager »

BiKEs: « Bispecific Killer cell Engager »

CAR: « Chimeric Antigen Receptor »

CCL2: « Chemokine Ligand 2 »

CiTE: « Checkpoint inhibitory T cell–Engaging »

CMH: Complexe Majeur d’Histocompatibilité

CRISPR: « Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats »

CRS : « Cytokine release syndrome »

CTLA-4: « Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4 »

DAP : « DNAX-activation protein 12 »

ECFP : « Enhanced Cyan Fluorescent Protein »

EFS : « Elongation Factor 1 α Short »

FACS : « Fluorescence Activated Cell Sorting »

FDA: « Food and Drug Administration »

FGFR4: Fibroblast growth factor receptor 4

FL: Lymphome Folliculaire

GFP: « Green Fluorescent Protein »

GM-CSF: « Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor »
GvHD: « Graft-versus-host disease »
GvT: « Graft-versus-tumor effect »
HDR: « Homology-directed repair »
HGBCL: lymphome B de haut grade
HIF : Facteurs Inductibles à l'hypoxie
HLA: « Human Leukocyte Antigens »
ICOS: « Inducible T-cell COStimulator »
IFN: Interféron
IFNAR: «The interferon- α/β receptor»
IGF2: « Insulin-like growth factor 2 »
IL: interleukine
iPSCs : « Induced Pluripotent Stem Cells »
ITAM: « Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motifs »
ITIM: « Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibitory Motif »
ITISM: « Immunoreceptor Tyrosine-based Switch Motif »
KIR: « Killer-cell immunoglobulin-like receptors »
KLRC1: « Killer Cell Lectin-Like Receptor Subfamily C, Member 1 »
LDL: « Low-Density Lipoprotein »
LAMP: « Lysosomal Membrane Proteins »
MCL: lymphome à cellules du manteau
MCP: « Monocyte chemoattractant protein »
MDSC: « Myeloid-derived suppressor cell »
MLV: Virus de la leucémie murine
MMEJ: « Microhomology-mediated end joining »
NHEJ: « Non-Homologous End-Joining »
NK: « Natural Killer »
NKG2: « killer cell lectin-like receptor »
pRB : Protéine du rétinoblastome

PAMPs: « Pathogen-Associated Molecular Patterns »
PBMCs: « Peripheral Blood Mononuclear Cells »
DAMPs: « Damage-Associated Molecular Patterns »
DC: cellule dendritique
PAM: « Protospacer adjacent motif »
PD-L1: « Programmed death-ligand »
PD-1: « Programmed Cell Death Protein 1 »
PCR: « Polymerase Chain Reaction »
PP2A: Protéine phosphatase 2
RMS: Rhabdomyosarcome
RPL32: « Ribosomal Protein L32 »
RRE : « Rev response éléments »
ScFv: « single-chain variable fragment »
SCID: « Severe Combined Immunodeficiency »
SFFV: « Spleen Focus-Forming Virus »
SHP: « Small Heterodimer Partner »
STAT: « Signal transducer and activator of transcription »
TAA: « Tumor-Associated Antigen »
TCR: Récepteur Antigénique des lymphocytes T
TFAP2B: « Transcription Factor AP-2 Beta »
TILs: « Tumor-infiltrating lymphocytes »
TLR: « Toll-Like Receptor »
TNF: « Tumour Necrosis Factor »
Treg: Lymphocyte T régulateur
TriKEs: « Trispecific Killer cell Engagers »
VEGF: « Vascular Endothelial Growth Factor »
VIH: Virus de l'Immunodéficience Humaine
VSV-G: « Vesicular Stomatitis Virus G »

Remerciements

Je tiens à remercier le Dr Elie Haddad pour m'avoir permis d'effectuer ma maitrise au sein de son laboratoire et de m'avoir encadré et dirigé pendant mes travaux de recherche. J'aimerais aussi remercier Kathie Béland, Hugo Roméro, Delphine Guipouy, Aissa Benyoucef ainsi que tous les autres membres du laboratoire pour m'avoir conseillé pendant ces deux ans de maitrise. Je voudrais aussi remercier la fondation du CHU Sainte Justine pour m'avoir accordé une bourse durant ma maitrise. Finalement, merci à mes parents pour m'avoir accompagné pendant tout mon parcours académique.

1 INTRODUCTION

1.1 L'immunothérapie comme nouveau traitement contre le cancer

Les patients souffrant de cancer sont traités avec les traitements conventionnels tels que la chirurgie, la radiothérapie et la chimiothérapie. Bien que 50-60% de ces patients reçoivent de la radiothérapie combinée avec des chirurgies et/ou des traitements de chimiothérapies(1), leurs taux de survie demeurent bas, la toxicité des traitements est élevée et la spécificité basse(1). Cependant, durant les dernières décennies, notre perception du traitement des cancers s'est tournée vers l'immunothérapie. Au XIX^{ème} siècle, William Bradley Coley, le père de l'immunothérapie, observe que 47 patients atteints du cancer se retrouvent en rémission suite à l'infection érysipèle(2). Il conclut que l'infection active le système immunitaire, ce qui permet de combattre le cancer métastatique. En 1957, Thomas et Brunet proposent la théorie de l'immunosurveillance(2). Ils proposent que les lymphocytes sont capables de détecter les cellules pré-cancéreuses et de les éliminer, ce qui expliquerait pourquoi l'incidence du cancer ne soit pas si élevée dans la population (7). À la fin du XX^{ème} siècle, Stutman montre que chez les souris nues, il y a plus de tumeurs et que celles-ci ne régressent pas comparativement aux souris de type sauvage qui ont un système immunitaire compétent (2). Bien que ces résultats soutiennent la théorie de l'immunosurveillance de Thomas et Brunet, il a fallu attendre quelques années de plus pour que Schreiber, Dunn, Old et leurs équipes montrent que les lymphocytes T sont capables d'effectuer l'immunosurveillance et de développer une réponse contre la tumeur (2). Avec le développement des technologies et des connaissances, de nouveaux types de cellules immunitaires ont été découvertes ainsi que leurs fonctions. Il a aussi pu être montré que les cellules cancéreuses ont des mutations dans leur génome donnant lieu à l'apparition de néo-antigènes, que la tumeur forme un micro-environnement immunosuppresseur, etc. Globalement, ces connaissances ont permis de développer des immunothérapies ciblant les cellules cancéreuses et/ou leur environnement, comme les inhibiteurs de point de contrôle immunitaire, les traitements à base de cytokines, les anticorps bispécifiques et les thérapies cellulaires, entre autres.

1.1.1 Les inhibiteurs de point de contrôle immunitaire

Lorsqu'on se retrouve dans un contexte de tumeurs malignes, les cellules tumorales s'adaptent pour échapper à la réponse immunitaire. Un de ces mécanismes est la surexpression du ligand « Programmed Cell Death Ligand 1 » (PD-L1) à la surface des cellules tumorales. Ce ligand interagit avec « Programmed Cell Death Protein 1 » (PD-1) exprimé à la surface des cellules T activées (3). PD-1 contient des domaines ITIM ainsi qu'un motif ITSM, qui lorsqu'activés, se lient aux phosphatases SHP-2 et PP2A qui inhibent l'activation de la cellule (4). Ainsi lorsque les lymphocytes T se retrouvent en contact avec la tumeur, ils n'expriment pas ou peu PD-1. Après être activé par la tumeur, il y a une activation transcriptionnelle du gène exprimant PD-1 (6-12 heures). Lorsque celui-ci est exprimé il interagit avec PD-L1 fortement exprimé par les cellules tumorales empêchant ainsi qu'un lymphocyte T de s'activer. L'engagement de PD-1 cause la diminution de la sécrétion cytokinique ainsi que la prolifération (5). D'un autre côté, suite à l'activation des lymphocytes T effecteurs CD4⁺ et CD8⁺, il y a une augmentation de l'expression du récepteur CTLA-4. Celui-ci rentre en compétition avec CD28, le récepteur responsable du signal de costimulation qui interagit avec CD80 ou CD86 exprimé à la surface des cellules présentatrices d'antigènes (APC). CTLA-4 se lie avec une plus grande affinité que CD28 à CD80 et CD86, venant interférer avec l'activation cellulaire, la formation de la synapse et l'activation des APC. Il agit donc comme un récepteur inhibiteur. L'effet immunosuppresseur de CTLA-4 va surtout s'exercer au niveau des organes lymphoïdes secondaires(5), où elle empêche l'interaction de CD28 avec CD80, limitant ainsi le signal intracellulaire ce qui ultimement, bloque l'activation du lymphocyte T et limite la production de lymphocytes effecteurs (6). Ainsi, CTLA-4 joue aussi un rôle critique dans le maintien de la tolérance.

Les inhibiteurs de point de contrôle immunologiques sont une sorte d'immunothérapie. Ils visent à s'interposer entre les récepteurs inhibiteurs et leurs cibles. En 2011 le premier anticorps monoclonal humain ciblant CTLA-4, l'Ipilimumab, a été approuvé par la Food and Drug Administration (FDA) pour traiter les patients atteints de mélanome au stade métastatique (6). Le microenvironnement tumoral du mélanome recrute beaucoup de lymphocytes T régulateurs (Treg), ceux-ci expriment fortement CTLA-4, ce qui leur permet de moduler la réponse immunitaire et ainsi permettre à la tumeur de proliférer. L'Ipilimumab, en se liant à CTLA-4

exprimé à la surface des Treg cause la déplétion de ceux-ci via le mécanisme d'ADCC. En effet, la partie Fc de l'Ipilimumab se lie au récepteur Fc-gamma exprimé à la surface des macrophages se trouvant dans le microenvironnement tumoral activant ainsi l'ADCC (6). En 2015, le Nivolumab, un anticorps humain monoclonal anti-PD-1 qui empêche l'interaction entre PD-1 et ses ligands PD-L1 et PD-L2, a été approuvé par la FDA pour traiter les patients souffrant de mélanome, carcinome rénal et carcinome squameux. D'autres anticorps ciblant PD-1 ont par la suite fait leur apparition sur le marché, comme Pembrolizumab, qui combiné avec la chimiothérapie, augmente le pourcentage de survie chez des patients souffrants de cancers rares et avancés (5). Il existe aussi des anticorps ciblant les ligands de PD-1, qui peut être exprimé par les cellules tumorales et certaines cellules du système immunitaire. L'Atezolizumab, approuvé en 2016, est un anticorps monoclonal anti PD-L1 utilisé comme adjuvant suite à la chirurgie. Il contient une partie Fc modifié afin de ne pas déclencher une déplétion via ADCC des cellules immunitaires exprimant PD-L1(5). D'autres anticorps monoclonaux anti-PD-L1 ont fait leur apparition sur le marché par la suite comme Avelumab et Durvalumab, qui sont utilisés seuls ou en combinaison avec d'autres traitements afin d'améliorer la survie sans progression des patients réfractaires souffrant de certains cancers avancés(5). Bien que ces traitements soient efficaces contre certains cancers, ils peuvent provoquer des effets secondaires importants. Comme mentionné précédemment, un des rôles critiques de CTLA-4 est la tolérance et la prévention de l'auto-immunité. Donc l'utilisation d'un anticorps antagoniste de CTLA-4 peut causer de l'auto-immunité et de l'inflammation tels que des colites, et entérocolites(7). Il est aussi possible que la tumeur soit PD-L1 négative et dans ce cas-là les traitements anti PD-1 ou PD-L1 ne sont pas efficaces. De plus, il est aussi possible qu'en dépit de l'action des inhibiteurs de point de contrôle, l'activation des cellules T CD8⁺ et CD4⁺ ne soit pas possible. Les causes peuvent être multiples : l'accès des lymphocytes à la tumeur est limité, la tumeur ne présente pas de néo antigènes aptes à être présentés par les APC et reconnus par les lymphocytes T, les mécanismes de signalisation immunitaires ne sont plus fonctionnels, l'infiltration des lymphocytes T est faible, la tumeur ou le lymphocyte exprime d'autres marqueurs immunosuppresseurs ou l'exhaustion des lymphocyte est tel que même en utilisant un inhibiteur de point de contrôle on est pas capable de récupérer le phénotype effecteur (8).

1.1.2 Les thérapies cytokiniques

Les cytokines jouent un rôle important dans l'activation du système immunitaire. L'interféron de type I est produit par plusieurs types cellulaires en réponse à une stimulation. Il existe deux types d'interférons: type I (sous types IFN- α et β) et II (sous types IFN- γ) (9). Les interférons signalent à travers des récepteurs spécifiques. Les IFN de type I, se lie aux récepteurs IFNAR1 et IFNAR2, et causent une cascade de signalisation à travers STAT1 et STAT2. Ceci cause l'augmentation de l'expression du CMH de classe I, enclenche l'apoptose, a un effet anti angiogénique, polarise la réponse T vers une réponse Th1, permet la survie et augmente la cytotoxicité des cellules NK, permet la génération de cellules T CD8⁺ mémoires et la maturation des cellules dendritiques (2). Dans la famille des interférons de type II, nous retrouvons l'IFN- γ , produit par les cellules NK, NKT, T CD4⁺, T CD8⁺, macrophages, cellules dendritiques et cellules B. La liaison de l'IFN- γ avec son récepteur permet l'activation des macrophages, l'expression des molécules de costimulation par les cellules présentatrices d'antigènes, la polarisation Th1 chez les T CD4⁺(10).

IFN- α est approuvé pour l'utilisation comme adjuvant suite à une résection de mélanome de stade III ou IV (11). La combinaison d'IFN- α avec anti-CTLA-4 chez les patients souffrant de ce même cancer donnait un taux de réponse global de 24% avec des rémissions à long terme (10). Dans une méta analyse faite par Bazarbachi et son équipe (12), ils montrent que la combinaison de l'IFN- α avec l'azidothymidine cause une réponse chez la majorité des patients souffrants de lymphome à cellules T de l'adulte.

L'IFN- γ a aussi été considéré comme étant un potentiel candidat pouvant avoir un effet thérapeutique. Cependant, il n'a jamais été observé que l'administration de IFN- γ seul ait un effet chez les patients souffrant de cancer, probablement parce que l'IFN- γ augmente la capacité immunosuppressive des cellules myéloïdes suppressives (13).

Une autre cytokine utilisée en clinique est l'IL-2. Elle est produite surtout par les T CD4⁺ polarisés en Th1 et en moindre quantité par les T CD8⁺, NK, et NKT. Cette cytokine soluble, peut agir en cis ou en trans. Elle est reconnue par le récepteur spécifique IL-2R α , permet le développement et le prolifération des cellules T et NK, une polarisation Th1 et Th2, stimule les lymphocytes T

régulateurs (Treg) et permet de contrôler la réponse immunitaire en causant la mort cellulaire suite à l'activation (14).

IL-2 est une cytokine produite principalement par les cellules T activées. Elle est principalement utilisée pour la production et l'expansion de cellules T autologues pour les traitements cellulaires à base de cellules T. Elle a déjà été approuvée par la FDA pour traiter le mélanome métastatique ou le carcinome rénal, cependant son utilisation demeure limitée, car plusieurs cellules dont les cellules endothéliales expriment le récepteur à l'IL-2. La liaison de l'IL-2 dans ce type cellulaire cause une vasodilatation donnant lieu au syndrome de fuite capillaire. De plus, l'IL-2 peut aussi favoriser l'expansion des lymphocytes T régulateurs et augmenter l'immunosuppression au niveau de la tumeur. Finalement, la courte demi-vie de l'IL-2 fait en sorte que les patients doivent recevoir de hautes doses de façon répétée pour pouvoir observer un effet (15).

1.1.3 Les thérapies basées sur les anticorps

Les thérapies utilisant des anticorps, ciblent certains antigènes exprimés soit par la cible soit par les cellules effectrices, par exemple les thérapies de utilisant des anti PD-1 ou anti PD-L1. Mais il existe aussi certaines thérapies qui utilisent des anticorps capables de reconnaître un antigène exprimé sur la cible et un autre antigène exprimé par la cellule effectrice : les anticorps bispécifiques. Les premières thérapies à base d'anticorps bispécifiques à être acceptées, visaient l'activation des cellules T. Les anticorps bispécifiques redirigeant les cellules T (BiTE), contre les cellules leucémiques CD19⁺(16). La structure du BiTE consiste en deux chaînes dérivées du fragment variable d'un anticorps (scFv) capable de reconnaître un antigène, reliées par un séparateur conférant une certaine flexibilité aux deux scFv (16). Le mécanisme d'action de ces anticorps se base sur la reconnaissance d'antigènes associés aux tumeurs (TAA), dans ce cas CD19⁺, et d'un antigène non variable exprimé à la surface des lymphocytes T comme CD3. De cette façon, les cellules T seraient activées via l'engagement du CD3 et de manière indépendante du TCR. Il existe des anticorps bispécifiques capables de lier des lymphocytes T (BiTEs), de lier des cellules NK (BiKEs) et des anticorps capables de lier trois antigènes différents et d'activer les cellules NK (TriKE) en liant l'IL-16 ou l'IL15 (17).

Le premier traitement à base de BiTE utilisé est Blinatumomab, contre le lymphome de Hodgkin. Lors de la phase I de l'essai clinique, les patients ont reçu par intraveineuse des doses de 0.75-13ug/m² trois fois par semaine. L'essai clinique a dû être arrêté à cause de l'apparition d'importants effets secondaires tels que le syndrome de tempête cytokinique (16). Des études subséquentes ont démontré que l'efficacité du traitement était dose dépendante, plaçant la dose limite tolérée à 60ug/m², pouvant causer une neurotoxicité de grade 3 réversible. Le taux de réponse objectif était à 69%, avec une survie globale de 50% à 8-10 ans. Cependant, pour atteindre un tel taux de survie sur le long terme, une administration de 60ug/m² est nécessaire (16).

Les résultats des nombreux essais cliniques ont montré que les BiTEs ont un potentiel thérapeutique. Cependant, il y a des mécanismes d'échappement immunitaire et de résistance aux traitements. Bien que les BiTEs interagissent avec CD3 pour activer le lymphocyte T, ce dernier peut exprimer des marqueurs d'exhaustion empêchant son activation. Un des marqueurs peut être PD-1 (**Figure 1**). Une nouvelle stratégie a été développée pour contourner l'exhaustion causée par la surexpression de PD-1: les inhibiteurs de point de contrôle activateurs de cellules T (CiTE), capables de reconnaître les antigènes associés aux tumeurs (TAA), CD3 et de bloquer l'interaction PD-1-PD-L1.

Un autre mécanisme qui cause la résistance aux BiTEs est la régulation à la baisse des antigènes tumoraux visés par le BiTE. Dans le premier essai clinique de blinatumomab, a montré que 10% des patients ayant rechuté présentaient une tumeur CD19^{neg}. Afin d'éviter ce type de résistance, des immunothérapies combinatoires multi-ciblées sont utilisées afin de cibler deux antigènes tumoraux à la fois (16).

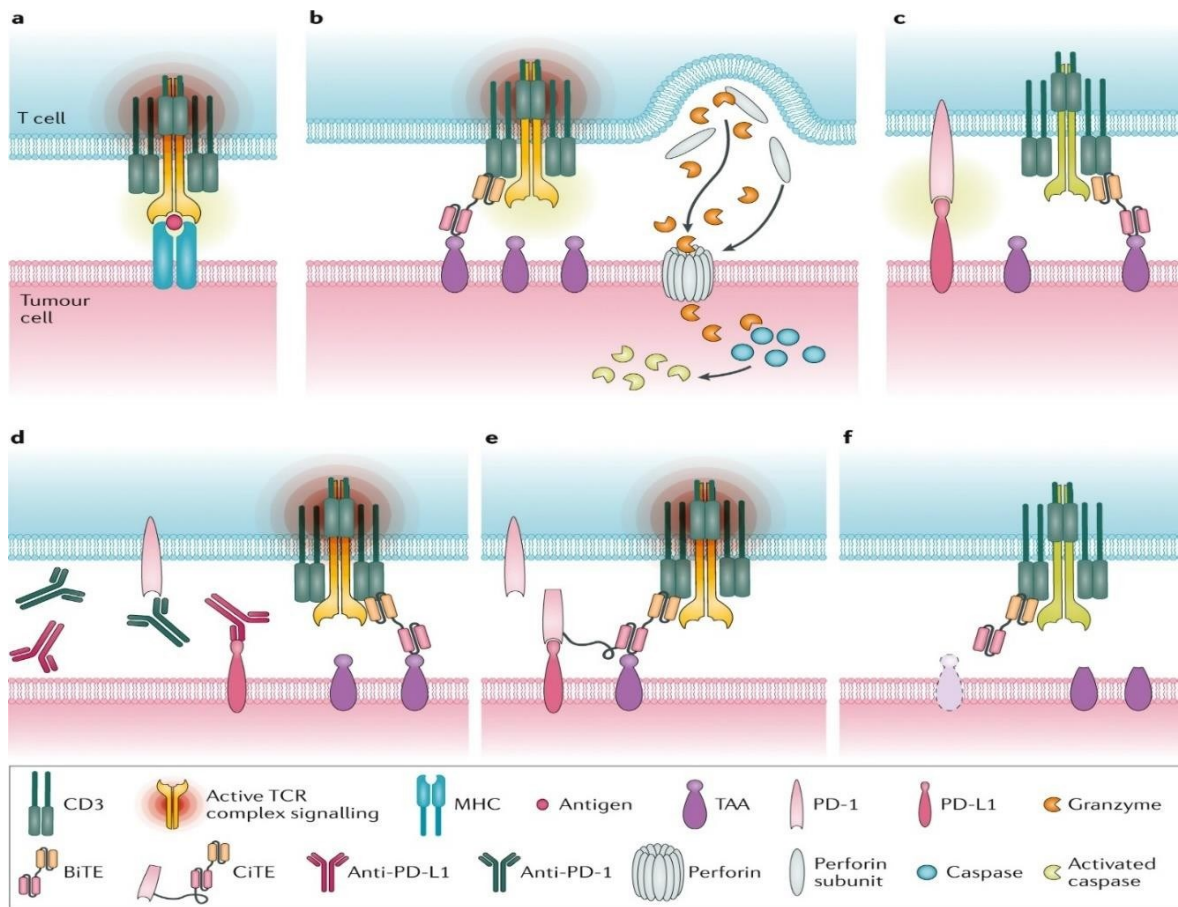


Figure 1. – Représentation des différents mécanismes et stratégies utilisés par les thérapies à base d'anticorps.

(A) En bleu, l'activation du lymphocyte T via la reconnaissance par le récepteur antigénique des lymphocytes T (TCR) du peptide présenté par le CMH de classe I exprimé à la surface de la cellule cible. **(B)** L'activation du lymphocyte T indépendamment du TCR, grâce à la liaison du BiTE au CD3ε et à l'antigène tumoral (TAA) exprimé par la cellule cible et libération de granzymes et perforines par le lymphocyte T suite à cette interaction. **(C)** Liaison du BiTE au CD3ε et au TAA exprimé par la cellule cible sans pouvoir activer le lymphocyte T à cause de l'interaction de PD-1 et PD-L1. **(D)** La combinaison du BiTE et des anti-PD-1 et anti-PD-L1 permet d'activer le lymphocyte T même en présence des récepteurs inhibiteurs. **(E)** L'utilisation de CiTE permet de bloquer PD-L1, et d'activer le lymphocyte T en liant CD3ε et le TAA. **(F)** La cellule cible peut résister au traitement à base de BiTE en régulant à la baisse le TAA, empêchant ainsi la formation de la synapse et l'activation de la cellule T. (Droits obtenus de Goebeler et al., 2020)

1.1.4 L'immunothérapie à base de cellules dendritiques

Les cellules dendritiques sont capables de phagocyter des antigènes présents dans l'environnement et de les traiter, afin de pouvoir les charger sur les molécules de CMH de classe I et II (18) et de les présenter aux cellules T. Cependant, la présentation de l'antigène (signal 1)

n'est pas suffisante pour activer la cellule T. En effet, celle-ci a besoin d'avoir un signal 2 et 3. Ces signaux consistent en des molécules de costimulation (CD80/86) et des cytokines. L'expression de ces molécules et de ces cytokines dépendent de la reconnaissance de certains motifs conservés chez les pathogènes (PAMPs) ou des signaux associés au dommage cellulaire (DAMPs) (19). Il existe plusieurs sous types de cellules dendritiques, selon les différents récepteurs exprimés à leur surface, comme les « pattern recognition récepteurs » (PRR) tel que les « Toll Like Receptors » (TLR) qui reconnaissent ces signaux de danger. Le sous type DC1s présente les antigènes aux cellules T CD8⁺ et les polarisent vers un phénotype Th1. Elles sont spécialisées dans la présentation croisée et produisent IL-12 ainsi que l'interféron de type I et II. Le sous type DC2s expriment à leur surface un large répertoire de PRR. Selon le contexte elles peuvent induire des cellules Th17, Th1 et Th2 (20). Elles sont aussi responsables du maintien de l'homéostasie intestinale en maintenant les fonctions de la population T régulatrice. Dans le microenvironnement tumoral, les cellules dendritiques intègrent et traitent les TAA et les présentent via le CMH de classe I ou/et de classe II. Souvent, la présence de sous type DC1 est associé à un meilleur pronostic. Il existe plusieurs approches thérapeutiques ciblant les cellules dendritiques dans le contexte du cancer.

L'injection des adjuvants qui lient les TLR exprimés à la surface des cellules dendritiques activent celles-ci et induisent la production de cytokines pro-inflammatoires et favorise la présentation croisée. Actuellement, l'adjuvant poly (I:C) contre le mélanome, se montre prometteur lors d'une étude pilote. L'injection de poly (I:C) en intra tumoral s'est montré sûre et efficace chez 1 des 8 patients avec un cancer solide. Le sous type de cellules dendritiques visé par cette thérapie était les DC1 à cause de leur haute expression de TLR3 (21). D'un autre côté, l'administration d'antigènes associés aux tumeurs a aussi été pensée comme une option de traitement. Une telle approche, connu comme vaccination, consiste à administrer des TAA synthétiques, des virus recombinants exprimant les TAA ou le lysat tumoral irradié (21). Concernant ce dernier, la manière dont s'engendre la mort des cellules tumorales influence la réponse immunitaire. Les tumeurs traitées à l'acide hypochlorique ou irradiées à l'UVB causent une meilleure réponse immunitaire et sont approuvées cliniquement. Lors de ces traitements, il est aussi important d'induire la maturation des cellules dendritiques afin qu'elles soient capables d'activer les cellules

T. Pour cela, la vaccination utilisant des vecteurs viraux exprimant des TAA, les fait exprimer aussi des facteurs d'activation dendritiques tels que poly(I:C) ou GM-CSF(22). De la même façon, l'administration des TAA peut se faire via des nanoparticules exprimant à leur surface des anticorps ciblant des récepteurs de cellules dendritiques comme les lectines de type C. Pour améliorer la performance de ce traitement, les nanoparticules peuvent aussi contenir des adjuvants. Bien que les traitements soient efficaces, leur efficacité dépend du fardeau mutationnel de la tumeur. Plus celle-ci est mutée, plus le vaccin est efficace (23).

Le transfert autologue de cellules dendritiques est aussi un possible traitement contre certains cancers. En effet, l'extraction de cellules dendritiques de sang des patients permet de récupérer des cellules pDC et cDC2. Elles sont par la suite pulsées avec des peptides provenant de TAA. Les cellules dendritiques exprimant les peptides d'intérêt sont par la suite réinjectées aux patients. Bien que les cellules cDC1 soient plus efficaces à présenter les antigènes et activer les cellules T CD8⁺, celles-ci ne sont pas disponibles en assez grand nombre dans le sang périphérique, empêchant ainsi leur utilisation *in vitro*. Une autre limite du transfert autologue est l'épuisement ou la dysfonction des cellules dendritiques (24).

En résumé, les cellules dendritiques dans le contexte du cancer sont souvent dysfonctionnelles à cause du microenvironnement immunosuppresseur de la tumeur. Ainsi, les cellules dendritiques sont dans l'incapacité de traiter les antigènes tumoraux et même si ceux-ci sont présentés, les cellules n'expriment pas les cytokines pro-inflammatoires ainsi que les molécules de costimulation nécessaires à l'activation des cellules T. Cependant, les connaissances actuelles sur les cellules dendritiques ont permis de développer des traitements leur permettant de s'activer tels que les adjuvants et leur permettant d'exprimer les TAA tels que les transferts adoptifs ou les nanoparticules conjuguées avec des anticorps ciblant les cellules dendritiques.

1.1.5 Les vaccins à néo-antigènes

À la suite des mutations qui causent la cancérisation des cellules, le répertoire des peptides présentés à la surface par les molécules de CMH peut changer. Ainsi, les cellules cancéreuses peuvent commencer à exprimer des antigènes qui sont normalement exprimés seulement par les cellules de la lignée germinale(25). Aussi, lors de la cancérisation l'accumulation de mutations

peut donner lieu à la formation de nouvelles séquences d'acides aminés qui peuvent se retrouver exprimés à la surface par les molécules de CMH (25). Ces nouveaux peptides qui sont absents dans les cellules saines sont connus sous le nom de néo-antigènes.

Comme mentionné précédemment, certains traitements contre le cancer permettent de libérer des antigènes tumoraux ainsi que des signaux de danger (DAMPs) qui permettent d'activer les cellules présentatrices d'antigènes pour qu'elles traitent les antigènes et les présentent aux cellules effectrices T CD4⁺ et CD8⁺. L'objectif des vaccins dans le contexte du cancer est d'activer le système immunitaire et de monter une réponse contre les antigènes tumoraux afin d'obtenir une régression tumorale ou d'éliminer les cellules tumorales résiduelles qui peuvent causer une rechute (26). Les vaccins contre le cancer incluent, comme mentionné précédemment, l'administration d'antigènes et d'adjuvants ou le transfert autologue de cellules dendritiques pulsées aux TAA (26). Cependant, le succès des vaccins est très limité, ceci est dû au choix des antigènes peu immunogènes donnant lieu à un bas taux de réponse et n'ont pas été capables de générer une réponse de cellules T efficace. Une autre explication est que les traitements utilisant des vaccins pour des tumeurs dites 'froides', où les cellules effectrices n'infiltrent pas la tumeur et il y a absence de milieu inflammatoire. Ces tumeurs sont donc réfractaires aux vaccins. Aussi, lorsque le fardeau tumoral est haut et la présence importante de cellules myéloïdes immunosuppressives, les vaccins sont moins efficaces. De façon générale, les vaccins contre le cancer peuvent être efficaces lorsque l'immunosuppression au niveau de la tumeur est limitée ou réduite, le fardeau tumoral est bas et il y a présence de cellules T CD4⁺ et T CD8⁺ infiltrés.

Pour surpasser certaines de ces problématiques, le développement de vaccins à néo-antigènes se montre prometteur. Les mutations qui surgissent au sein de cellules cancéreuses peuvent générer des 'nouveaux' antigènes appelés néo-antigènes. Ceux-ci peuvent être reconnus par les cellules T, car elles n'ont pas été éliminées lors de la sélection négative au niveau du thymus parce que cet antigène n'est pas exprimé par les cellules saines (25). Plusieurs études cliniques ont montré l'immunogénicité et l'efficacité des vaccins à néo-antigènes. En effet, l'administration de ces vaccins ont permis une réponse T CD4⁺ et T CD8⁺, l'infiltration de cellules T dans la tumeur et une amélioration de la survie des patients. Cependant, ce ne sont pas toutes les tumeurs qui expriment des néo-antigènes. L'efficacité de ce traitement dépend donc du fardeau mutationnel

de la tumeur. De plus, même si la tumeur exprime des néo-antigènes, ceux-ci ne sont probablement pas traités de façon optimale pour la présentation aux molécules de CMH de classe I et II. Donc il est nécessaire de prédire quels néo-antigènes sont aptes à être adéquatement présenté par les APC. Finalement, ces vaccins engendrent une réponse T CD4⁺ plus importante que T CD8⁺. Il est donc important de pouvoir améliorer la présentation de ces antigènes par le CMH de classe I. De nouveaux vaccins ont permis d'orienter la réponse plus vers les T CD8⁺: les vaccins à ADN. Ces vaccins sont faciles à produire et agissent en tant qu'adjuvant, car ils sont reconnus par cGAS (27). Lorsqu'injectés à des doses suffisantes, ces vaccins permettent aux cellules dendritiques de présenter de façon efficace les antigènes tumoraux sur les CMH de classe I et II, permettant d'avoir une réponse CD8⁺ et CD4⁺. Afin de diriger la présentation antigénique vers les T CD8⁺, le vaccin a été combiné avec de l'ADN codant pour la chimiokine CCL3 qui permet la différenciation en T CD8⁺ et favorise la migration cellulaire (25). Les vaccins à base d'ARN sont eux aussi faciles à produire, ont moins besoin de traitement par les cellules dendritiques pour la présentation antigénique. Il agit comme adjuvant aussi (25), car il est reconnu par TLR3 et 7 (21)(27). Ils permettent aussi une réponse T CD4⁺ et T CD8⁺. L'administration de ces vaccins peut se faire à travers les vaisseaux lymphatiques, en intramusculaire ou en intraveineux (IV). Il a été montré que l'administration en IV permet d'accéder aux cellules dendritiques de la rate et des vaisseaux lymphatiques donnant lieu à une meilleure réponse immunitaire (28).

Bien que les thérapies vaccinales soient prometteuses, elles font face aux mêmes défis que d'autres immunothérapies comme la régulation à la baisse de la molécule de CMH de classe I, la régulation à la baisse des antigènes visée par la vaccination, l'expression à la hausse de certains ligands inhibiteurs, de certaines cytokines immunosuppressives, la présence de cellules myéloïdes suppressives et de T régulatrices, etc. Tout cela fait en sorte que la vaccination a besoin d'être administré en combinaison avec d'autres traitements, tels qu'anti-PD1, anti-CLTA4, la chimiothérapie et les thérapies cellulaires.

1.1.6 Les virus oncolytiques

La thérapie à base de virus oncolytiques utilise des virus non modifiées ou modifiées génétiquement pour infecter de façon spécifique les cellules cancéreuses sans infecter les cellules

saines. Ainsi ces virus causeraient la mort des cellules tumorales, la production de cytokines inflammatoires, activeraient les cellules immunitaires infiltrantes, exposant des DAMPs et des antigènes tumoraux qui pourraient être phagocytés par les cellules dendritiques et présentés aux cellules T pour les activer. Quatre virus oncolytiques ont été approuvés pour traiter plusieurs cancers (29).

Les adénovirus sont des virus non enveloppés à ADN double brin, linéaire. Ce sont des virus qui se répliquent de façon extra-chromosomiale ils sont donc non-intégratifs (30). Le virus se réplique en deux phases principales : phase précoce et tardif. Les phases précoces impliquent les unités E1-E4 et les phases tardives impliquent les unités L1-L5. Il existe plusieurs modifications génétiques testées dans le contexte du cancer. Le remplacement du promoteur de E1 par un promoteur tumeur spécifique, la modification des unités E1A et E1B, ainsi que la modification de E1A en combinaison avec un promoteur spécifique à la tumeur (30).

Concernant l'utilisation de promoteurs spécifique aux tumeurs, l'unité E1 a été mise sous le contrôle du promoteur de probasin et l'enhancer PSA pour le cancer de la prostate et le promoteur alpha-foetoprotéine (AFP) pour l'hépatocarcinome. D'un autre côté, il est aussi possible de muter E1 de telle façon à ce que la protéine ne soit plus fonctionnelle. Dans une cellule saine, l'absence ou la non-fonctionnalité de E1 empêche la réplication virale, cependant dans certains cancers les mutations peuvent compenser le manque de E1 et permettre au virus de se répliquer (30).

Par ailleurs, la protéine de rétinoblastome (pRB), agit comme un répresseur du facteur de transcription E2F qui initie la réplication virale. Cependant, la région CR2 de E1A interagit avec pRB afin de libérer E2F, permettant ainsi l'initiation de la réplication virale. La mutation de la région CR2 de E1A empêche la libération de E2F et empêche la réplication virale dans les cellules saines. Par contre, dans les cellules tumorales où pRB est muté, le virus est capable de se répliquer parce que pRB n'interagit pas avec E2F. Le virus portant cette mutation est appelé Delta-24. Il est possible d'augmenter la spécificité de Delta-24 en mettant le E1A modifié sous le contrôle d'un promoteur spécifique à la tumeur (30).

D'un autre côté, il est aussi possible de modifier le tropisme de l'adénovirus afin de cibler les cellules tumorales. L'entrée du virus aux cellules saines se fait à partir de récepteurs ubiquitaires. Cela se fait en deux étapes ; tout d'abord, l'attachement de la fibre du virion au récepteur coxsakievirus et adenovirus (CAR), par la suite, les motifs RGD dans la capsid virale interagissent avec les intégrines afin de permettre l'internalisation du virion. Afin d'induire un nouveau tropisme, Douglas et al (31), ont utilisé un fragment d'anticorps reconnaissant la fibre du virion conjugué avec une molécule de folate. Ainsi, l'adénovirus reconnaît le récepteur de folate qui est surexprimé à la surface de plusieurs cellules cancéreuses. Il est aussi possible de remplacer le gène codant pour la fibre du virion par une protéine exogène ayant une affinité pour un récepteur spécifiquement surexprimé à la surface des cellules tumorales (31).

Il est aussi possible d'ajouter un transgène dans le génome viral afin de stimuler plus efficacement la réponse immunitaire. Par exemple, l'ajout du gène codant pour GM-CSF permet de produire ce dernier lors de la réplication virale, favorisant ainsi le recrutement et la maturation des cellules dendritiques (32).

Lorsque le virus oncolytique infecte les cellules tumorales, il se réplique et lyse la cellule, libérant ainsi les virions et des débris cellulaires que les cellules immunitaires reconnaissent comme DAMPs (32). Les DAMPs ainsi que les particules virales peuvent activer les cellules présentatrices d'antigènes environnantes et causer leur maturation (soit l'expression de marqueurs de costimulation comme CD80, CD83 et CD86). Les cellules présentatrices d'antigènes traitent les antigènes et les expriment via le CMH de classe I et II. Elles peuvent donc présenter des antigènes tumoraux aux cellules T CD4⁺ et CD8⁺ infiltrantes ou se trouvant dans les ganglions lymphatiques, provoquant leur activation. Les cellules T CD4⁺ activées vont à leur tour activer les cellules B. Ces dernières vont produire des anticorps neutralisants. Ces anticorps marqueront les cellules tumorales infectées par le virus oncolytique. Les cellules T CD8⁺ recrutées par la tumeur ou activées dans le microenvironnement tumoral reconnaissent les antigènes tumoraux et viraux présentés par le complexe majeur d'histocompatibilité (HLA) des cellules tumorales. Bien que ces cellules régulent à la baisse les HLA, lors de l'infection par un virus oncolytique comme l'adénovirus, ce complexe est régulé à la hausse (32). D'autres cellules sont aussi recrutées et activées au sein du microenvironnement tumoral, comme les cellules NK qui reconnaissent les

signaux activateurs (infection virale ou absence du soi) et éliminent la cellule via la sécrétion d'interféron gamma et de perforines et granzymes. Les cellules NK reconnaissent aussi la partie Fc des anticorps liés à l'antigène grâce à leur récepteur CD16 causant la cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps (ADCC). Durant l'ADCC, les cellules NK relâchent des perforines et des granzymes ainsi que des cytokines tels que les TNF et l'IFN- γ , ce qui permet d'activer les cellules immunitaires environnantes (32).

De cette façon, la tumeur passe d'un état de tumeur "froide" c'est à dire en absence d'inflammation à une tumeur "chaude" inflammée. Causant l'infiltration de cellules immunitaires activées favorisant la lyse des cellules tumorales. La combinaison de traitements à base de virus oncolytiques avec d'autres traitements tels que les inhibiteurs de point de contrôle montrent une plus grande efficacité. Dans une étude randomisée de phase II, l'ipilimumab a été combiné avec le virus oncolytique talimogene laherpalavec (32). La combinaison des deux traitements a montré un taux de réponse de 39% comparé à 18% lorsque l'ipilimumab est administré seul.

Cependant, cette thérapie a des limitations : l'accès au microenvironnement tumoral peut être restreint, à cause du réseau vasculaire immature et la dense matrice extracellulaire entourant la tumeur. De plus, comme mentionné précédemment, les virus oncolytiques peuvent induire une réponse immunitaire mais il peut y avoir une immunité préexistante chez l'individu. De cette façon, lors de l'injection du virus oncolytique il est possible que celui-ci soit neutralisé par des anticorps préexistants ou des anticorps qui ont été induits par un traitement précédent. Donc il est difficile de savoir combien de particules virales réussissent à atteindre la tumeur s'ils l'atteignent.

1.1.7 Thérapies à base de lymphocytes T

1.1.7.1 Les lymphocytes infiltrants les tumeurs (TILs)

Chez les patients atteints de leucémie et autres tumeurs malignes provenant de cellules hématopoïétiques, les traitements consistent en plusieurs doses de chimiothérapie suivie d'irradiation corporelle totale pour éliminer les cellules souches de la moelle osseuse cancéreuses. Cependant, la totalité des cellules cancéreuses ne sont pas éliminées, car pour cela il faudrait une dose de radiation plus élevée que la limite tolérée (33). Afin de restaurer le système

immunitaire du patient, la moelle osseuse est restaurée grâce à une transplantation de moelle osseuse allogénique. Ce type de transplantation, peut causer la maladie du greffon contre l'hôte (GvHD) parce que les cellules T allogéniques peuvent reconnaître du tissu sain du donneur comme étant du non-soi, mais ils reconnaissent aussi les cellules hématopoïétiques cancéreuses comme étant du non soi, donnant lieu à l'effet greffon contre tumeur (GvT), qui est un mécanisme responsable de l'éradication des cellules tumorales (34). La découverte de l'effet GvT a permis de montrer l'efficacité des cellules T contre les cellules tumorales. Ceci a permis de s'intéresser aux lymphocytes T capables de reconnaître et éliminer les tumeurs. Comme, l'effet GvT était accompagné de GvHD chronique, il n'était pas possible de traiter les patients souffrant d'autres types de cancer avec une greffe de moelle osseuse. Pour cela, les scientifiques se sont penchés sur les TILs. L'hypothèse étant que les lymphocytes T qui ont infiltré la tumeur sont capables de reconnaître cette dernière et de l'éliminer s'ils sont activés, cependant ils sont inactivés par le microenvironnement tumoral (35). Les TILs sont obtenus de tumeurs réséquées, digérés et cultivés séparément dans un milieu contenant une haute concentration d'IL-2. Les lymphocytes T ainsi expandus sont ensuite testés pour évaluer leur reconnaissance de la tumeur. Les clones ayant répondu à la tumeur *in vitro* sont par la suite expandus à nouveau en utilisant un milieu contenant des cellules nourricières, de l'IL-2 et des anticorps anti-CD3. Il est aussi possible de trier les TILs pour avoir une meilleure efficacité (seulement 30% des lymphocytes T infiltrés dans la tumeur sont réactifs contre la tumeur) (35). D'ailleurs, l'expression de CD137/4-1BB par les cellules T CD8⁺ dans les TILs est un marqueur d'activation et augmente la réactivité aux tumeurs. Ces cellules T expandues sont ensuite injectées au patient. L'injection des TILs a montré un taux de réponse de 34% chez des patients atteints de mélanome (36).

Il a été observé que les patients ayant subi un lymphodéplétion avant l'injection des TILs présentaient un meilleur taux de réponse. En effet, suite à la lymphodéplétion, il y a une augmentation de cytokines tels que l'IL-7 et IL-15 et une diminution de cellules T régulatrices, ce qui permet la persistance et l'enrichissement des cellules T CD8⁺ provenant des TILs. La composition des TILs joue aussi un rôle important dans l'efficacité de l'effet antitumoral. Les TILs enrichies en T CD4⁺ réactifs contre les cellules tumorales ont montré une régression plus importante des métastases du foie et des poumons comparativement aux TILs non enrichies en

CD4⁺. Il a été observé que chez les patients ayant une réponse à long terme, les T CD4⁺ reconnaissant la mutation BRAFV600E avaient expandus et persistaient (37). De plus, lorsque les TILs T CD8⁺ ont été déplétés dans le contexte du mélanome, les lymphocytes T restant montraient encore une réactivité contre la tumeur, ce qui montre que les CD4⁺ jouent un rôle important dans la réponse antitumorale (37).

Jusqu'à date, les traitements à base de TILs ont montré des résultats intéressants. Dans une méta-analyse faite par l'équipe de Dafni et al (38), a été montré que dans 13 études cliniques utilisant la thérapie TILs, le taux de réponse était de 44% (39). Cependant, ce traitement a des limitations ; il est possible que les lymphocytes T infiltrants soient épuisés de façon irréversible. Une stratégie pour contourner ce problème c'est d'expandre des lymphocytes T naïves clonés pour exprimer un TCR conçu pour reconnaître un néo antigène. Par contre, lorsque le fardeau mutationnel de la tumeur n'est pas élevé, il y a moins de chances que les mutations engendrées donnent des protéines capables d'être exprimées par la molécule de CMH et donc présentées aux lymphocytes T. Aussi, lorsque le fardeau mutationnel est bas, il est possible d'expandre des TILs réactifs contre la tumeur mais aussi contre les tissus normaux. Par exemple, les tumeurs provenant de mélanocytes expriment fortement MART-1, responsable de la production de mélanine. Les mélanocytes sains expriment aussi MART-1. L'injection de cellules T autologues exprimant un TCR conçu pour cibler MART-1 a permis une régression de la tumeur chez 39% des patients mais ces lymphocytes ont aussi ciblé les mélanocytes sains provoquant des effets secondaires tels que le vitiligo et des problèmes oculaires et auditifs (40).

Il y a donc une corrélation entre le fardeau mutationnel et la réactivité des lymphocytes T contre la tumeur. Lorsqu'une tumeur a un fardeau mutationnel élevé, il est plus probable d'y trouver plus de TILs hautement réactifs à la tumeur, car il y a plus de probabilité que la tumeur exprime des néo-antigènes. Ainsi, les tumeurs causées par des facteurs externes ou des modifications suite à des infections virales représentent une meilleure cible pour ce type de traitement.

1.1.7.2 Thérapies à base de lymphocytes T modifiées

Les lymphocytes T, suite à la sélection positive et négative, sortent du thymus et circulent par quasiment toutes les parties du corps afin de détecter du non soi, telle une cellule transformée

ou infectée. Ces cellules T sont naïves et dans un état de repos. Elles migrent par le système sanguin et lymphatique. Durant ce circuit, les cellules T rencontrent plusieurs cellules présentatrices d'antigènes telles que les cellules dendritiques. Si les cellules dendritiques rencontrées présentent via leur CMH, un peptide reconnu par le TCR exprimé par les cellules T, il est possible que cette dernière s'active. Pour que l'activation ait lieu, en plus de la reconnaissance CMH-TCR, il est nécessaire d'avoir un deuxième signal qui se fait via les molécules de costimulation CD80/86 exprimées à la surface des APC et qui se lient à CD28 exprimé par les cellules T(41). Un troisième signal est aussi requis pour une activation optimale des cellules T: la production de cytokines. Les APC produisent des cytokines telles que l'IL-12, 4 et 6 qui sont requises pour la différenciation des cellules T. Les cellules T CD8⁺ activées, appelés T effecteurs, sont cytotoxiques et reconnaissent les cellules infectées ou néoplasiques via le TCR qui est capable de reconnaître spécifiquement un peptide présenté par la molécule du CMH exprimé à la surface de la cellule cible. Suite à la reconnaissance de la cible, il y a formation de la synapse immunologique et le relâchement de molécules cytotoxiques telles que granzymes et perforines et la sécrétion de cytokines comme IFN- γ et TNF- α . L'IFN- γ se lie à son récepteur composé de deux chaînes α et β et cause une cascade de signalisation via JAK-STAT donnant lieu à la transcription de différents gènes induits par IFN- γ dont iNOS, une enzyme responsable de la mort cellulaire des cellules tumorales et infectées(42). La liaison de l'IFN- γ avec son récepteur, régule aussi à la hausse l'expression des molécules du CMH, facilitant la reconnaissance par les lymphocytes T CD8⁺. TNF- α se lie au TNF-R1 et peut activer la voie des caspases donnant lieu à l'apoptose cellulaire(43). Les cellules T CD4⁺ quant à elles, jouent un rôle important dans le maintien de la réponse T CD8⁺(44). Le microenvironnement tumoral est hétérogène, on y retrouve entre autres, des cellules tumorales, de fibroblastes, des cellules immunitaires immunosuppressives mais on y retrouve aussi des cellules T CD8⁺ effectrices, des CD4⁺ Treg, CD4⁺ T helper 17-like, et NK(45). Bien que les cellules CD4⁺ Th17-like peuvent avoir un phénotype Th1 like en produisant de l'IFN- γ . La production de l'IFN- γ va causer l'apoptose des cellules tumorales, activer les APC, fragiliser les cellules Treg, favoriser le phénotype M1 chez les macrophages infiltrés(46), etc. Cependant, les cellules CD4⁺ Th17-like peuvent aussi favoriser la progression tumorale en produisant IL-17, TGF β , IL-16 qui stimulent l'angiogénèse(47). Les Treg présentes dans le microenvironnement ont une

activité suppressive de la réponse immunitaire(48), les macrophages polarisés en M2 (CD163⁺, CD204⁺, CD206⁺) secrètent des cytokines anti-inflammatoires, favorisant ainsi la croissance tumorale(49). En plus, de la régulation à la baisse de la molécule de CMH de classe I au niveau des cellules tumorales. Dans plusieurs types de cancer, ceci peut être dû à la régulation à la hausse de certains facteurs de transcription tel que DUX4 qui empêche l'induction du CMH de classe I par IFN(50). Ainsi, bien que les lymphocytes T soient activés par les APC et reconnaissent un antigène tumoral, le microenvironnement tumoral ainsi que la régulation à la baisse de la molécule de CMH empêchent la reconnaissance des cellules tumorales ou si celles-ci sont reconnues, le lymphocyte T entre en synergie à cause de la présence d'éléments immunosuppresseurs. La modification des lymphocytes T permet de surmonter ces défis.

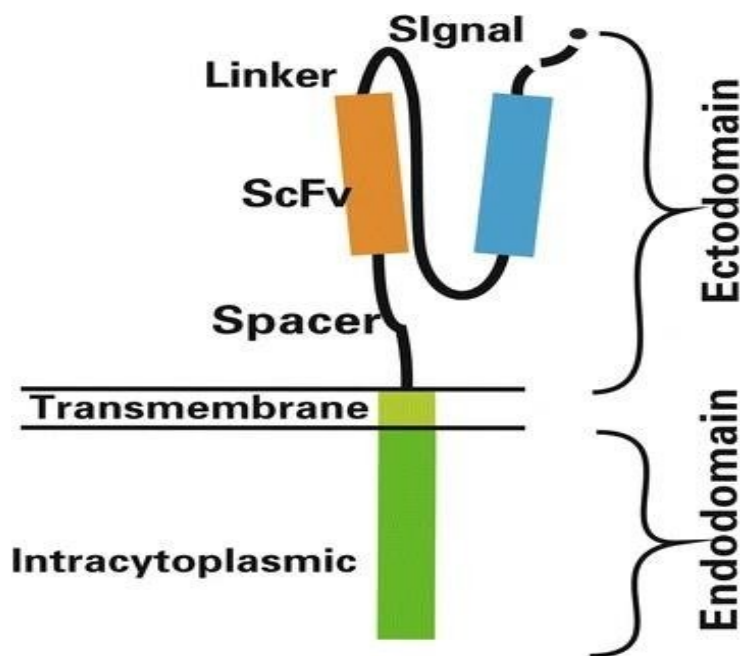


Figure 2. – Représentation des différentes composantes du récepteur antigénique chimérique (CAR).

Le domaine extracytoplasmique « Ectodomain » est composé d'une fusion entre la chaîne légère et lourde de la partie variable d'un anticorps (scFv) liés via une série de peptides (glycine, serine et thréonine) « linker » et un espaceur « Spacer » qui varie selon le CAR utilisé. La partie transmembranaire « Transmembrane » se trouve entre le domaine extracellulaire et intracellulaire. La partie intracellulaire « Endodomain » est formé par la partie intracytoplasmique qui contient les domaines de costimulation. (Droits obtenus de Zhang, C., Liu, J., Zhong, J.F. et al. ,2017)

Pour augmenter l'efficacité des cellules T tout en maintenant la spécificité aux cellules tumorales, celles-ci ont été modifiées pour exprimer un CAR. Ce récepteur permet aux lymphocytes T de reconnaître leur cible de façon indépendante du CMH et indépendante des molécules de costimulation. Il consiste en une partie extracellulaire, une charnière, un domaine transmembranaire et un domaine intramembranaire (**Figure 2**)(51).

Le domaine extracellulaire est composé de la chaîne légère et la chaîne lourde de la partie variable d'un anticorps monoclonal (scFv) capable de reconnaître un antigène. Les deux chaînes sont liées par un peptide, permettant ainsi d'améliorer la flexibilité et l'affinité du scFv. L'antigène que reconnaît le scFv doit être choisi de telle façon à minimiser l'effet « *on target off tumor* ». C'est pour cela que souvent, le TAA choisi va être surexprimé par les cellules tumorales et peu ou pas exprimé par les tissus sains. Il est possible de modifier l'affinité du scFv pour diminuer cet effet. Mais ceci peut diminuer la capacité anti tumorale de ces cellules. Dans une étude, des CAR-T anti-GD2 de faible affinité avaient montré une faible efficacité contre les tumeurs à progression rapide. Cependant des CAR-T anti-GD2 de forte affinité montraient une meilleure efficacité contre ce même type de tumeur. Cependant, ce dernier a aussi causé une plus grande neurotoxicité à cause de l'effet "*on target off tumor*" (52).

Une séquence dite « hinge » ou espaceur, permet de lier le scFv à la partie transmembranaire. Il permet au scFv de bien se lier à l'épitope. Si celui-ci est proche de la membrane, l'espaceur est plus long et inversement, si l'épitope est loin de la membrane l'espaceur est moins long. La taille de l'espaceur peut aussi déterminer la formation de la synapse. Lorsque l'espaceur est moins long, il permet la formation d'une fente synaptique plus rapprochée ce qui pourrait faciliter la signalisation et l'activation cellulaire, grâce à l'exclusion des phosphatases CD45 (52). Les espaceurs les plus utilisés proviennent de régions CD28 ou CD8. Ils sont structurellement différents et ont des effets différents: l'espaceur CD28 permet une plus grande sécrétion de IFN- γ mais augmente aussi l'AICD, l'espaceur CD8 cause une sécrétion moindre d'IFN- γ mais la cytotoxicité est similaire et cause moins de mort cellulaire induite (AICD)(52).

Le domaine transmembranaire permet de transmettre la reconnaissance de la cible par le scFv au domaine cytoplasmique qui à son tour traduit cela en signal d'activation. Les CARs de première

génération utilisaient un domaine transmembranaire CD3 ζ afin de reproduire une signalisation similaire à celle du complexe TCR-CD3. Ils utilisaient aussi le domaine cytoplasmique de CD3 ζ . Ces CARs interagissaient avec le TCR α et TCR β via leur domaine CD3 ζ et causaient un signal d'activation cellulaire. D'autres domaines transmembranaires utilisés sont ICOS, KIR2DS2, NKG2D et CD8 α (53) . Le choix de ce domaine peut affecter la capacité cytotoxique du CAR. En effet, il est possible que la partie transmembranaire interagisse avec des kinases, facilitant ainsi le déclenchement de la cascade d'activation(53). Guedan et al (54), ont observé que l'utilisation d'un construit comportant un domaine transmembranaire ICOS suivi de domaines cytoplasmiques ICOS-4-1BB-CD3 ζ présentait une activité antitumorale plus importante que le construit qui utilisait le domaine transmembranaire CD8 avec la même queue cytoplasmique (54). Le premier avait permis d'éradiquer la tumeur au complet après 35 jours et le deuxième ne causait qu'une régression tumorale. Donc, le domaine transmembranaire affecte la signalisation du premier domaine de costimulation(54). D'autres designs utilisent la structure du récepteur Fc ϵ RI qui consiste en trois domaines : α , β et γ . Le domaine α est modifié par un scFv, le domaine cytoplasmique de γ est modifié par CD3 ζ et celui de β par 4-1BB. On se retrouve avec des domaines transmembranaires propres au récepteur Fc ϵ RI lié à des domaines de signalisation couramment utilisé dans la technologie CAR.

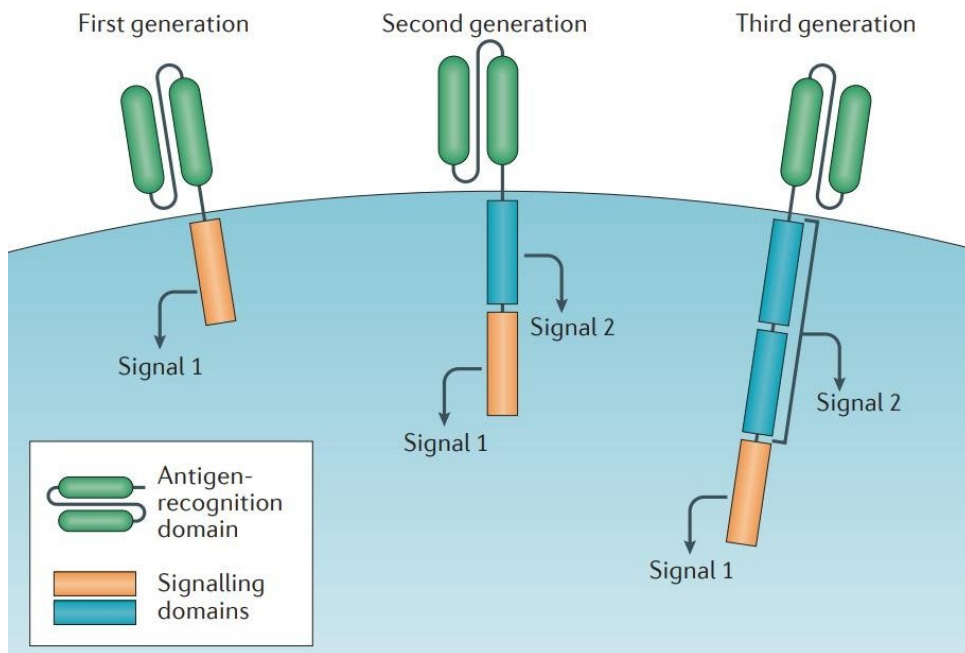


Figure 3. – Les différentes générations de CAR.

Les CARs ont un domaine de reconnaissance antigénique et un domaine de costimulation. Les CARs de première génération (à gauche) ont un seul domaine de costimulation correspondant au signal 1 dans l'activation des lymphocytes T. Les CARs de deuxième génération (au milieu) présentent deux domaines de costimulation qui correspondent au signal 1 et 2. Les CARs de troisième génération (à droite), ont deux domaines de costimulation correspondant au signal 2 en plus du domaine de costimulation correspondant au signal 1. (Droits obtenus de Hollie J. Jackson, Sarwish Rafiq et Renier J. Brentjens, 2016)

Les domaines de costimulation permettent d'initier la cascade de signalisation qui résulte en l'activation cellulaire. Les CARs de première génération utilisent un seul domaine de costimulation, CD3 ζ , qui permet de transmettre le signal 1 (**Figure 3**). Bien qu'ils aient une activité antitumorale, ils ont un manque de persistance et de prolifération. Ceci est dû à l'absence du signal 2. Les CARs de deuxième génération contiennent deux domaines de costimulation (signal 1 et signal 2)(**Figure 3**)(55). Les plus utilisés utilisent CD28 et 4-1BB comme domaines de costimulation (signal 2) suivies de CD3 ζ (signal1). Ce type d'architecture permettrait une meilleure efficacité du CAR ainsi qu'une meilleure persistance et prolifération. Le choix de CD28 ou 4-1BB peut affecter la fonctionnalité du CAR. En effet, des études de phosphoprotéomique ont montré que les CAR CD28 montraient une intensité de phosphorylation plus grande et plus rapide que celle de 4-1BB(54). L'action antitumorale des CAR CD28 est donc plus rapide. Cependant, en plus

d'une plus intense activation, il a aussi été observé que ce CAR avait un signal tonique intrinsèque ("tonic signaling") dû à la phosphorylation des ITAM de CD3 ζ en absence d'antigène cible, et aboutissant ainsi à l'exhaustion des cellules. Les cellules avec un CAR ayant un domaine cytoplasmique 4-1BB ont une meilleure persistance, étaient moins épuisés mais leur action antitumorale était lente à cause du signal de phosphorylation plus lent et moins intense(54). Ceci pouvait avoir comme conséquence le développement de mécanismes de résistance tumorale comme la régulation à la baisse de l'antigène reconnu(54).

Les CARs de troisième génération contiennent deux domaines de costimulation en plus du domaine CD3 ζ (**Figure 3**). Les CARs utilisant CD28 et 4-1BB comme domaines de costimulation présentent une phosphorylation plus intense et plus rapide(56), suggérant que l'activation et la cytotoxicité est plus importante. Les études précliniques utilisant le CAR CD28-4-1BB-CD3 ζ contre différentes cibles montrent qu'il est supérieur aux CARs de deuxième génération en ce qui concerne l'éradication tumorale, la persistance et l'expansion(56). D'autres domaines de costimulation ont aussi été utilisés. Les domaines de costimulation CD28 combinés au domaine OX40 ont aussi montré une meilleure performance par rapport aux CARs de deuxième génération. La combinaison de CD28 avec le domaine cytoplasmique du TLR2 a aussi été utilisé (57). Celle-ci permettrait de réguler à la hausse l'expression de gènes reliés à la migration et l'adhésion cellulaire. D'autres constructions utilisent IL2R β et STAT3 avec CD28 et CD3 ζ pour activer la signalisation via JAK-STAT afin de déclencher la voie de signalisation qui aboutit à la production de cytokines pro inflammatoires(56). L'utilisation de CAR de première ou deuxième génération ainsi que les différents domaines de costimulation dépendent du scFv, de la cible tumorale visée ainsi que de la finalité. Par exemple, l'utilisation de CAR anti-GD2 dans un construit de deuxième génération CD28-CD3 ζ cause une régulation à la baisse de l'expression du CAR à cause de l'agrégation du CAR à la surface causant un signal d'activation(58). Lorsque ce même scFv est combiné à la construction 4-1BB-CD3 ζ la régulation à la baisse n'a pas été observée, la distribution du CAR à la surface de la cellule était uniforme et l'agrégation était minimale(58). Comme il a été mentionné précédemment, les CARs utilisant 4-1BB présentaient une activation plus lente et moins intense que CD28. Lorsqu'un scFv à moindre affinité est utilisé, ou lorsque la cellule cible exprime faiblement l'antigène reconnu par le scFv, le choix du domaine 4-1BB diminue

grandement la cytotoxicité de la cellule CAR-T. Par contre, le domaine CD28 permet une meilleure activité antitumorale lorsque l'antigène est présent à faible densité ou que le scFv n'a pas une très forte affinité(56).

Les domaines de costimulation les plus efficaces ainsi que leur combinaison la plus optimale est encore à déterminer. Les plus utilisés en clinique sont CD28 et 4-1BB. Le premier montre une plus grande cytotoxicité et expansion et le deuxième a une plus grande persistance(54). La plupart des études cliniques ainsi que les produits approuvés par la FDA utilisant les CAR T sont dirigés envers des cancers hématologiques : lymphome non hodgkinien (LNH), leucémie aigüe lymphoblastique de cellules B (-ALL) et le myélome multiple (MM). Avant le traitement à base de CAR T, les patients reçoivent un traitement de chimiothérapie pour diminuer le fardeau tumoral afin d'augmenter la probabilité d'une réponse durable et de minimiser la toxicité du traitement(59).

Cette toxicité peut se traduire par le syndrome de libération de cytokines (CRS) ainsi que le syndrome de neurotoxicité associé aux cellules immunitaires effectrices (ICANS). Le CRS est une inflammation systémique qui peut se présenter sous différentes formes cliniques qui peuvent aller de symptômes ressemblant à une grippe jusqu'à des symptômes plus graves comme une baisse de la pression vasculaire, une inflammation généralisée, coagulation intravasculaire, défaillance d'organes généralisée, etc. (60). Ceci nous permet de classifier le CRS en plusieurs grades selon sa gravité. Le CRS de grade 1 correspond à des symptômes légers tels que la fièvre, grade 2 correspond à l'hypotension et toxicité des organes. Le grade 3 correspond à un état de choc, d'hypoxie, et une toxicité aux organes plus importante. Le grade 4 correspond à une hypoxie telle que le patient a un besoin de la ventilation artificielle et une toxicité aux organes de grade 4 (60). Le ICANS surgit souvent pendant ou après un CRS et se présente sous forme d'encéphalopathie. Selon le grade, les symptômes peuvent aller de difficultés à trouver ses mots, passant par une confusion et peut aller jusqu'à des convulsions et un œdème cérébral(61).

Lors de l'étude clinique ZUMA-1, 111 patients souffrant de lymphome B de haut grade réfractaire (R/R HGBCL) ont reçu une dose du produit Axicabtagene ciloleucel à base de CAR T anti CD19 (62) après avoir reçu des doses de chimiothérapies. Les patients ont montré un taux de réponse globale de 82%, et 54% d'entre eux ont montré une réponse complète. Après 15,4 mois, 40% des

patients demeuraient en rémission. Cependant, la toxicité de grade 3 reliée au CAR T était présente chez plusieurs participants, 13% ont présenté des CRS et 23% des ICANS. Une autre étude, ZUMA-5, 81 patients avec R/R lymphome folliculaire (FL) a montré un taux de réponse global de 92% et une rémission de 76% après 18 mois. La toxicité de grade 3 de CRS et ICANS était de 8 et 21% respectivement(62).

Tisagenlecleucel (tisa-cel) est un traitement à base de CAR T utilisé pour la première fois chez des patients en pédiatrie souffrant de B-ALL. Chez 75 patients participants, 81% ont atteint une rémission complète. Après 12 mois, 50% des patients avaient survécu sans progression et le taux de survie global était de 76%. Cependant, ce traitement provoquait plus d'effets secondaires. L'incidence de CRS de grade 3 après administration de tisa-cel était entre 77 et 48%(63). De plus, 40% des patients ont développé des ICANS. Bien que le traitement cause d'importants effets secondaires nécessitant l'utilisation de tocilizumab, ses taux de réponse chez les patients ont fait en sorte que le traitement soit approuvé par la FDA. Ce traitement a aussi été approuvé pour les patients atteints de R/R HGBCL suite à l'étude clinique JULIET comportant 93 patients souffrant de R/R HGBCL montrait un taux de réponse global de 50% et une rémission complète chez 32% des participants. L'incidence de CRS et ICANS était de 22 et 12% respectivement (64).

Lisocabtagene maraleucel est le troisième traitement à base de CAR T ciblant CD19. Dans une étude clinique comportant 192 patients atteints de R/R HGBCL ayant subi deux lignes de traitement ou plus. Le taux de réponse global était de 73%. Le taux de rémission complète était de 54%. Parmi ces derniers, 65% étaient encore en rémission après 9 mois. Concernant les effets secondaires, le CRS et les ICANS ont surgit chez 4 et 12% des patients respectivement (65).

Brexucabtagene autoleucel est un produit contenant des CAR T anti-CD19 qui a été testé chez les patients souffrant de lymphome à cellules du manteau réfractaire (R/R MCL). Les participants de cette étude avaient déjà reçu des traitements auparavant : inhibiteur de la tyrosine kinase de Bruton, chimiothérapie à base d'anthracycline ou bendamustine et un traitement à base d'anticorps monoclonaux anti-CD20. Le taux de réponse global était de 93% et le taux de rémission complète était de 67%. Après 12 mois, le taux de survie global était de 83%. Les effets secondaires impliquant les CRS et les ICANS concernaient 15 et 31% des participants

respectivement. Ceci a permis à ce produit d'être le premier produit approuvé par la FDA pour le traitement de R/R MCL (66).

Les traitements à base de CAR T anti-CD19 approuvés par la FDA permettent de traiter plusieurs cancers hématologiques. Cependant, ils sont souvent utilisés comme troisième ligne de traitement. Des études cliniques sont en cours comme ZUMA-12 pour permettre l'utilisation de ces traitements en première ligne chez les personnes à haut risque de certains cancers hématologiques tels que HGBCL. D'autres CAR T ont été développés pour viser d'autres antigènes. Ces nouveaux avancements pourraient permettre aux patients ayant développé des résistances aux traitements actuels de surpasser ces obstacles grâce aux CAR T visant de multiples antigènes. Les CAR T visant NKG2D et CD123 ont montré une efficacité chez des patients ayant rechuté à la leucémie myéloïde aigue (AML). Dans une étude de phase I et II, des CAR T visant CD30 dans le contexte du lymphome hodgkinien chez des patients réfractaires ont montré un taux de réponse global de 72% et un taux de rémission complète de 59% avec un taux de CRS et ICANS très bas(66).

Bien que les traitements disponibles soient efficaces contre plusieurs cancers hématologiques, lorsqu'il s'agit de traiter des tumeurs solides, la thérapie à base de CAR T se retrouve face à plusieurs obstacles. En effet, lorsque la tumeur est solide, il est difficile pour les CAR T de l'infiltrer à cause du microenvironnement tumoral composé de barrières physiques tels que des fibroblastes associés aux tumeurs et cytokines immunosuppressives ainsi que des ligands de CCL2, qui attire des populations immunitaires immunosuppressives à la tumeur(65).

1.2 L'impact de l'hypoxie en cancers solides

Lors du développement du cancer solide, il y a une première étape où la tumeur se développe en absence de vascularisation. Lorsque la tumeur atteint une certaine taille (entre 1 et 2 mm), le microenvironnement tumoral devient hypoxique car la diffusion seule n'est pas capable d'amener de l'oxygène à toutes les cellules de la tumeur. L'hypoxie dans les cellules se traduit par un programme transcriptionnel médié par la famille des facteurs inductibles à l'hypoxie (HIFs)(67). Les HIFs sont formés par une unité HIF α O₂ dépendante et HIF β exprimé constitutivement. Les cellules en hypoxie commencent à sécréter des facteurs d'angiogenèse médiés par les HIFs, tel que VEGF-A, PGF et ANGPT2, qui stimulent les cellules endothéliales adjacentes formant les

vaisseaux sanguins (67). À noter que l'angiogenèse qui a lieu dans des conditions non tumorales permet la formation de vaisseaux sanguins fonctionnels, cependant, lorsque l'angiogenèse a lieu dans des conditions tumorales, les vaisseaux sanguins formés sont non fonctionnels et anormaux (55). La production excessive de VEGF-A par les cellules hypoxiques de la tumeur enclenchent l'angiogenèse et donc la formation de nouveaux vaisseaux sanguins à partir des vaisseaux sanguins environnants. Ces nouveaux vaisseaux forment un réseau autour de la tumeur. Cependant, ils sont immatures, leurs parois et jonctions ne sont pas renforcés(68). Ceci cause un flux sanguin irrégulier et une arrivée de nutriments et d'oxygène inefficace à la tumeur. Donc, une bonne partie de la tumeur demeure hypoxique et continue à produire VEGF-A, ce qui favorise l'immaturation des cellules endothéliales formant les vaisseaux sanguins de la tumeur. De plus, il a été observé chez la souris et chez les patients souffrant de différents cancers solides, qu'il existe une corrélation positive entre la présence de VEGF-A et la présence de cellules T régulatrices. Ce facteur peut aussi être reconnu par les cellules myéloïdes suppressives (MDSC) circulantes qui vont être recrutés par la tumeur. Les MDSC peuvent aussi favoriser la polarisation des TCD4⁺ vers un phénotype T reg via la sécrétion d'IL-10 et TGF- β (69).

PGF est un membre de la famille des VEGF. Il promeut la prolifération cellulaire, le recrutement de cellules hématopoïétiques, la motilité des cellules cancéreuses et la production de VEGF(67). Les cellules hématopoïétiques recrutées voient leur développement affecté par VEGF présent dans l'environnement tumoral. Ceci fait en sorte que la différenciation des cellules dendritique à partir de ces cellules progénitrices soit altéré et leur maturation également. Les cellules T CD8⁺ circulantes et infiltrant la tumeur expriment VEGFR2. VEGF-A lie VEGFR2 et cause une suppression de la cytotoxicité et de la prolifération de ces cellules T(69). ANGPT2 empêche l'interaction entre les cellules endothéliales et les péricytes, des cellules essentielles dans le maintien de la stabilité et l'intégrité des parois vasculaires(70). Ce qui augmente l'instabilité du réseau vasculaire tumoral et promouvoir l'hypoxie dans certaines régions de la tumeur.

Le milieu hypoxique de la tumeur fait aussi en sorte que les cellules changent leur stratégie métabolique vers la glycolyse. Lors de la glycolyse, le glucose est converti en lactate⁻ + H⁺. L'accumulation du proton H⁺ à cause du manque de vascularisation efficace et la production importante de H⁺ par les cellules tumorales en hypoxie cause une acidification du milieu (71). Le

milieu acide où se trouve la tumeur cause une dysfonction des TILs et la consommation excessive de glucose par les cellules tumorales combiné à la mauvaise vascularisation et l'hypoxie, cause une compétition pour le glucose entre les cellules immunitaires et tumorales et une diminution de la prolifération des cellules T effectrices (72) (63).

1.2.1 Les cellules NK comme potentiel traitement contre les cancers solides

Les cellules « natural killer » (NK) sont des cellules qui font partie du système immunitaire inné. On en retrouve 5 à 15% dans le sang périphérique. Une de leur principale caractéristique est qu'elles sont capables de tuer de façon non spécifique(73). C'est à dire, qu'elles n'ont pas besoin de reconnaître un peptide spécifique présenté à la surface des cellules cible comme c'est le cas pour les lymphocytes T. Les cellules NK sont aussi capables de reconnaître une cellule anormale de manière TCR indépendante(73). Les NK se caractérisent par l'expression de CD56 et l'absence d'expression de CD3. Il existe deux sous population de NK selon leur degré de maturation. Les CD56^{bright} CD16^{low} une sous population moins mature et CD56^{bright} CD16^{high}, une population plus mature et cytotoxique. Les cellules NK sont capables d'éliminer des cellules infectées, "anormales" ou stressées sans avoir besoin de la reconnaissance via la molécule HLA. En effet, les NK expriment à leur surface une panoplie de récepteur activateurs et inhibiteurs reconnaissant différents ligands exprimés à la surface des cellules (74).

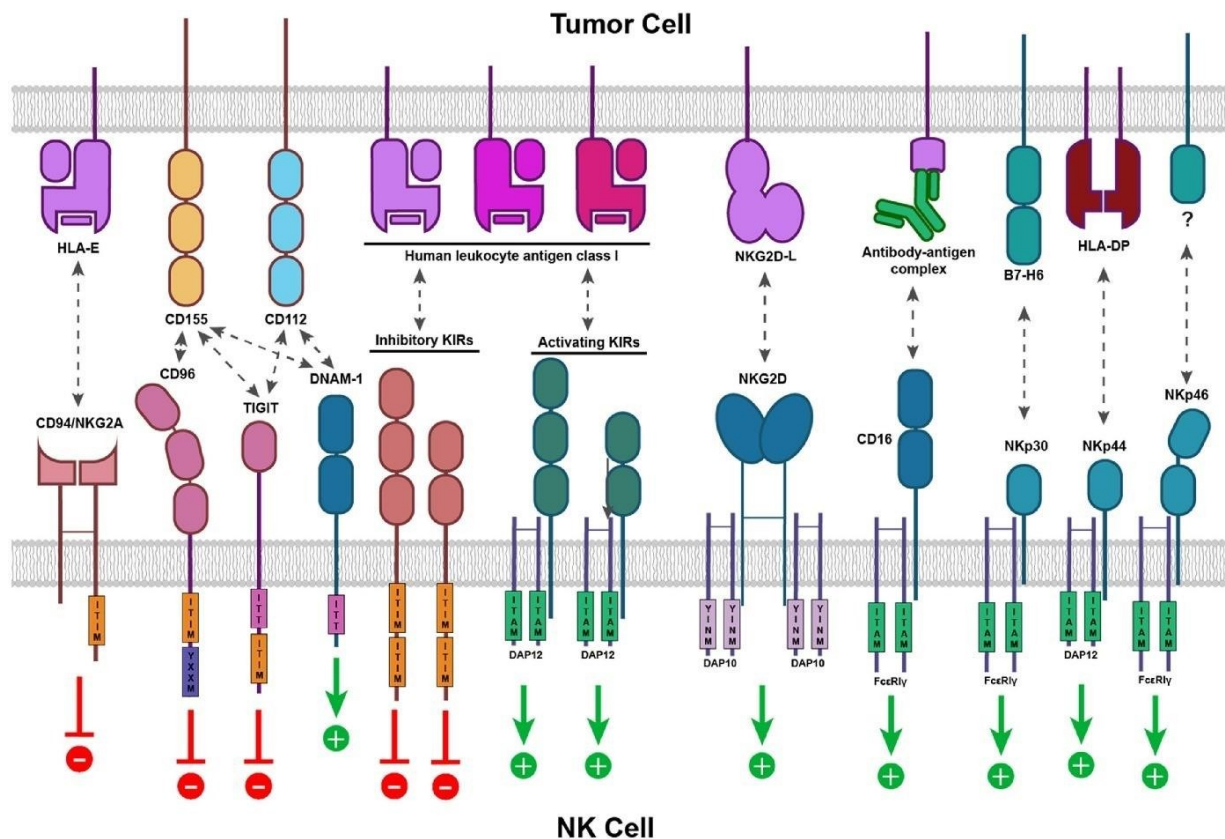


Figure 4. – Les récepteurs activateurs et inhibiteurs exprimés à la surface des cellules NK et leurs ligands.

En bas, la représentation de la cellule NK et ses différents récepteurs. Les récepteurs activateurs envoient un signal d'activation cellulaire représenté par une flèche verte et un symbole « + ». Les récepteurs inhibiteurs envoient un signal d'inhibition de l'activation cellulaire représenté par une flèche rouge à bout plat et un symbole « - ». En haut, une cellule tumorale exprimant les ligands des différents récepteurs exprimés par la cellule NK. (Guozhu Xie et al, 2020)

Lors de la maturation des cellules NK, il y a tout d'abord expression d'au moins un récepteur inhibiteur tel que NKG2A qui reconnaît HLA-E. Plus tard, lors de la maturation des cellules NK, il y a expression de d'autres récepteurs inhibiteurs tels que certains « Killer Ig-Like Receptors » (KIRs) capables de reconnaître les molécules HLA classe I et transmettre un signal d'inhibition (**Figure 4**). Les cellules NK n'ayant pas exprimées de récepteurs inhibiteurs lors de leur maturation entrent en anergie(75). Donc de manière intrinsèque, les NK matures sont capables de reconnaître "l'absence de soi" lors de la régulation à la baisse des molécules HLA classe I par les cellules tumorales et pourraient potentiellement s'activer à cause de l'absence de signaux inhibiteurs. Il existe également une panoplie de récepteurs activateurs à la surface des cellules NK : NKp46, NKp44, NKp30 DNAM-1, NKG2D des corécepteurs tels que p75/AIRM1, IRp60 2B4 et NKp80

(Figure 4). Il existe aussi des KIRs activateurs avec un domaine cytoplasmique plus court et absence de motifs d'activation des récepteurs immuns basé sur la Tyrosine (ITAM). Pour transmettre un signal activateur, ils ont besoin d'une protéine adaptatrice contenant des (ITAM). Les ligands des KIRs activateurs ne sont pas bien connus, pour certains KIR il a été déterminé qu'ils reconnaissent certains allotypes d'HLA-C ou certains peptides viraux exprimés par certains HLA(75). L'activation des cellules NK dépend du dépassement d'un seuil entre les signaux activateurs et inhibiteurs. Ces signaux convergent au niveau d'un facteur d'échange nucléotidique Vav1 et le phosphorylent ou le déphosphorylent. L'état final de Vav1 va déterminer si la cellule va s'activer ou pas(76).

Donc les NK ont la capacité de reconnaître des cellules tumorales et ont le potentiel de s'activer contre ces cellules même si celles-ci régulent à la baisse les molécules HLA pour échapper à la réponse T dépendante. De plus, les cellules T ne circulent pas dans les tissus s'ils ne sont pas activés par les cellules dendritiques, les NK par contre, lorsqu'elles sortent de la moelle osseuse, circulent du système lymphatique au système sanguin et s'infiltrer dans différents tissus. Il y a donc une surveillance et une capacité intrinsèque des NK à s'infiltrer dans les tissus afin de pouvoir trouver et éliminer les cellules anormales(77). C'est pour cela que les cellules NK pourraient être utilisées comme un potentiel traitement contre le cancer.

Tout comme les lymphocytes T, les NK peuvent aussi être modifiés pour exprimer un CAR à leur surface. En effet, les CAR-NK ont déjà été utilisés. La structure de ces CAR est souvent identique à celle utilisé dans les lymphocytes T. La majorité des CAR-NK générés étaient de deuxième génération et comportait une queue CD28-CD3 ζ . Ces CAR sont capables de fonctionner dans les cellules NK parce que plusieurs récepteurs exprimés par les NK telles que Nkp30 et CD16 utilisent CD3 ζ dans leur cascade de signalisation. Les domaines transmembranaires fréquemment utilisés dans les CAR-NK sont les mêmes que dans les CAR-T : CD28 et CD8. Cependant, l'utilisation de domaines transmembranaires de récepteurs NK tel que NKG2D permet d'obtenir une meilleure activation du CAR dans les cellules NK (78).

Comparé aux CAR-T, les CAR-NK présentent plusieurs avantages. Tout d'abord, le traitement à base de CAR T peut provoquer des effets secondaires tels que les CRS et les ICANS à cause de la

production d'IL-1a, IL-1Ra, IL-2, IL-2Ra, IL-6, TNF α , MCP-1, IL-8, IL-10 et IL-15(73). Les traitements à base de CAR NK ne provoquent pas de tels effets secondaires (79), car lors de leur activation, les NK relâchent principalement IFN- γ et GM-CSF. De plus, les NK peuvent éliminer la tumeur par la voie CAR dépendante et la voie CAR indépendante via les récepteurs activateurs tels que NKG2D, DNAM-1 et les « killer cell immunoglobulin-like receptors » (KIR) activateurs, ce qui permet de faire face à l'hétérogénéité des tumeurs solides. Un autre avantage de l'utilisation des CAR-NK est que les NK ne causent pas la maladie du greffon contre l'hôte (GVHD), parce qu'elles ne reconnaissent pas leur cible de manière TCR dépendante(73). D'ailleurs, une étude effectuée par Ruggeri et al a montré que l'utilisation de donneurs haploidentique présentant des ligands KIR mismatch, pourrait même protéger contre la rechute des patients souffrant de leucémie myeloïde et diminuer le risque de GVHD(80). Donc il est possible de créer un traitement « off the shelf » avec les NK, pouvant être utilisé pour tous les patients indépendamment de la compatibilité HLA de classe I aussi connu sous le nom de CMH de classe I. En effet, les NK sont capables de reconnaître le soi du non-soi grâce à une série de récepteurs KIR inhibiteurs capables de se lier aux les HLA et d'envoyer un signal inhibiteur afin que la cellule NK ne s'active pas. Lorsque les cellules tumorales régulent à la baisse l'expression du CMH de type I, ce signal inhibiteur est absent, donc si les cellules tumorales expriment des ligands activateurs pour les NK, celles-ci pourraient s'activer(81). Dans une étude clinique impliquant des participants souffrant d'AML, ont reçu une infusion de cellules NK haploidentiques suite à un traitement de fludarabine et cyclophosphamide. Parmi ces participants 4/19 ont été en en rémission complète(82). L'élimination des cellules leucémiques chez ces participants concordait avec l'expansion des NK du donneur dans leur sang périphérique. Dans une autre étude, 10 enfants souffrant d'AML ont reçu des infusions d'NK provenant de donneurs haploidentiques après 5 cycles de chimiothérapie. Le taux de survie après 2 ans était de 100%(82) . Pour cette étude, la quantité de cellules NK administrées était plus élevée. Les NK non modifiés ont aussi été utilisés chez des participants souffrant de d'autres types de cancer tels que le lymphome non-Hodgkinien. Dans une étude comportant 16 patients souffrant de lymphome non-Hodgkinien traité avec des infusions de NK non modifiés haploidentiques pre-activés avec IL-15 et hydrocortisone, 2 participants ont montré une réponse partielle et chez 6 patients la maladie a été maintenu stable(82). Bien que les

résultats de ces études cliniques montrent un succès modéré des cellules NK non modifiées, cela montre aussi le potentiel des cellules NK dans le contexte du cancer. En effet, lorsque les cellules NK sont modifiées, leur potentiel thérapeutique est amélioré. Dans une étude clinique de phase I et II, 11 patients souffrant de lymphome non Hodgkinien ou leucémie lymphoïde chronique (LLC) ont reçu des cellules NK haploidentiques modifiées pour exprimer un CAR anti CD19 et l'IL-15. Sur les 11 patients, 8 ont répondu au traitement et 7 ont eu une rémission complète(83).

Le rôle des thérapies à base de NK semble être prometteur. De plus, comme le traitement n'a pas besoin d'être HLA compatible, les délais pour obtenir un traitement à base de NK, serait plus court que les délais d'attente pour les traitements à base de CAR T autologues utilisés actuellement. Chez certains patients, le traitement à base de CAR T n'est même pas possible parce que les patients n'ont pas assez de lymphocytes T circulants (84).

Les NK peuvent être obtenus à partir de NK92, de sang périphérique, de sang de cordon, de cellules hématopoïétiques CD34⁺ et de cellules souches pluripotentes induites. Les NK sont par la suite transduites pour exprimer un CAR à leur surface et expansées avant d'être administrés aux patients.

Toutes ces caractéristiques font en sorte que les NK sont des candidats très intéressants pour le traitement efficace des cancers solides.

1.2.2 Rhabdomyosarcome comme modèle de tumeur solide

Les sarcomes du tissu mou représentent 7% des cancers chez les enfants. Parmi eux, la moitié souffrent de rhabdomyosarcome (RMS), un cancer de haut grade dont les cellules ont une tendance envers la différenciation myogénique(85).

Chez 10 à 20% des patients, le cancer présente déjà des métastases lors du diagnostic(86). Les traitements pour ces patients consistent en plusieurs doses de chimiothérapie, radiothérapie et chirurgies. Bien que ces traitements soient agressifs, ils n'améliorent que très peu la survie des patients (65). Le taux de survie après 5 ans est de 10 à 35%(86). Ce cancer se développe souvent au niveau de la tête et du cou mais il peut aussi apparaître à n'importe quel endroit du corps où il y a du muscle squelettique ou du muscle lisse tel que la vessie. Il existe deux sous-types de RMS :

alvéolaire et embryonnaire. Ils ont tout d'abord été différenciés à partir de leur morphologie distincte. Les cellules du RMS alvéolaire ont une morphologie plutôt arrondie alors que les cellules du RMS embryonnaire ont une morphologie allongée ressemblant aux cellules musculaires ressemblant des myoblastes squelettiques immatures. Les deux sous-types surgissent sont le résultat de translocations et délétions. Ces sous-types sont classés à partir de l'absence ou la présence de fusions protéiques(87). En effet, le rhabdomyosarcome alvéolaire présente des translocations chromosomiques qui engendrent des fusions protéiques oncogéniques. Ces translocations concernent la juxtaposition de PAX3 (chromosome 2) ou PAX7 (chromosome 1), des facteurs de transcription exprimés pendant la phase embryonnaire, avec FOXO1 (chromosome 13), un facteur de transcription intervenant dans le cycle cellulaire. Ces fusions donnent lieu à des gènes qui sont transcrits et traduits. La protéine chimérique résultante contient une région amino-terminale PAX3 ou PAX7 contenant un domaine de liaison à l'ADN et une région carboxyterminale FOXO1 contenant une région activatrice de la transcription. L'expression et l'activité transcriptionnelle de PAX3-FOXO1 ou PAX7-FOXO1 ont une activité transcriptionnelle plus élevée que PAX3, PAX7 ou FOXO1 seuls. Les cellules exprimant ces protéines fusionnées présentent des caractéristiques oncogéniques tels que la perte de l'inhibition de contact, une augmentation de la prolifération et leur croissance devient indépendante de l'ancrage(88). La survie, la prolifération et l'invasion sont dues à l'activation de l'expression de certains gènes par la protéine chimérique tels que les gènes codant pour FGFR4, CXCR4, ALK et MET, tous ayant des effets oncogéniques.

ERMS est plus communs que ARMS, bien que les translocations soient plus rares dans le sous-type embryonnaire, les altérations dans le nombre de chromosomes (gain ou perte de chromosomes) sont plus communes dans l'ERMS(89). Une de ces pertes connues chez ERMS est la perte de l'allèle 11p15.5 retrouvé chez plusieurs sortes de cancers, ce qui laisse supposer que cet allèle contient un gène suppresseur de tumeur. Dans une étude qui a séquencé 60 tumeurs ERMS, plusieurs mutations ont été détecté dont des mutations des gènes codant pour la famille des RAS, des mutations de la protéine FGFR4 qui favorise la progression tumorale, PIK3CA un oncogène (90) et CTNNB1 qui code pour la β -catenin, une protéine impliquée dans la transcription de l'oncogène Wnt et l'adhésion cellulaire(91).

Une autre protéine hautement exprimée à la surface des cellules du RMS est B7-H3 (CD276). De la famille des B7, des inhibiteurs de point de contrôle, B7-H3 a été retrouvé hautement exprimé dans le RMS embryonnaire et alvéolaire contrairement aux tissus sains(92). Cette molécule a été reliée avec l'évasion immunitaire de la tumeur. En effet, lorsque ce gène est éliminé des cellules du RMS, l'infiltration des cellules T est plus importante(92). Donc, B7-H3 représente une cible d'intérêt pour cibler le rhabdomyosarcome. D'ailleurs plusieurs études ont démontré que l'utilisation d'anticorps ciblant B7-H3 pouvait être efficaces contre les tumeurs qui surexpriment cet inhibiteur de point de contrôle tels les traitements précliniques impliquant le pyrrolobenzodiazepine (PBD) conjugué à un anticorps ciblant B7-H3(93). Il en est de même pour FGFR4, plusieurs anticorps ciblant FGFR4 ont été développés afin de cibler plusieurs cancers qui surexpriment cette molécule(94). Donc il semblerait que FGFR4 et B7-H3 soient de bons candidats comme cibles pour éliminer les cellules de rhabdomyosarcome.

1.2.2.1 L'expression d'HLA-E par les cellules du RMS comme mécanisme d'échappement immunitaire

Pour se développer, les cellules tumorales doivent échapper aux cellules du système immunitaire. Un des mécanismes d'échappement, est de réguler à la baisse l'antigène du complexe majeur d'histocompatibilité A, B et C (HLA-A/B/C). Ce mécanisme permet aux cellules de diminuer la présentation de neoantigènes via la molécule HLA et ainsi d'échapper à la reconnaissance par les lymphocytes T(95). Bien que ces molécules soient régulées à la baisse, la molécule non classique HLA-E peut être régulée à la hausse. HLA-E est un ligand du récepteur inhibiteur NKG2A. Les cellules du rhabdomyosarcome surexpriment HLA-E(96).

NKG2A est une protéine exprimée à la surface des cellules NK. La partie intracytoplasmique de ce récepteur présente des motifs inhibiteurs immuns basés sur la tyrosine (ITIM). Ces motifs se phosphorylent lorsque NKG2A reconnaît sa cible. Ceci permet l'attachement des phosphatases SHP-1 et SHP-2 et leur activation subséquente. Lorsque ces phosphatases sont activées, elles inhibent les signaux d'activation cellulaire (97).

Dans les tumeurs solides telles que les carcinomes ovariens et les carcinomes pulmonaires, le maintien de l'expression des molécules HLA classiques et l'infiltration des lymphocytes T sont

associés à un pronostic positif. Cependant, lorsque la tumeur surexprime HLA-E, bien que les lymphocytes soient infiltrés et les molécules HLA classiques exprimés, le pronostic n'est pas positif(95). De plus, HLA-E a aussi un effet inhibiteur des cellules NK. En effet, lorsque HLA-E se lie au récepteur NKG2A, exprimé par 20-50% d'NK circulants, un signal inhibiteur est envoyé via la phosphorylation des ITIM qui se traduit via la déphosphorylation des protéines activatrices ZAP70 ou VAV1. Il a été montré que à la suite de l'interaction NKG2A: HLA-E, la formation de la synapse immunologique dans les cellules NK est affectée négativement, ce qui diminue la capacité cytotoxique des celles-ci(98).

Dans un contexte non cancéreux, NKG2A ainsi que les KIR inhibiteurs, ont un rôle dans l'éducation des cellules NK. Les cellules NK exprimant les ligands inhibiteurs capables de reconnaître les molécules HLA de classe I présentent une meilleure activité lorsqu'elles rencontrent des cellules déficientes en HLA de classe I que les cellules NK n'exprimant pas les ligands inhibiteurs(99). De plus, les cellules NK exprimant NKG2A ont une migration plus dynamique que les NK qui ne l'expriment pas. Cependant, lorsque les cellules NK sont déjà éduqués, le blocage ou l'élimination du récepteur NKG2A augmente l'efficacité des NK contre les cellules cibles surexprimant HLA-E. Kamiya et al ont générés des NK NKG2A^{null} à partir de cellules NK de sang périphérique. Ces cellules ont été injectées à des souris immunodéficientes ayant des tumeurs surexprimant HLA-E. La cytotoxicité des NK NKG2A^{null} était supérieur à celle des NK exprimant NKG2A(100).

1.2.2.2 CRISPR-Cas comme outil contre le rhabdomyosarcome

Le domaine de la biologie a connu un important avancement lors de l'arrivé de la technologie CRISPR. Cette technologie consiste en l'utilisation d'une nucléase Cas combiné à un ARN guide afin de reconnaître une séquence d'ADN bien précise et la cliver. Provenant d'un système de défense contre les phages par les bactéries, cette technologie permet de modifier le génome de façon précise et évaluer l'effet de ces modifications.

Il existe plusieurs types de CRISPR-Cas chez les bactéries : I, II et III, et 12 sous-types. De façon générale, ce qui différencie un type de l'autre c'est l'endonucléase utilisée. Le type I requière la Cas6 et le recrutement de la Cas3 suite à la reconnaissance de l'ADN. Le système III reconnaît et

clive l'ARN. Le système II requière la Cas6 et un complexe contenant la Cas10. Il reconnaît et clive l'ADN. Plus simple que les types I et II, il ne requière qu'une endonucléase: la Cas9(101).

De façon générale, dans le génome bactérien nous retrouvons les gènes codants pour l'ARN trans activateur (tracrARN), l'endonucléase et une série d'espaceurs contenant différents CRISPR ARN (crARN) flanqués de séquences répétées(102). Tout ceci, lorsque combiné est capable de reconnaître la séquence homologue au crARN. La Cas9 va procéder au clivage de l'ADN seulement si une séquence PAM est présente au niveau de la séquence reconnue. Ceci permet à la bactérie d'éviter de cliver son propre ADN. En effet, les espaceurs codant pour le crARN ne contiennent pas de séquence PAM. Les séquences PAM sont de courtes séquences de quelques nucléotides. Dans le système CRISPR Cas9 de *S.pyogenes*, qui est le plus utilisé, la séquence PAM ou proto-espaceur est NGG, où N est n'importe quel nucléotide(103). Dans le système CRISPR Cas9 de type II, nous retrouvons une seule endonucléase : la Cas9. Le système se compose aussi d'un crARN et un tracrARN. Le tracrARN s'associe au crARN formant un ARN double brin qui est clivé par la RNase III. Les deux ARN recrutent la Cas9 formant un complexe très stable. Celui-ci s'associe à l'ADN double brin qui contient une homologie dans les 17 à 20 premier nucléotides avec le crARN (104). Pour adapter ce système aux manipulations effectuées en biologie moléculaire, un ARN chimérique appelé ARNg a été produit en fusionnant le tracrARN et le crARN. Lorsque la séquence cible est reconnu par l'ARNg du système CRISPR Cas9, l'endonucléase effectue un clivage double brin de l'ADN cible.

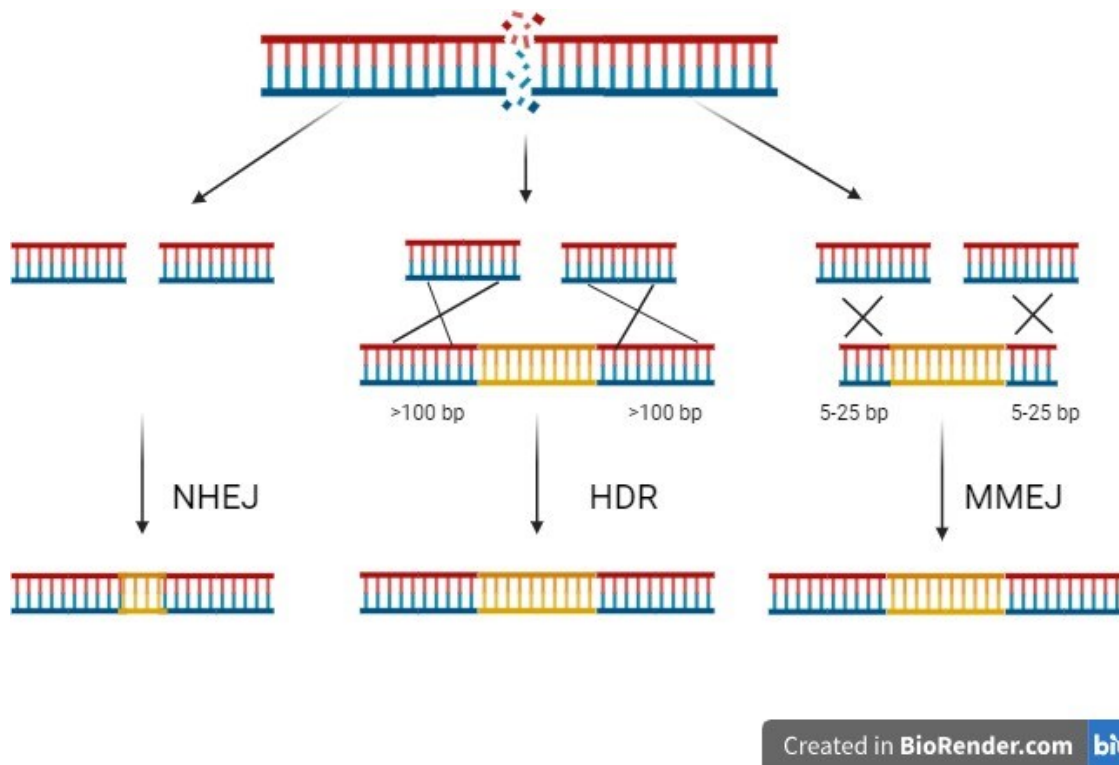


Figure 5. – Différents mécanismes par lesquelles les cellules eucaryotes réparent une cassure d’ADN double brins.

À gauche, un mécanisme de réparation non-conservatif permet de restaurer l’ADN double brin sans utiliser de brin modèle. Les deux autres mécanismes (au milieu et à droite) sont conservatifs et utilisent un brin d’ADN modèle comportant des séquences homologues à l’ADN brisé. La longueur des séquences homologues varie entre les deux mécanismes. (Adapté de Mert Yanik et al, 2018)

Dans les cellules eucaryotes, les mécanismes de réparation sont : la jonction d’extrémités non homologues (NHEJ), la jonction médiée par les micro-homologies (MMEJ) et la réparation par recombinaison homologue (HDR) (**Figure 5**). Le NHEJ relie directement les deux bouts d’ADN ensemble avec un minimum de modification. Lorsqu’il n’est pas possible de lier les deux bouts directement, il y a des protéines telles qu’Artemis qui rentrent en jeu pour ajouter des nucléotides de façon aléatoire. Un autre mécanisme de réparation qui peut entrer en jeu lorsqu’il y a une coupure double brin c’est MMEJ, qui commence avec une élimination d’une courte partie de l’ADN suivi d’ajout de nucléotides la ligation des deux bouts(105). Ces réparations font en sorte d’ajouter des mutations qui peuvent causer un changement dans le cadre de lecture ou bien faire en sorte que la protéine ne soit plus fonctionnelle donnant lieu à un “knock-out” (106).

Finalement, il est aussi possible de réparer le bris via le HDR. Ce dernier système de réparation reconnaît des régions d'ADN homologues à la zone clivée et l'utilise comme modèle pour réparer et lier les deux brins clivés. Cette stratégie peut être utilisée pour insérer des fragments d'intérêt dans la zone clivée en administrant à la cellule d'importantes quantités du fragment d'intérêt flanqué par des séquences homologues aux séquences clivées, donnant lieu à un "knock-in"(107). Bien que la technologie CRISPR soit précise, il est possible de retrouver des coupures dans des zones du génome qui ne sont pas souhaitées. Lorsqu'il y a un mésappariement dans la séquence du PAM, il y a peu de chance que la Cas9 clive l'ADN double brin. Cependant lorsque le mésappariement est dans les 8 à 10 nucléotides en amont du PAM, il est possible d'avoir un clivage par la Cas9 et par conséquent de l'« off-target »(108), d'où l'importance de bien sélectionner l'ARNg.

Cette technologie peut être appliquée pour améliorer l'efficacité des NK dans le contexte des tumeurs solides, tels que le rhabdomyosarcome. En effet, les cellules du rhabdomyosarcome expriment HLA-E, un ligand du récepteur inhibiteur NKG2A exprimé à la surface des cellules NK.

À l'aide de la technologie CRISPR Cas9 il est possible de designer un gARN capable de cibler KLRC1, le gène codant pour NKG2A. De cette façon, le signal inhibiteur sera éliminé, augmentant ainsi la probabilité d'activer la cellule contre ce type de cancer. En plus de cette modification, l'ajout du CAR contre une cible exprimée par le rhabdomyosarcome augmenterait encore plus la capacité cytotoxique et spécifique des NK. Afin de pouvoir effectuer ces modifications, il faut transduire les NK avec des constructions contenant le système CRISPR Cas9 et CAR. Cependant, un des majeurs défis des NK est leur résistance à la transduction(109).

1.2.2.3 L'utilisation de vecteurs lentiviraux avec enveloppe de babouin pour une transduction efficace des NK contre le RMS

La transduction des cellules NK a depuis toujours été un défi. En effet, plusieurs équipes essayant de produire des CAR-NK se sont heurtées à cet obstacle. Ainsi, pour modifier génétiquement les NK deux méthodes sont utilisées : soit l'utilisation de vecteurs viraux ou l'électroporation (110).

Les vecteurs viraux utilisés incluent les rétrovirus tels que les gamma rétrovirus et les lentivirus. Les gamma-rétrovirus tels que le MLV, ont été utilisés aux débuts de la thérapie génique. Ils sont

simples à modifier et permettent d'obtenir un haut taux de transduction. Chez les NK, l'efficacité de transduction est de 50% (111).

Pour attendre un tel taux de transduction, les cellules NK doivent être transduites plusieurs fois. Ceci est toxique pour les cellules et cause beaucoup de mortalité. De plus, les rétrovirus peuvent seulement transduire des cellules qui sont en mitose, car ils ne peuvent pas avoir accès à la chromatine si la membrane nucléaire est présente. Donc seulement les NK en division peuvent être transduites. Comme le taux de transduction est élevé en utilisant les gamma-rétrovirus, cette méthode de transduction a été longuement utilisée pour produire de CAR-NK. L'insertion du rétrovirus peut se faire dans des régions du génome où se trouvent d'importants gènes de régulation du cycle cellulaire tel que p53. D'ailleurs, lors d'études cliniques utilisant MLV chez des patients SCID, il a été observé que certains patients ont développé des leucémies à cause de l'activation transcriptionnelle de proto-oncogènes causée par l'insertion du vecteur viral(112). En effet, l'intégrase des gamma-rétrovirus a des sites d'insertions préférentiels: les sites contenant des promoteurs actifs, augmentant ainsi les chances de mutations de proto-oncogènes ou de modifier l'expression de certains gènes qui sont reliés aux cancers(113).

Afin de diminuer les risques de mutagenèse et de génotoxicité, un autre vecteur de la famille des rétrovirus est utilisé : le lentivirus. Les vecteurs lentiviraux proviennent du VIH-1 et s'intègrent préférentiellement dans les sites transcrits et évitent les sites de régulation transcriptionnelle tels que les sites codant pour les enhancers ou les promoteurs. Ainsi, ce vecteur est plus sécuritaire que le gamma-rétrovirus(114) . Le vecteur lentiviral le plus utilisé est celui qui est pseudotypé avec l'enveloppe provenant du VSV-G. Ce virus reconnaît le LDLR exprimé à la surface de plusieurs types cellulaires. Voilà pourquoi ce lentivirus permet de transduire une ample variété de cellules. Par contre, l'efficacité de transduction dans les cellules NK est tellement faible qu'il faut souvent plusieurs rondes de transduction, car celles-ci n'expriment que très peu les récepteurs LDLR(115) . Pour contourner ce problème, un pseudotypage alternatif est utilisé : l'enveloppe BaEV (109).

Le vecteur lentiviral exprimant cette enveloppe reconnaît les récepteurs ASCT1 et ASCT2 fortement exprimés par les NK en expansion. Permettant ainsi d'augmenter le taux d'efficacité de transduction significativement à de faibles MOI(109).

1.3 Problématique, hypothèses et objectifs

Le rhabdomyosarcome est le sarcome des tissus mous le plus présent chez les enfants. Ce cancer peut se développer dans n'importe quelle zone du corps, mais apparaît le plus souvent au niveau de la tête et du cou. Lorsque le rhabdomyosarcome est diagnostiqué, les traitements administrés sont la chimiothérapie, la chirurgie et la radiothérapie (116). Ces traitements ont des effets secondaires lourds tels que de la néphrotoxicité, neurotoxicité, cytopénie, alopecie, stérilité, infections, entre autres (117) (118).

De plus, lorsque les cellules tumorales de rhabdomyosarcome se métastasent, ces traitements n'améliorent pas la survie des patients. Donc, le besoin d'avoir de nouveaux traitements efficaces est urgent. Les immunothérapies actuelles telles que les lymphocytes T exprimant un récepteur antigénique chimérique (CAR) connu comme CAR-T, ont montré des résultats prometteurs dans les cas de cancers hématopoïétiques. Cependant, leur efficacité dans des contextes de tumeurs solides est décevante(119).

En effet, le milieu immunosuppresseur et la vascularisation irrégulière empêche l'infiltration et l'activation des cellules effectrices. D'autres thérapies telles qu'anti-PD1 et anti-CTLA4 ont montré leur efficacité face à certaines tumeurs solides comme le mélanome ou certains cancers du poumon. En revanche, leur efficacité se limite aux tumeurs dont le fardeau mutationnel est très élevé. Les cellules NK, avec leur capacité intrinsèque à éliminer les cellules transformées dans leurs premiers stades de cancérisation et de prévenir le développement des tumeurs, représentent un bon candidat contre les tumeurs solides. En effet, notre première hypothèse est qu'en modifiant les cellules NK en leur faisant exprimer un CAR capable de reconnaître le rhabdomyosarcome, cela permettrait d'augmenter leur cytotoxicité contre cette tumeur. Le CAR serait adapté à la signalisation dans les cellules NK. En effet, l'espaceur, la partie transmembranaire et la queue seraient formés par les domaines correspondants du récepteur KIR2DS2, un récepteur activateur endogène des cellules NK, qui signale via l'adaptateur DAP12. Notre deuxième hypothèse est que l'élimination du récepteur inhibiteur NKG2A exprimé par les NK éliminerait l'inhibition causée par son ligand HLA-E, qui est exprimé à la surface des cellules du RMS. La troisième hypothèse est que les NK exprimant à la fois, un CAR contre les cellules du RMS et K.O pour le gène codant pour NKG2A seraient plus efficaces que les NK non transduites, les CAR-NK et les NK NKG2A^{null}.

Donc, notre premier objectif est de transduire des cellules NK afin de leur faire exprimer un CAR à la surface et d'évaluer leur efficacité. Le deuxième objectif est d'obtenir des NK NKG2A^{null} et d'évaluer leur efficacité. Le troisième objectif est d'obtenir des NK CAR NKG2A^{null} et d'évaluer leur efficacité.

2 MATERIEL ET MÉTHODES

2.1 Réactifs et Milieux

Le « Dulbecco's Modified Eagle Medium 1X'' (DMEM) », l'Opti-MEM « Reduced Serum Media 1X » et le « Dubelcco's Phosphate-Buffered Saline 1X » (D-PBS) ont été acheté chez Gibco Life Technologies. Le sérum fœtal de veau (FBS) et le « Roswell Park Memorial Institute medium-1640 1X » étaient de Multicell Wisent. Le « Polyethylenimine, Linear, MW 25000, Transfection Grade » (PEI 25K™) provenait de Polysciences. Le bleu de Trypan 0.4% était de Gibco Life Technologies. L'albumine de sérum bovin (BSA) était obtenue de Sigma. La RetroNectin provenait de Takara. L'IL-2 provenait de Proleukin Novartis Pharmaceuticals, Canada. Le FBS était exposé à une température de 56°C pendant 30 minutes pour inactiver le complément. La préparation des milieux de cultures complets consistait à ajouter 100IU/ml de Pénicilline (Multicell), 100µg/ml de Streptomycine (Multicell) et 10% d'FBS au DMEM et RPMI, obtenant ainsi du D10 et R10 respectivement. Le FACS Buffer était fait à partir de D-PBS contenant 2%FBS et 0,2g/L d'azide de sodium (de Sigma Aldrich). Le Robosep buffer était fait à partir de D-PBS, 2%FBS et 2mM d'EDTA (Fisher Scientific). Le kit EasyStep™ Human CD3 Positive Selection II provenait de Stemcell Technologies. Les anticorps utilisés avaient différentes provenances: L'APC anti-CD56 (clone NCAM cat. #318310 de Biolegend), le PE anti-CD3 (clone UCHT1, cat. #300408, de Biolegend), l'APC anti-CD107a (clone H4A3, cat. 130-119-869, de Miltenyi), l'APC anti-CD107b (clone H4B4, cat. 130-103-896, de Miltenyi), le PE anti-DAP12 (clone 406288, cat. #IC5240P, de R&D), le BUV395 anti-IFN-γ (clone B27, cat. #563563, de BD Biosciences), l'Alexa Fluor 647 anti-PSYK (clone C87C1, cat. #2710S, de Cell Signaling), l'Alexa Fluor 647 et 488 anti-Myc (clone 9B11, cat. #2279, de Cell Signaling), le BV421 anti-CD56 (Clone NCAM16.2, cat. #550943, de BD Biociences), le 7AAD (cat. #559925 de BD Biosciences), billes de comptage « CountBright™ » (cat. #C36950, de

Thermofisher Scientific) et « LIVE/DEAD™ Fixable Aqua Dead Cell Stain Kit » (cat. #L34957, de Thermofisher Scientific). Les réactifs pour le marquage en phosflow Perm Buffer III (cat. #558050), Perm/Wash Buffer I (cat. #557885), Fix Buffer I (cat. #557870), provenaient de BD Biosciences.

Les réactifs utilisés pour le clonage, les enzymes de digestion, la ADN T3 ligase, la Q5 High-Fidelity 2X Master Mix, étaient de New England Biolabs. L'eau Ultrapure d'Invitrogen, LR clonase II Enzyme mix étaient de Thermo Fisher Scientific. Les amorces pour les PCR et séquençages ont été commandées chez Integrated DNA Technologies. La kanamycine et l'ampicilline, le milieu LB ainsi que la Kanamycine Sulfate provenait de Sigma Aldrich. L'ampicilline de Multicell Technologies. Les gels d'agarose étaient faits à partir de 1% d'agarose de Multicell dilué dans du TAE Buffer 1X obtenu de Sigma Aldrich.

2.2 Conception et clonage des constructions CAR

Les deux séquences utilisées pour le scFv des deux CARs provenaient de brevets. Le scFv du CAR anti-B7H3 provenait du brevet US20180346544A1 (120) , le scFv du CAR anti-FGF4 provenait du brevet WO2017049296A1(121) . Les séquences ont été modifiées pour y insérer des séquences de reconnaissance par des enzymes de restrictions : SpeI et MfeI aux extrémités du scFv anti B7-H3 et BspEI et MfeI aux extrémités du scFv anti-FGFR4. De plus, une séquence codant pour un peptide signal et Myc tag a été aussi ajoutée. Les scFv non phosphorylés ont été commandés sous forme de gBlocks chez IDT.

Les scFv ont été reconstitués dans du TE. 1µg d'ADN de la construction scFv anti B7-H3 a été digéré avec 10 unités de SpeI et MfeI. La même quantité d'ADN de la construction scFv anti FGFR4 a été digérée avec 10 unités de BspEI et MfeI dans les buffers correspondants pendant 1 heure à 37°C. Le vecteur d'entrée pENTR contenait une origine de réplication, un gène de résistance à la kanamycine, des séquences terminatrices de la transcription et deux séquences de recombinaison attL1 attL2 entre lesquelles se trouvait une séquence codante pour DAP12 et KIR2DS2. Afin de pouvoir procéder à l'insertion du scFv entre le DAP12 et le KIR2DS2, 1µg de vecteur d'entrée a aussi été digéré en utilisant les mêmes couples d'enzymes que pour chaque scFv respectivement. Par la suite, les produits de la digestion ont été purifiés sur colonne pour

éliminer les courtes séquences d'ADN résultantes de la digestion ainsi que les enzymes, en utilisant le kit Monarch® PCR & DNA Cleanup. Les vecteurs d'entrée ont été déphosphorylés afin d'éviter qu'ils se referment sur eux-mêmes dans le cas où la digestion aurait été partielle, réduisant ainsi le nombre de colonies sans scFv qui pourraient croître dans le milieu contenant la kanamycine. La déphosphorylation a été effectuée en utilisant 1pmol d'ADN, 1 unité de rSAP et 2µl de rCutSmart™ Buffer 10X dans un volume final de 20µL suivi d'une incubation de 30 minutes à 37°C. La réaction a été arrêtée en l'incubant à 65°C pendant 5 minutes. La ligation du scFv et du vecteur d'entrée a été effectuée à un ratio de 3:1 (vecteur : insert) et en utilisant 400 unités de T4 ADN ligase et 2µL de ligase buffer 10X dans un volume final de 20µL. La réaction a été incubée pendant 16 heures à 16°C et inactivé à 65°C pendant 10 minutes.

Le résultat de la ligation (**Figure 1**) a été utilisé pour transformer des bactéries compétentes Stbl3. 5µL de produit de ligation ont été ajoutés aux 50µL de Stbl3. Les bactéries ont été incubées pendant 30 minutes sur glace avant de subir un choc thermique pendant 30 secondes à 42°C. Pour permettre l'expression du gène de résistance, 250µL de SOC ont été ajoutés aux bactéries avant de les incuber pendant 1 heure à 37°C sous agitation. Par la suite les bactéries transformées ont étéensemencées dans une gélose contenant du milieu LB ainsi que de la kanamycine à une concentration de 50ug/ml. Les géloses ont été incubées pendant 16 heures à 37°C en position inversée.

Un minimum de 5 colonies pour chaque scFv ont été récoltés etensemencés dans du milieu liquide LB contenant 50µg/ml de kanamycine et incubé sous agitation pendant 16 heures à 37°C.

Par la suite, l'ADN de chaque culture de clone a été extrait grâce au QIAprep Spin Miniprep Kit et resuspendu dans 50µL de TE. Afin de vérifier l'insertion du scFv, 5 µL d'ADN extrait de chaque clone, ont été digérés en utilisant des enzymes de restriction. Pour la construction contenant le scFv anti FRFG4, la digestion a été effectuée avec BamHI. Pour l'anti B7-H3, les enzymes EcoRI et EcoRV ont été utilisées. Le résultat de la digestion a été observé sur gel 1% d'agarose et le profil de digestion a été comparé au profil attendu qui a été obtenu grâce à SnapGene. L'ADN des clones ayant eu le profil de digestion attendu, a été séquencé à la plateforme de Génome Québec en utilisant la technique de séquençage Sanger. Le résultat de séquençage a été vérifié grâce au

logiciel SnapGene. Les clones sélectionnés ont été utilisés pour effectuer une réaction de LR afin d'insérer la construction CAR (DAP12-T2A-scFv-Myc-KIRS2DS) dans un plasmide de destination contenant une origine de réplication, un gène codant pour la résistance à l'ampicilline (**Figure 1**), les séquences 5'UTR, 3'UTR, GAG, RRE, un élément d'ouverture de la chromatine UCEO-0.7(122), promoteur SFFV et les séquences de recombinaison attR1 et attR2. La réaction consistait en une recombinaison entre les séquences attL1 et attL2 du vecteur d'entrée et les séquences attR1 et attR2 du vecteur de destination donnant lieu à des séquences recombinées attB1 et attB2 dans le vecteur de destination entre lesquelles on retrouvait la construction CAR.

La réaction de LR a été effectuée en utilisant 5µL de plasmide d'entrée, 1 µL de vecteur d'entrée et 2µL du mix LR Clonase™II enzyme 5X. La réaction a été incubée à 25°C pendant 1 heure et arrêtée avec 1µL de Proteinase et incubé de 10 minutes à 37°C. Ensuite, 50µL de bactéries compétentes ont été transformées avec 5µL de produit d'LR et ensemencées sur des géloses contenant le milieu LB et 50µg/ml d'ampicilline. L'ADN de chaque colonie a été extrait et digéré en utilisant l'enzyme PstI. Le profil de digestion a été vérifié grâce à la migration du produit de la digestion sur gel 1% d'agarose. Les profils correspondants à ceux prédits par le logiciel SnapGene ont été sélectionnés pour être envoyés au séquençage. Les clones dont les résultats de séquençages correspondaient à la séquence de la construction générée sur SnapGene ont été sélectionnés pour faire une MaxiPrep.

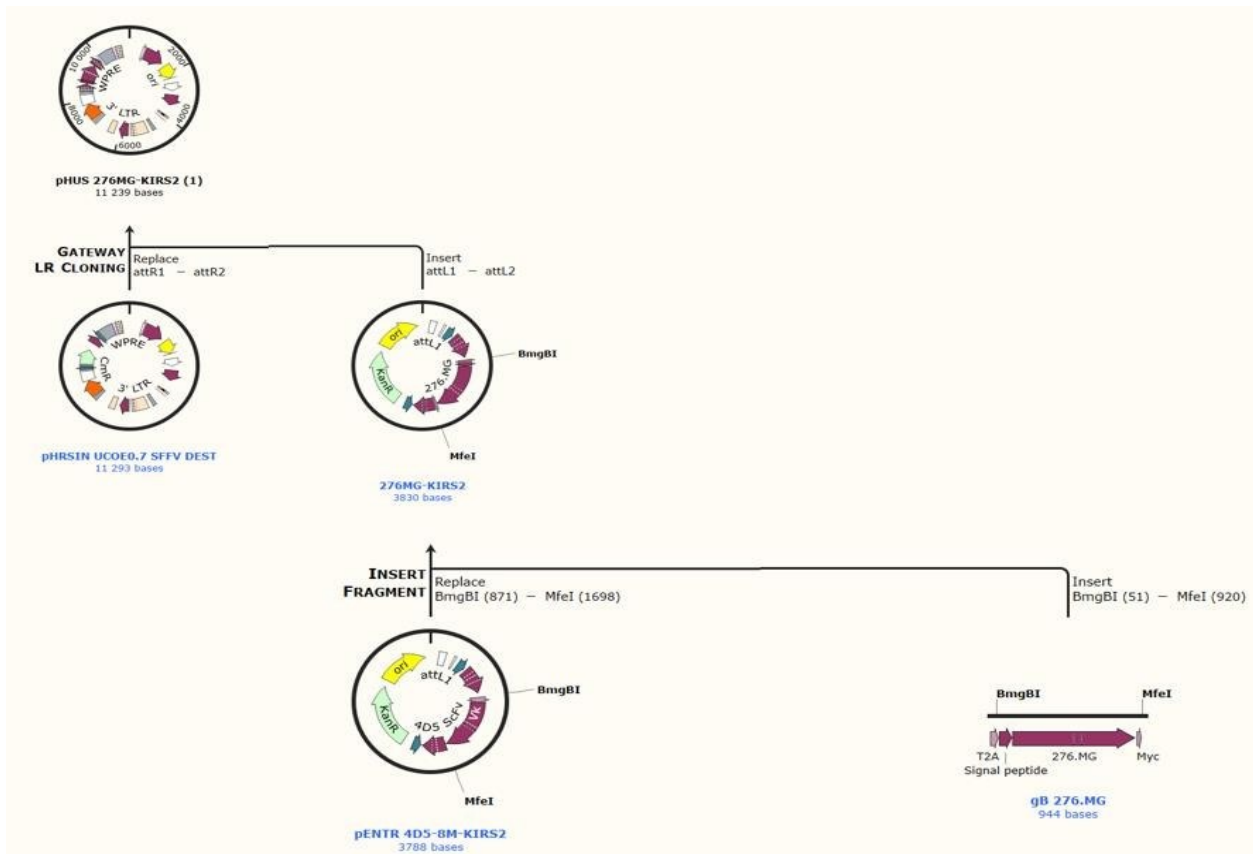


Figure 6. – Stratégie de clonage des scFv dans la construction CAR du vecteur lentiviral.

Le schéma a été obtenu grâce à l'historique SnapGene. Il représente toutes les étapes effectuées pour obtenir les vecteurs finaux.

2.3 Production virale

La production virale a été faite à partir de cellules HEK293T mises en culture dans du milieu D10. Au jour 1, 2,4 millions de cellules HEK293T ont étéensemencées dans des Petri de 10 centimètres de diamètre traités pour la culture cellulaire dans un volume total de 7ml de D10. Au jour 2, deux mélanges, A et B, ont été préparés. Le mélange A contenait le vecteur d'intérêt, le plasmide d'encapsidation psPax2 (Addgene) et le plasmide d'enveloppe BaEv (Els Verhoeyen)(123) dans de l'OPTIMEM. Le mélange B contenait du PEI et de l'OPTIMEM. Après homogénéisation, les deux mélanges ont été incubés à 25°C pendant 20 minutes. Par la suite, le mélange B a été ajouté au mélange A goutte par goutte pendant que le mélange A était sous agitation. Dans chaque Petri contenant 2.4 millions de HEK293T, 2,3ml du mélange obtenu ont été ajoutés aux cellules et le tout a été incubé pendant 16heures. Au jour 3, le milieu de culture des HEK293T a été remplacé par 7ml d'OPTIMEM et incubé pendant 48 heures. Au jour 5 le milieu de culture a été récolté et

centrifugé pendant 8 minutes à 500g. Le surnageant a été récupéré et centrifugé à 22 000 rpm pendant 1h30 à 4°C. Le surnageant a été éliminé et le culot a été resuspendu, concentré 200 fois et incubé 4 heures à 4°C avant d'aliqoter le tout et le placer à -80°C.

2.3.1 Titration virale

Les HEK293T ont été cultivées dans du milieu D10 avec 6mg de G418 Sulfate. Après 48 heures d'incubation, les cellules ont été trypsinisées, resuspendues dans du milieu D10 et comptées. Pour titrer le virus, 4000 cellules HEK293T ont été mise en culture dans une plaque de 96 puits dans un volume total de 100µL. Par la suite, des dilutions 1/10 à partir de 10µL de virus ont été faites jusqu'à 10⁻⁵. 50µL de chaque dilution a été ajouté en duplicata aux puits contenant les HEK293T. Le tout a été incubé pendant 72 heures, trypsinisé et resuspendue dans 50ul de FACS Buffer contenant du 7AAD et anti-Myc à une concentration de 1/50. Les cellules ont été passées au FACS et le titre a été calculé comme suit :

$$\text{Titre} = \left(\frac{iU}{\mu l} \right) = \{4 \times 10^3\} \times \{\% GFP+\} \times \{Facteur de dilution\}$$

2.4 Obtention des cellules NK

Nous avons obtenu du sang périphérique d'un donneur sain ayant signé un formulaire de consentement éclairé (CER3195). Tout d'abord, Une dilution à ½ de PBS stérile et de sang a été faite pour un volume final maximum de 35ml. Le mélange a été ajouté lentement à 15ml d'un Ficoll® Paque Plus (GE Healthcare). Le tout fut centrifugé à 400g pendant 30 minutes. Par la suite nous avons récupéré les PBMC retrouvées dans l'anneau formé à la suite de la centrifugation. Les cellules ont été lavées deux fois en utilisant du PBS stérile. Un échantillon de 50µL de PBMCs dans du PBS a été pris et mis de côté. Pour sélectionner les NK à partir de ces PBMCs, un kit d'EasySep™ Human CD3 Positive Selection Kit II de Stemcell™ technologies a été utilisé. 50µL de FACS Buffer contenant anti-CD3 PE, anti-CD56 APC et 7AAD a des concentrations de 1/50 ont été ajoutés aux échantillons pré-sélection et post sélection. Après une incubation de 15 minutes et un lavage, les échantillons ont été passés au FACS pour évaluer la pureté en NK.

2.5 Expansion des cellules NK

La méthode d'expansion NK-cell Activation and Expansion System (NKAES) a été utilisée pour élargir les cellules NK présentes parmi les cellules immunitaires obtenues(124). Pour cela, des cellules K562 Clone 9,25 irradiées (10000 centigray gamma) et exprimant IL-21 membranaire ont été utilisées(124). L'expansion se fait à un ratio de 1:10 NK : K562 irradiés. Au jour 1, 5 millions de cellules K562 ont été ajoutés à 500 000 cellules NK. Les cellules sont maintenues en culture dans du milieu R10 avec 100IU/mL d'IL-2. À chaque 48 heures, du milieu R10 avec 100 IU/mL d'IL-2 a été ajouté. Au jour 7, les cellules ont été comptées et ré-élargies.

2.6 Transduction de cellules NK

Pour transduire les cellules NK, 25µg de RetroNectin® (Recombinant Human Fibronectin Fragment), cat. #T100B 1 µg/µL a été incubé pendant 1 heure à 25°C dans une plaque de 12 puits non traitée pour la culture cellulaire. La RetroNectin a été lavé avec du PBS et du PBS 2% BSA a été ajouté et incubé pendant 30 minutes à 25°C pour éviter les liaisons non spécifiques et saturer la plaque. Le PBS 2% BSA a été lavé et un volume maximum de 200µL de virus contenant 100 000 unités infectieuses y a été ajouté. Le tout a été incubé à 37°C pendant 4 heures. Les NK WT et élargies pendant 7 jours ont été comptées et resuspendues à une concentration de 1 million de cellules par ml dans du milieu R10. 100 µL de NK contenant 100 000 cellules ont été par la suite ajoutées aux 200µL de virus et incubés pendant 16heures. À la fin de l'incubation, 700µL de milieu R10 avec 200 U d'IL-2 a été ajouté suivi d'une incubation de 16 heures. À la fin de l'incubation, les NK ont été élargies avec 1ml de R10 300 U d'IL-2 contenant 1 million de cellules K562 mb IL-21 irradiées.

2.7 Lignées cellulaires utilisées et leur mise en culture

Les lignées cellulaires de rhabdomyosarcome utilisées étaient RH-30 et RD (ATCC) (125) (126). Les deux ont été cultivées dans des flasques T75 et passées chaque 2 jours. RH-30 était maintenue en culture dans du milieu R10 et RD dans du milieu D10. À chaque passage, le milieu a été aspiré et 3 ml de trypsine ont été ajoutés. Les cellules ont été incubées 3 minutes à 37°C avec la trypsine. Avant d'arrêter la digestion les cellules ont été observées au microscope pour vérifier qu'elles ont été décollées. Par la suite 7 ml de milieu D10 ou R10 a été ajouté pour arrêter la trypsine. Les

cellules décollées et resuspendues dans leur milieu ont été comptées et 1 million de cellules RD et RH-30 ont étéensemencées dans une flasque T75.

2.7.1 Transduction des lignées cellulaires

Les lignées cellulaires de RMS utilisées ont été transduites pour exprimer la GFP. La transduction a été effectuée en utilisant un vecteur lentiviral VSV-G contenant un plasmide codant pour la GFP. Les cellules ont été décollées en utilisant de la trypsine comme décrit précédemment et resuspendues dans le milieu correspondant. 300µL contenant 100 000 cellules de chaque lignée ont étéensemencé dans un puit d'une plaque de 6 puits et, par la suite, différentes MOI de virus ont été ajoutées. Les cellules ont été incubées pendant 16 à 24h jusqu'à ce que la confluence soit élevée. Les cellules ont été par la suite décollées et passées au FACS pour évaluer l'expression de GFP. Ensuite, elles ont été remises en culture.

2.7.2 Triage cellulaire et génération de clones

Après chaque transduction, que ce soit des lignées cellulaires ou des cellules NK, pour obtenir une plus grande population exprimant le transgène, les cellules ont été triées en suivant le protocole en place. Entre 10 et 25x10⁶ cellules/ml ont été lavées avec du milieu Robosep Buffer deux fois et resuspendues dans 100µL de ce même milieu et transféré dans un tube stérile BD Falcon de 5ml (cat. #352235) et marquées avec 1/100 d'anticorps. Pour les cellules NK, le marquage était composé de 7AAD, anti-CD56, anti-CD3 et anti-Myc. Les cellules cibles RD et RH-30 GFP⁺ étaient marquées avec du 7AAD seulement. Après 20 minutes d'incubation, les cellules ont été lavées avec du Robosep Buffer et resuspendues dans 500µL du même milieu. Les NK marquées ont été filtrées en utilisant un filtre de 70µm et les cellules cibles avec un filtre de 100µm. Les tubes de réception ont été préparés en utilisant les mêmes tubes stériles de 5ml auxquels on a ajouté 500µL de FBS décomplémenté. À la suite du tri, les tubes de réception ont été récupérés et lavées avec du milieu R10 pour les cellules NK et RH-30 et D10 pour les cellules RD. Les cellules cibles ont été remises en culture et les cellules NK ont été réexpansées tout de suite après le tri en ajoutant 10 fois plus de feeders que de NK triés dans du milieu R10 contenant 100U/ml d'IL-2.

2.8 Essai de cytotoxicité

Pour faire les essais de cytotoxicité, les NK ont été expandues pendant une semaine. À jour 6 de l'expansion, les cellules cibles ont été décollées en utilisant la trypsine et comptées au FACS. À partir de la concentration initiale, une dilution pour obtenir une concentration de 100 000 cellules/ml a été faite dans du milieu R10 pour les RH-30 et D10 pour les RD. 100µL de chaque lignée cellulaire a été mis en triplicata pour chaque ratio et pour la condition contrôle dans une plaque 96 puits à fonds plat. La plaque est ensuite incubée à 37°C pendant 16 heures. Au jour 7 de l'expansion des NK, celles-ci ont été comptées au FACS après marquage anti-CD56, anti-CD3, anti-Myc et 7AAD. Une première dilution a été par la suite effectuée, ramenant la concentration à 50 000 cellules NK/ml (correspondant au ratio 1:2) dans du R10 40U/ml d'IL-2. Par la suite des dilutions ½ ont été effectuées pour obtenir les autres ratios (1:4, 1:8 et 1:16) dans le même milieu. 100µL de chaque dilution a été ajoutée aux 100µL de cellules cible mises en culture dans la plaque 96 puits.

Pour initier l'essai de cytotoxicité, la plaque a été centrifugée à une vitesse de 200g pendant 1 minute et incubée pendant 4 et 24heures respectivement. Après ces temps, les plaques ont été récupérées, les milieux aspirés et 50µL de trypsine a été ajouté. La plaque a été incubée pendant 12 minutes. Après, 150µL de milieu FACS Buffer 10%FBS contenant 0.5µL/ml de 7AAD ont été ajoutés. La plaque a ensuite été lue au lecteur de plaque. Les évènements 7AAD⁻ GFP⁺ ont été considérés comme étant des cellules cibles vivantes. Le pourcentage de cytotoxicité a été calculé par rapport au compte de cellules cibles vivantes se retrouvant dans la condition contrôle, c'est à dire la condition ne contenant pas de NK selon la formule suivante:

*% de cytotoxicité = 100 - (cellules vivantes pour un certain ratio / moyenne des cellules dans la condition contrôle) * 100*

2.9 Essai de dégranulation et mesure de l'IFN-γ

Les cellules NK ont été expandues pendant 7 jours. Au jour 6, les cellules cibles RD et RH-30 ont été décollées avec de la trypsine selon le protocole décrit précédemment. Les cellules ont été comptées au FACS et 200µL de milieu contenant 100 000 cellules ont été ajouté à chaque puit en duplicata pour chaque condition. Les cellules cibles ont par la suite été incubées pendant 16 heures. Au jour 7 de l'expansion des NK, les cellules ont été comptées au FACS et diluées à une

concentration de 250 000 cellules/ml dans du milieu R10 avec 40U/ml d'IL-2. 200µL de cette concentration a été par la suite ajoutée en duplicata à chaque condition exceptée à la condition des cellules seules. Pour le contrôle positif, 200µL contenant 100 000 cellules K562 WT ont été ensemencés dans deux puits de la plaque et par la suite 50 000 cellules NK ont été ajoutées par-dessus. Pour évaluer la dégranulation, un mélange contenant 1:1 d'anticorps anti CD107a et CD107b a été constitué. Nous avons ensuite distribué 6µL de ce mélange par puit. Pour évaluer la production d'IFN- γ , 26,6µL d'une solution 1/100 de GolgiStop™ (cat. #554715, de BD Biosciences) dans du D-PBS a été ajouté à chaque puit.

La plaque a ensuite été centrifugée à une vitesse de 200g pendant 1 minute et incubée à 37°C pendant 4h. Après les 4 heures d'incubation, la plaque a été mise sur glace pour arrêter la réaction. 200µL par puit ont été récoltés, transférés dans une plaque 96puits en fond 'v' et lavés avec du D-PBS. Après 50 µL d'une solution contenant du « aqua viability dye » à 1/400 et de l'anti-CD56 en PE ont été ajoutés aux cellules lavées. Elles ont par la suite été incubées pendant 30 minutes à 4°C et lavées avec du FACS Buffer. Afin de fixer et perméabiliser les cellules, on a ajouté 100µL par puit de la solution Fix/perm et incubé pendant 20 minutes à 4°C. Les cellules ont par la suite été lavées avec 200µL du PermWash buffer dilué à 1/10 dans de l'eau. Pour marquer l'IFN- γ produit, 50µL d'une dilution de 1/100 d'anti-IFN- γ dans du Perm/Wash buffer a été ajouté à chaque puit et incubé pendant 30 minutes à 30°C. Les cellules ont été par la suite lavées deux fois avec du Perm/Wash buffer et resuspendues dans 100µL de FACS Buffer.

2.10 Phosphoflow

Le phosphoflow été effectué pour déterminer l'activation des NK en détectant la phosphorylation de la protéine Syk. Les anticorps utilisés étaient : anti-CD3, anti-CD56 clone NCAM16.2, anti-phospho-syk et anti-DAP12. Pour effectuer le marquage, un minimum de 50 000 cellules était requis. Les cellules ont été lavées avec du D-PBS. 50µL de D-PBS contenant du LIVE/DEAD™ Fixable Aqua Dead Cell Stain à une concentration de 1/400 a été ajouté suivi d'une incubation de 30 minutes à 4°C. Les cellules ont ensuite été lavées avec du PBS et resuspendues dans 1 ml de Fix Buffer I 4.2% formaldéhyde préchauffé à 37°C. Les cellules ont été incubées à 15 minutes à 37°C et lavées avec du PBS. Après avoir été fixées, les cellules ont été marquées avec anti-CD3 et anti-

CD56. Ce marquage a été effectué après la fixation pour éviter toute possible interaction de l'anticorps avec sa cible qui pourrait causer une activation de la cellule. Les cellules ont été incubées pendant 30 minutes à 4°C. Les cellules ont ensuite été lavées avec du PBS et resuspendues dans 1 ml de PhosphoFlow™ Perm Buffer III à -20°C et incubées pendant 30 minutes sur glace. Après l'incubation, les cellules ont été lavées deux fois avec Perm/Wash buffer diluées 1/10 dans ddH₂O pour éviter que les pores à la surface des cellules se referment. Pour le marquage des protéines intracellulaires, les anticorps anti-DAP12 et anti-Phospho-Syk ont été utilisés. Ils ont été dilués 1/100 dans du Perm/Wash buffer et ajoutés aux cellules NK. Suivi d'une incubation de 30 minutes à 4°C. Les cellules ont été lavées avec Perm/Wash buffer et resuspendues dans du FACS buffer.

2.11 Génération de sphéroïdes

Les sphéroïdes ont été générés avec la lignée RH-30 transduite pour exprimer la GFP. Les cellules cultivées dans une flasque T75 dans du milieu R10 ont été décollées en utilisant de la trypsine 0.25% et comptées au FACS. 100µL de milieu R10 contenant 2500 cellules ont étéensemencées en triplicata dans des puits d'une plaque en fonds U d'adhérence ultra faible. La plaque a par la suite été centrifugée à une vitesse de 1000rpm pendant 5 minutes. Les sphéroïdes ont été incubés à 37°C pendant 7 jours. Au jour 3, les sphéroïdes ont été digérés avec de la trypsine, lavés et comptés au FACS avant d'être remis en culture à la même concentration qu'initialement.

Au jour 7, différents ratios de cellules NK ont été ajoutés à chaque puits et incubés pendant 24h heures. Le pourcentage de cytotoxicité a été calculé à partir de l'évolution du diamètre du sphéroïde par rapport à la condition contrôle à l'IncuCyte. L'autre façon à l'aide de laquelle nous avons mesuré la cytotoxicité était le FACS. Le sphéroïde a été digéré dans de la trypsine, resuspendue dans du milieu FACS 10%FBS, 1/100 7AAD et les cellules ont été comptées au FACS.

2.12 Design et clonage des ARNg

Afin d'obtenir des ARN guides capables de cibler efficacement le gène "killer cell lectin like receptor C1 (KLRC1)" qui code pour la protéine NKG2A, nous avons tout d'abord téléchargé la séquence du gène et les différentes variantes du transcrit et des protéines à partir de NCBI. Nous avons sélectionné "KLRC1 killer cell lectin like receptor C1 [Homo sapiens (human)]". Le gène

contient 9 exons dont 6 sont codants. Afin de pouvoir éliminer tous les différents variants de la protéine, nous avons décidé de cibler les premiers exons communs à tous les différents variants de la protéine. Les ARN guides ciblant KLRC1 ont été générés grâce au logiciel CHOPCHOP(127). Dans la section “Target” nous avons inséré “KLRC1”, dans “In” nous avons sélectionné “Homo sapiens (hg38/GRCh38)”, dans la section “Using” nous avons choisi “CRISPR/Cas9” et dans “For” nous avons rentré “knock-out”. Les ARN guides choisis étaient #18, 41 et 5 ciblant les exons 1 et 2 (**Tableau 1**) et clonés dans un vecteur LentiCRISPRv2(128), gracieusement offert par Dr Feng Zhang (Departments of Brain and Cognitive Sciences and Biological Engineering, Massachusetts Institute of Technology, Cambridge États-Unis). Ce vecteur contenait une séquence codant pour la protéine Cas9 provenant de *S.pyogenes* sous le contrôle du promoteur EF-1 α , un gène codant pour la puromycine et un gène codant pour la résistance à l’ampicilline. Les ARN guides choisis ont été modifiés pour y ajouter des bouts collants complémentaires à ceux créés par BsmBI et commandés sous forme phosphorylés chez IDT. Le vecteur a été digéré en utilisant l’enzyme BsmBI pendant 1 heure à 37°C et déphosphorylé en utilisant 1 unité de rSap suivi d’une incubation pendant 30 minutes à 37°C et une inactivation de l’enzyme à 65°C pendant 10 minutes. La ligation a ensuite été faite entre le vecteur et l’ARN guide en utilisant la T3 ligase à un ratio 3:1 insert: vecteur et en incubant pendant 10 minutes à 25°C. 3 μ L de produit de la ligation a été utilisé pour transformer des bactéries Stbl3 en utilisant le protocole de choc thermique. Les bactéries ont par la suite été cultivées dans une gélose contenant du milieu LB ainsi que de l’ampicilline. Les colonies ayant proliférées sur cette gélose ont été piquées et cultivées dans du milieu liquide LB avec ampicilline pendant 16 heures à 37°C. Pour chaque colonie, l’ADN a été extrait en utilisant QIAprep Spin Miniprep Kit et séquencé avec le séquençage Sanger effectué par Génome Québec. Les colonies dont le séquençage correspond au plasmide obtenu virtuellement sur le logiciel SnapGene ont été utilisées pour transduire des cellules NK.

Tableau 1. – Séquences d’ARN guides sélectionnées pour combiner avec CRISPR Cas9

Guide	Séquence	Localisation	Mésappariements
EC9	GGTCTGAGTAGATTACTCCT	Chr12 : 10451126	0
RG50	AGGCAGCAACGAAAACCTAAAGG	Chr12 : 10451080	0
RG35	GAAGCTCATTGTTGGGATCCTGG	Chr12 : 10450538	0

2.12.1 Génération des NK KLRC1 KO

Afin de pouvoir transduire des cellules NK, des particules virales avec enveloppe de BaEv ont été produites selon le protocole décrit précédemment. Le virus a été titré en utilisant des HEK293T auxquelles nous avons ajouté différentes dilutions du virus concentré 200 fois. Après 48 heures 5µg/ml de puromycine a été ajouté aux HEK pendant 7 jours. Les cellules ont par la suite été comptées au FACS afin de déterminer le titre viral. Les cellules NK provenaient d'un donneur sain et consentant, elles ont été purifiées et expandues en utilisant le système NKAES. Les NKAES ont été comptés au FACS après 7 jours d'expansion et transduites selon le protocole décrit précédemment à une MOI de 1. 48 heures après la transduction les NK ont été sélectionnées pendant 5 jours avec 1µg/ml de puromycine. Elles ont ensuite été marquées avec anti-CD56 APC, anti-NKG2a PE, anti-CD3 FITC et 7AAD afin d'évaluer l'expression d'NKG2A comparativement à la condition non transduite.

2.13 Digital PCR

Pour chaque condition, 3 millions de cellules NK à jour 7 d'expansion ont été récoltées, centrifugées à 400g pendant 5 minutes et lavées au PBS avant de les recentrifuger et d'aspirer le surnageant afin d'obtenir un culot sec qui a été conservé à -80°C jusqu'à son utilisation. L'extraction de l'ADN a été effectuée grâce au Kit "DNeasy Blood & Tissue Kit Quick". La concentration d'ADN obtenue a été mesurée au Nanodrop et diluée à des concentrations de 12,5, 5 et 2,5 ng/µl dans de l'eau UltraPure™ DNase/RNase-Free Distilled Water (Invitrogen). Les amorces et les sondes (HEX ou FAM) utilisées étaient spécifiques aux régions HIV-1 Rev response element (RRE) et Ribosomal Protein L32(RPL32) (**Tableau 2 et Tableau 3**).

Tableau 2. – Séquences des amorces utilisées pour l’amplification de la construction CAR ANTI-FGFR4

		Séquence	Tm (°C)
Amorces	Primer_RRE_Fw	AAACTCATTTGCACCACTGC	64
	Primer_RRE_Rv	AATTTCTCTGTCCCACTCCATC	64
	Primer_RPL32_Fw	CAAGGAAAGACGAGCTGTAGG	65
	Primer_RPL32_Rv	GGGCAGTTGCATCTTCATATTC	64
Sondes	Probe_RRE_FAM	TGTGCCTTGGAATGCTAGTTGGAGT	71
	Probe_RPL32_HEX	AGCTGCAGGCAGAAATTCTGGTAGT	71

La région RRE est présente dans le plasmide contenant la construction CAR et RPL32 est présent dans toutes les cellules humaines. Les concentrations utilisées pour des amorces RPL32 et RRE étaient de 15µM. Les concentrations des sondes pour ces mêmes régions était de 5 µM. Le thermocycleur a été réglé de pour amplifier de façon optimale l’ADN génomique (**Tableau III**).

Tableau 3. – Programme utilisé pour l’amplification de la construction CAR ANTI-FGFR4.

Température (°C)	Temps (minutes)	Variation de Température (°C/sec)	Nombre de cycles
95	10	2	1
95	0,5	2	40
62,2	1	2	40
98	10	2	1
4	Infini		En attente

3 Résultats

3.1 Obtention, expansion et transduction des NK primaires

Comme mentionné précédemment, les cellules NK ont une capacité intrinsèque à éliminer les cellules transformées. Chez les humains, les cellules NK sont caractérisées par l'expression de CD56 à leur surface et par l'absence de CD3(129). La proportion de ces cellules parmi les cellules mononuclées du sang périphérique est entre 10 et 15% (130). Afin d'obtenir assez de cellules NK pour en faire un produit thérapeutique, les cellules mononuclées du sang périphérique (PBMC) doivent être expansées. Nous utilisons un système d'activation et d'expansion des cellules NK (NKAES)(124) basé sur l'ajout d'IL-2 et de cellules nourricières K562 exprimant l'IL-21 à leur surface pendant 7 jours. Ce système a pour avantage de privilégier l'expansion des NK par rapport aux autres cellules qui se trouvent parmi les PBMC. Pour obtenir une population pure de cellules NK, un processus de sélection de ces cellules est nécessaire. En effet, au jour 7, les cellules exprimant CD3 sont déplétées, obtenant ainsi une population CD56+ CD3- (**Figure 7f**). Cette population correspond aux cellules NK. Lorsque ces cellules ont été mises en expansion, 7 jours plus tard nous avons obtenu un « fold » de 54. En effet, nous avons mis en culture 0.5 millions de cellules et nous avons récupéré 27 millions au jour 7 (**Figure 7g**).

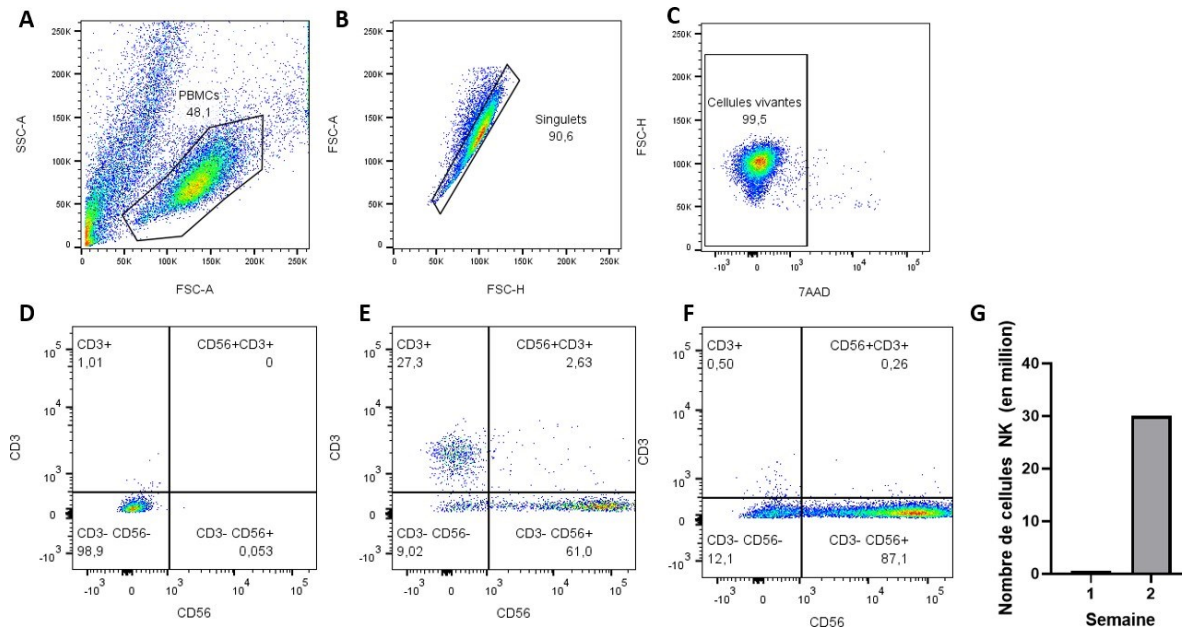


Figure 7. – Stratégie d’acquisition des cellules NK en cytométrie en flux.

Dans l’ordre, la stratégie d’acquisition commence par la délimitation de la population des PBMC selon les caractéristiques physiques (A) des cellules : la granularité (SSC-A) et la taille (FSC-A). Par la suite, les doublets sont exclus (B) en se basant sur la taille et l’aire des cellules. Les cellules mortes sont aussi exclues (C) en utilisant un marquage au 7-Aminoactinomycine D (7AAD). Afin de bien pouvoir délimiter les cellules exprimant ou pas CD3 et CD56, un échantillon non marqué a été utilisé (D). A jour 7, avant la déplétion, des cellules CD3⁺ sont observées parmi les cellules expansées. Après la déplétion CD3 (F), ces cellules ne sont plus observées et l’échantillon comporte majoritairement des cellules CD3⁻ et CD56⁺. En (G) l’expansion des cellules NK avec le système de cellules nourricières K562, permet de débiter avec 0.5 million de cellules NK et d’obtenir 27 millions après 7 jours.

Les cellules de rhabdomyosarcome, quant à elles, surexpriment à leur surface certaines protéines telles que B7-H3 et FGFR4 (**Figure 8a et 9a**). Tel que mentionné dans l’introduction, nous avons décidé de cibler ces 2 protéines car elles sont surexprimées par les cellules de RMS. De plus, elles ont déjà été utilisés en immunothérapie pour cibler différents cancers (93)(94). Donc, pour améliorer la capacité cytotoxique des NK contre le RMS, des constructions CAR codant pour un scFv ciblant le FGFR4 ou B7-H3 ont été développées. Afin de transduire les cellules NK pour qu’elles expriment ce CAR, la construction a été intégrée dans un vecteur lentiviral avec enveloppe de lentivirus pseudotypé de Babouin(109). À la suite de la production de lentivirus contenant la construction CAR, une titration a été effectuée sur des cellules HEK293T.

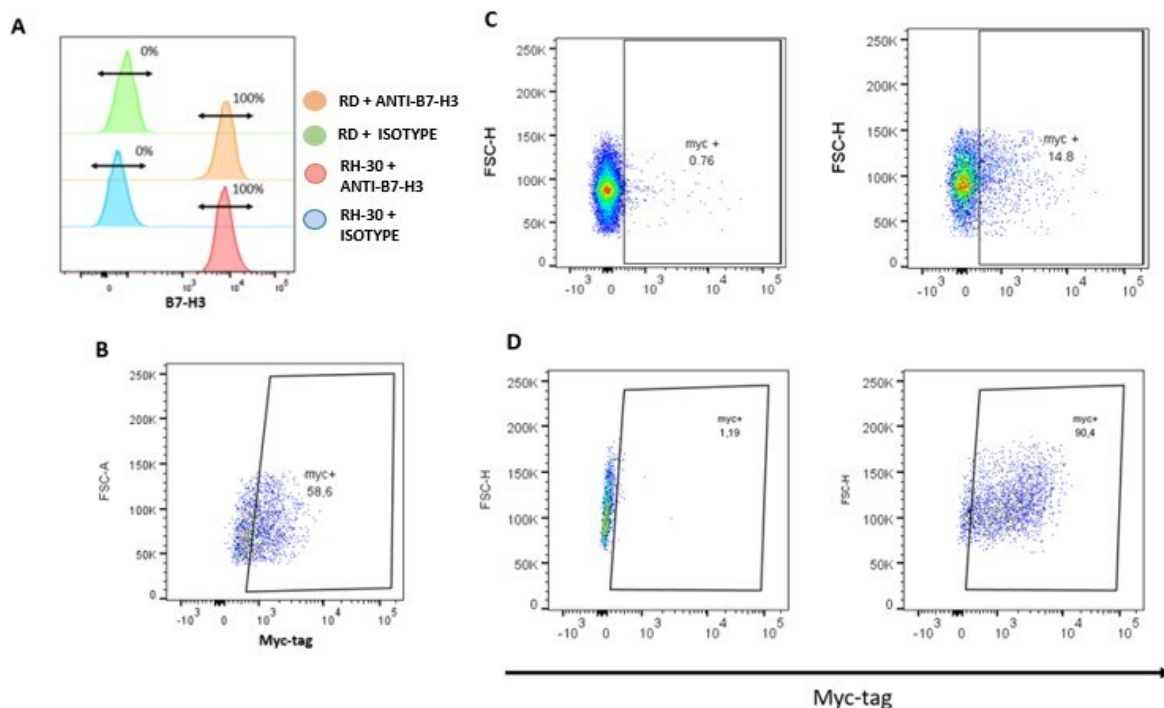


Figure 8. – Expression de B7-H3, titration virale d'un lentivirus codant pour CAR anti B7-H3 et transduction des NKAES.

Le premier panneau FACS (A), montre l'expression de B7-H3 par lignées RD et RH-30. En rouge, les cellules RH-30 marquées avec l'anti-B7-H3. En bleu, les cellules RH-30 marquées avec un isotype contrôle. En orange, les cellules RD marquées avec l'anti FGFR4. Le contrôle isotypique en vert. Les panneaux FACS (B, C et D) montrent tous le niveau d'expression de Myc, un tag présent dans la construction CAR. Le premier panneau (B) montre des cellules HEK293T transduites avec 2 μ L de lentivirus contenant la construction CAR anti-B7-H3. En (C) le panneau de gauche montre l'expression de Myc par les NKAES dans la condition contrôle non transduite. Le panneau de droite montre l'expression de Myc 7 jours après la transduction des NKAES à MOI 1. Lorsque la transduction donnait des taux entre 10 et 30%, les cellules étaient triées afin d'augmenter la proportion de NK CAR⁺. Les NK sont marquées pour CD56, CD3, la viabilité et Myc et les NKAES vivantes, CD56⁺, CD3⁻ et Myc⁺ sont triées. Par la suite les cellules ont été expandues pendant 7 jours et l'expression du CAR était évaluée au jour 7 (D). En (D), à gauche le contrôle non transduit, et à droite les cellules transduites.

La transduction des NK avec le vecteur lentiviral contenant la construction CAR anti B7-H3 permettait de donner des taux de transduction de 14% (**Figure 8c**). L'efficacité de transduction pouvait varier selon le donneur et la qualité de la production virale utilisés. À la suite du tri des cellules exprimant le CAR, le niveau d'expression pouvait aller jusqu'à 90% (**Figure 8d**).

Les lignées cellulaires du RMS surexpriment la protéine de surface FGFR4 (**Figure 9a**). Cependant, seulement 25% de la population de la lignée cellulaire RD expriment FGFR4, comparativement à

88,7% de RH-30 (**Figure 9a**). Comme mentionné précédemment, RH-30 est une lignée cellulaire de RMS alvéolaire et RD est une lignée cellulaire de RMS embryonnaire. RH-30 présente la fusion PAX2-FOXO1 caractéristique du RMS alvéolaire(88). Cette fusion régule à la hausse l'expression d'FGFR4. C'est pour cela que nous avons observé une différence d'expression dans les deux lignées.

Pour cibler le RMS en ciblant la protéine FGFR4, nous avons construit un CAR anti-FGFR4. Par contre, il a été difficile de produire des cellules NK exprimant le CAR-FGFR4. Lors de la transduction des HEK293T pour calculer le titre viral du lentivirus contenant la construction CAR anti FGFR4, le CAR anti-FGFR4 n'a pas été détecté par cytométrie en flux en utilisant l'anti-Myc tag (**Figure 9b**). Aussi, l'expression du CAR n'a pas pu être détectée sur des NK transduites en utilisant la même technique. Ce résultat, contrairement à celui du CAR anti-B7-H3 suggère qu'il y a un problème d'expression du CAR à la surface de la cellule. Bien que le titre n'ait pas pu être déterminé, 100 000 NK ont été transduites avec 200µL du virus mais aucun signal Myc⁺ n'a été détecté (**Figure 9c et d**).

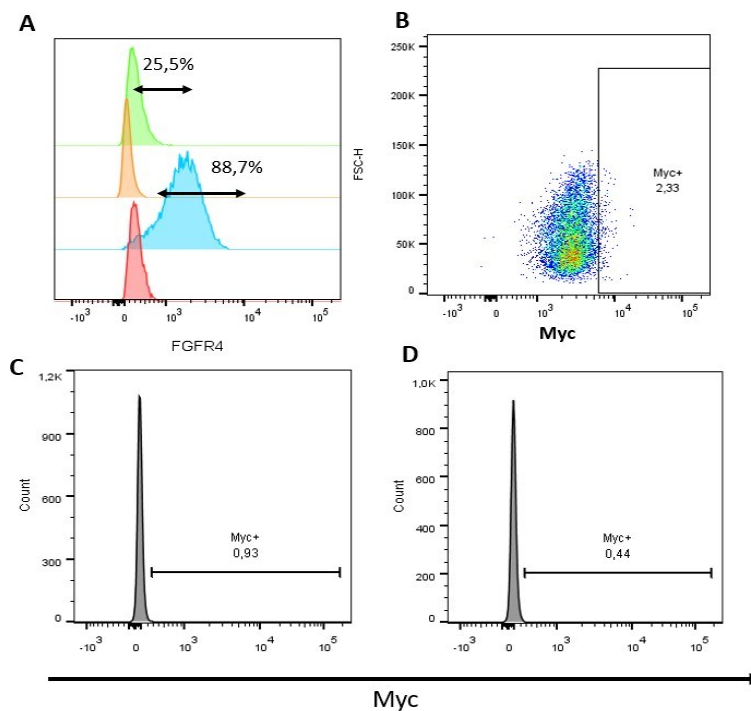


Figure 9. – Titration virale et transduction des NKAES avec la construction CAR anti FGFR4

(A) L'expression de FGFR4 par les cellules du RMS. Le taux d'expression a été déterminé par rapport aux contrôles isotypiques de chaque lignée : rouge pour RH-30 et orange pour RD. En (B), les cellules HEK293T ont été transduites avec le vecteur lentiviral contenant la construction CAR anti-FGFR4. L'expression du CAR est détectée via l'utilisation de l'anti-Myc tag. Des NK ont aussi été transduites avec ce virus et l'expression du CAR a été évaluée de la même façon que pour les HEK293T. En (C), les NK non transduites n'expriment pas de CAR anti-FGFR4. La même échelle a été utilisée pour évaluer l'expression dans les NK transduites pour ce CAR (D).

3.2 Évaluation de l'expression de la construction CAR anti-FGFR4.

Afin de déterminer pourquoi le CAR anti-FGFR4 n'est pas exprimé à la surface des cellules NK, plusieurs hypothèses ont été émises et explorées. Tout d'abord, la conformation du CAR pourrait rendre inaccessible le Myc tag pour l'anticorps utilisé pour le marquage en cytométrie. En effet, comparativement à la construction CAR anti B7-H3, le CAR anti-FGFR4 contient un séparateur CH2CH3 (Figure 9) qui pourrait causer un encombrement stérique et être en cause de l'inaccessibilité de l'anticorps anti-Myc.

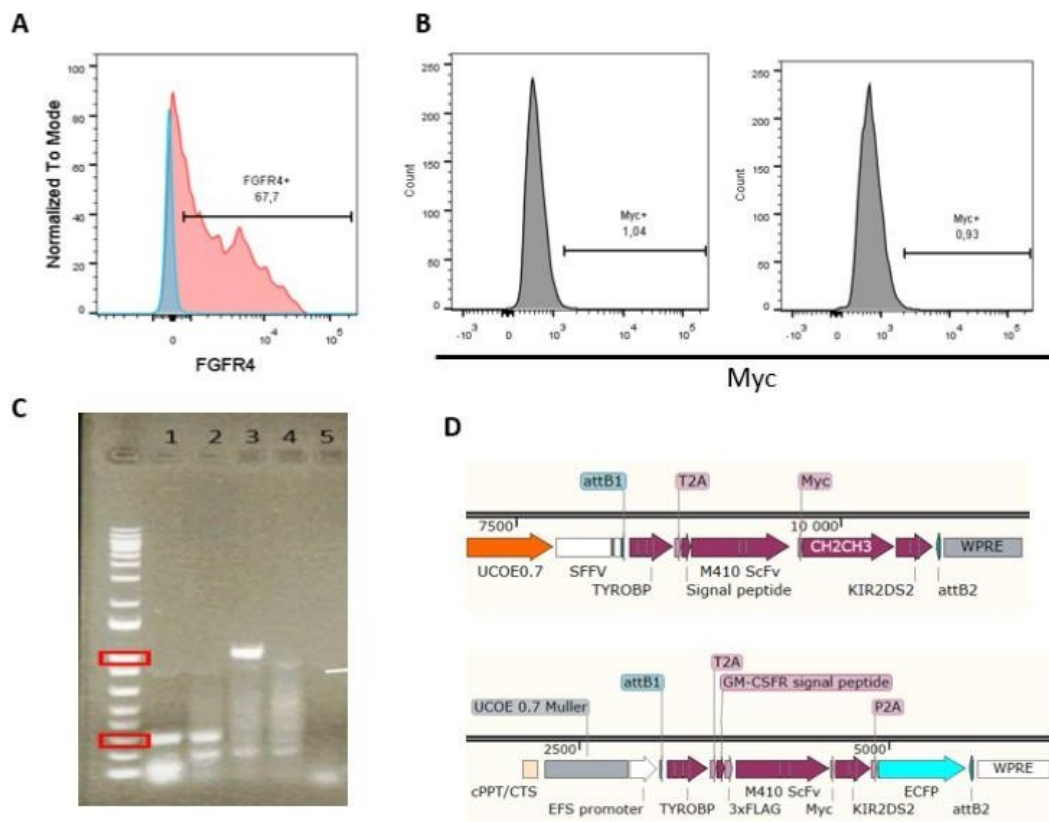


Figure 10. – Stratégies utilisées pour la détection du CAR anti-FGFR4.

(A) Afin de détecter le récepteur antigénique chimérique (CAR) sans avoir recours au Myc-tag, une protéine chimérique FGFR4 recombinée avec un domaine Fc a été utilisée. En bleu, les NK non

transduites marquées seulement avec l'anticorps anti-Fc conjugué à un fluorochrome. En rouge, les NK non transduites marquées avec la protéine FGFR4 recombinée et l'anti-Fc. **(B)** La détection du CAR en intracellulaire après la fixation et la perméabilisation des NK. À gauche le contrôle non transduit et à droite les cellules NK transduites. Pour vérifier si les cellules NK sont effectivement transduites, l'ADN génomique des NK a été extrait et une PCR a été effectuée. **(C)** L'amorce utilisée est complémentaire à la séquence Myc se trouvant dans les constructions CAR utilisées. Le rectangle rouge du haut, indique 1 000 paires de bases dans l'échelle 1Kb plus. Le rectangle rouge du bas, indique 300 paires de bases dans cette même échelle. Dans les puits 1 et 2, les contrôles positifs, des NK transduites avec des CAR détectables via le Myc en cytométrie en flux. L'amplification à partir du Myc donnerait une bande autour de 300 pb. Le troisième puit, contient l'ADN génomique des NK transduites avec le CAR anti-FGFR4. Pour cette construction, l'amplification à partir du Myc devrait en théorie produire une bande autour de 1 000 pb. Dans le puit 4, l'ADN génomique des NK non transduites après l'amplification du Myc. Dans le puit 5, un autre contrôle négatif ne contenant pas d'ADN. En **(D)** la construction du haut est la construction CAR anti-FGFR4 utilisée initialement. La transcription est sous le contrôle du promoteur SFFV. Cette construction contient également un espacement CH2CH3 ou « hinge ». Dans le schéma du bas, après le clonage du scFv, la construction CAR anti-FGFR4 sous le contrôle du promoteur EFS, sans le hinge CH2CH3 et avec un gène rapporteur fluorescent ECFP.

Une autre façon de détecter l'expression du CAR à la surface des cellules, consiste à utiliser une protéine chimérique FGFR4 ayant un domaine Fc. Le scFv se lie à la protéine chimérique FGFR4. Pour détecter le FGFR4 lié au scFv, un anti-scFv conjugué à un fluorochrome a été ajouté. Lors du marquage des NK non transduit avec le FGFR4 chimérique (**Figure 10a**), un signal positif de 67.7% a été observé, ce qui nous indique que les NK exprimaient les récepteurs de FGFR4, donc il n'était pas possible de détecter le CAR de cette façon. Le marquage intracellulaire était aussi négatif (**Figure 10b**). Ce qui semblait indiquer qu'il n'y avait pas de CAR internalisé. Bien qu'aucune des techniques utilisées ne permettait de détecter le CAR, les cellules étaient bel et bien transduites, parce que lors de l'amplification de l'ADN génomique, la construction CAR était amplifiée (**Figure 10C**). Il semblait donc que la structure du CAR causait probablement un problème d'expression à la surface. Pour essayer de résoudre cela, nous avons modifié la construction en enlevant l'espaceur CH2CH3, en ajoutant un deuxième rapporteur (ECFP) et en mettant le CAR sous contrôle du promoteur « elongation factor 1 α short » (EFS), moins fort que le SFFV(131).

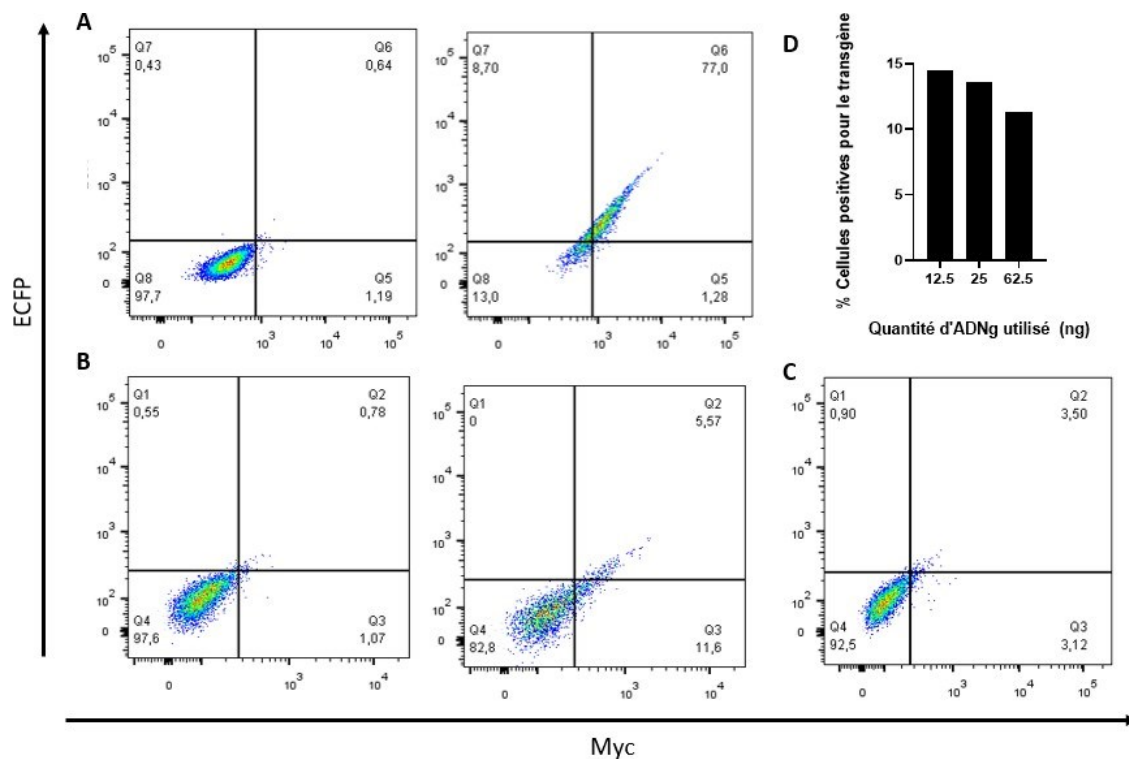


Figure 11. – Détection du CAR après la modification de la construction afin d'éliminer CH2CH3 et ajouter ECFP.

(A) Les cellules HEK293T ont été transduites avec 2 μ L du vecteur lentiviral contenant la construction EFS-DAP12-scFv anti-FGFR4-Myc-KIRS2-ECFP. À gauche, la condition HEK non transduite. À droite, les HEK transduites étaient autant positives pour Myc que pour ECFP (quadrant Q6) avec une expression de 77%. (B) Le même vecteur viral a été utilisé pour transduire des NK. 48 heures post transduction, l'expression de Myc et ECFP étaient évalués par cytométrie. À gauche la condition contrôle non transduite et à droite la condition transduite. (C) Les NK ont été expansées pendant une semaine et l'expression du CAR a été réévalué. (D) L'ADN des cellules exprimant le CAR a été extrait et une digital PCR (ddPCR) a été effectuée en amplifiant le gène contrôle RPL32 exprimé par toutes les cellules et RRE exprimé seulement par les cellules ayant le transgène. Par la suite le nombre de cellules ayant le gène RPL32 a été déterminé, ce qui représente les cellules totales, et a été comparé au nombre de cellules ayant RRE qui correspond au transgène. Ceci nous a permis de déterminer la proportion de cellules ayant le transgène.

La modification de la construction CAR permet de pouvoir détecter le Myc-tag à la surface des cellules en utilisant un anti-Myc-tag (**Figure 11**), ce qui va en direction de l'hypothèse que le séparateur CH2CH3 causait probablement un encombrement stérique, rendant le Myc inaccessible. La transcription et traduction du construit ont aussi été confirmés via l'expression d'une protéine fluorescente rapportrice ECFP. Les cellules HEK293T étaient autant positives pour l'expression du Myc que pour l'ECFP (**Figure 11a**) comparativement aux NK transduits

(**Figure 11b**). En effet, ces derniers exprimaient plus Myc que ECFP. Deux hypothèses étaient envisageables : la nouvelle construction du CAR fait en sorte que celui-ci envoie un signal d'activation cellulaire constant ce qui finit par causer la régulation à la baisse de celui-ci ou les NK transduites ont un désavantage de prolifération face aux NK non transduites qui finissent par prendre le dessus.

Quarante-huit heures après la transduction, 11.6% des NK exprimaient Myc mais pas ECFP. En effet, s'il y avait une régulation à la baisse transcriptionnelle, l'ECFP, qui a une demi vie d'environ 24 heures (132), pourrait être dégradé avant le CAR (qui lui pourrait être recyclé). Cette hypothèse est soutenue par la perte d'expression totale de Myc et d'ECFP une semaine après la première acquisition (**Figure 11c**). Cependant, la perte de signaux Myc et ECFP pourrait aussi être dû à la perte des cellules transduites en faveur des cellules non transduites qui auraient un avantage prolifératif. Afin de déterminer s'il y avait toujours des cellules NK transduites en dépit de la perte de signal en cytométrie, une PCR digitale (ddPCR) a été effectuée (**Figure 11d**). Nous avons pu déterminer qu'en moyenne 13% des cellules étaient transduites pour le CAR anti-FGFR4, bien qu'en cytométrie aucun signal n'était détecté 7 jours après l'expansion des cellules transduites. Donc il semblerait qu'il y ait une régulation à la baisse du CAR par les cellules NK.

3.3 Évaluation de l'efficacité des CAR-NK anti-B7-H3 contre les lignées RMS

Les NK transduites avec le CAR anti-B7-H3 ont été utilisées contre les deux lignées cellulaires de rhabdomyosarcome RD et RH-30 pour évaluer leur efficacité. Les ratios utilisés ont été prédéterminés en essayant plusieurs ratios de NK de type sauvage (WT) contre ces deux lignées de RMS. Le ratio qui permettait d'avoir un pourcentage de cytotoxicité entre 60-70% a été utilisé comme premier ratio afin de pouvoir observer un effet du CAR s'il y a lieu (**Figure 12**). À partir de ce ratio nous avons ajouté des ratios plus faibles afin de mieux observer la différence entre la condition contrôle et la condition avec le CAR.

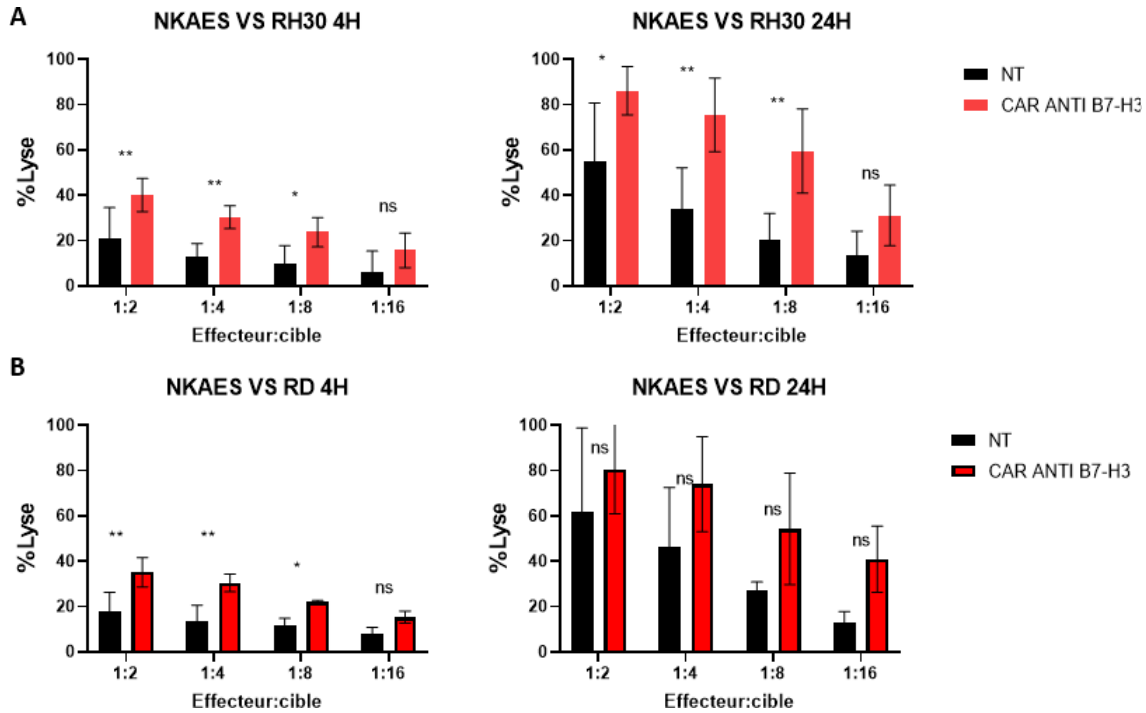


Figure 12. – Comparaison de la cytotoxicité des NK non transduites (NT) et des NK-CAR anti-B7-H3 face à RD et RH-30.

Chaque panneau montre la cytotoxicité des NK contre RH30 ou RD à un temps précis après le lancement de l'expérience. Le pourcentage de cytotoxicité est représenté dans l'axe en ordonnée et est calculé par rapport à la condition de lignée cellulaire cultivées en absence de NK. Dans l'axe en abscisse sont représentés les différents ratios (effecteurs : cible), étant les NK les effecteurs et les lignées de RMS les cibles. La condition avec les cellules NK exprimant le récepteur antigénique chimérique (CAR-NK) est représentée en rouge et la condition contrôle NK non transduite en noir. Pour chaque panel, plusieurs donneurs ont été utilisés. Pour chaque donneur, les CAR-NK ont été triés et l'expression du CAR avant la cytotoxicité variait entre 40 et 60%. **(A)** La cytotoxicité des NK transduites et CAR anti-B7-H3, contre la lignée RH-30 (n=4). À gauche, la lignée RH-30 4 heures après le début de l'essai de cytotoxicité. À droite, la cytotoxicité a été évaluée après 24 heures contre la même lignée. **(B)** La cytotoxicité des NK transduites et CAR anti-B7-H3, contre la lignée RD (n=3). À gauche, l'évaluation de la cytotoxicité après 4 heures. À droite, l'évaluation de la cytotoxicité après 24 heures. Test statistique : test t pour échantillons appariés. Alpha = 0.05. Si p est supérieur à 0.05 le test est non significatif (ns), si p est inférieur à 0.05 c'est significatif (*). Un astérisque est ajouté pour chaque N après la virgule.

Pour les deux lignées, nous avons observé que les CAR-NK étaient 15 % plus efficaces pour tous les ratios sauf 1:16 lorsque l'essai de cytotoxicité était d'une durée de 4 heures (**Figure 12A et 12B**). Cependant, la cytotoxicité à 24 heures pour RD n'a pas montré de différence significative de l'efficacité de cytotoxicité entre les NK non transduites et les CAR-NK (p = 0.365834, 0.137045, 0.150225 et 0.136173 pour les ratios 1 :2, 1 :4, 1 :8 et 1 :16 respectivement). Pour RH-30, la

différence de cytotoxicité entre les NK non transduites et transduites à 24 heures montrait une différence significative pour les CAR-NK pour tous les ratios avec des valeurs de p de 0.012, 0.0015 et 0.0025 respectivement, sauf pour le ratio 1 :16 qui avait une valeur de p de 0.1497.

En plus d'évaluer la cytotoxicité des NK en mesurant la quantité de cellules RMS vivantes à la fin de l'essai de cytotoxicité, nous avons aussi évalué la production de granules cytotoxiques et la production d'interféron gamma, car ce sont deux éléments observés lors de l'activation des cellules NK (133) (134) (135) (**Figure 13**). La dégranulation a lieu lorsque la cellule NK rencontre une cible. Une synapse immunologique est créée, les granules cytotoxiques (GC) fusionnent avec la membrane de la cellule NK et le contenu du GC est libéré. Dans le GC se retrouve entre autres, les granzymes et perforines ainsi que les protéines membranaires associées aux lysosomes LAMP1/CD107a et LAMP2/CD107b(136). Pour mesurer la dégranulation des cellules NK, des anticorps anti-LAMP1 et anti-LAMP2 ont été utilisés.

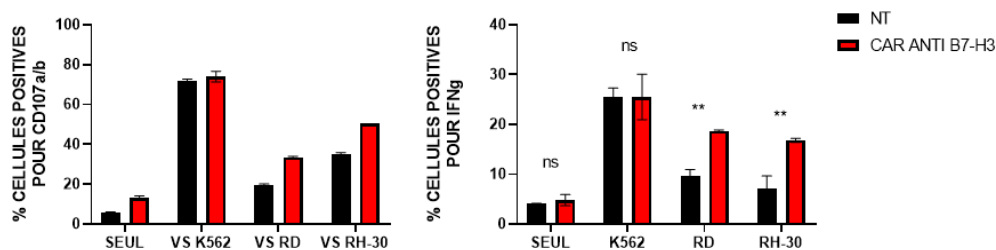


Figure 13. – Évaluation de la cytotoxicité des NK non-transduit et CAR anti-B7-H3 via la production de granules cytotoxiques et IFN- γ .

Pour mesurer la dégranulation des cellules NK, des anticorps anti-CD107a et anti-CD107b ont été utilisés. Des anti-IFN- γ ont été utilisés pour mesurer la production d'IFN- γ par les NK. À gauche, la production de granules cytotoxiques par les NK non-transduites (NT) en noir et les NK transduites pour exprimer le récepteur antigénique chimérique (CAR), CAR ANTI-B7-H3 (en rouge). N=1, tests statistiques non-applicables. À droite, la production d'IFN- γ par les NK NT et les CAR-NK. Sur l'axe des ordonnées, le niveau de cellules positives pour les différents anticorps reconnaissant CD107a/b ou IFN- γ . Sur l'axe des abscisses, les différentes conditions auxquelles ont été soumises les NK. Dans la première condition, les NK étaient seules dans le milieu afin de mesurer le niveau basal de dégranulation et production d'IFN- γ . À droite, pour les trois donneurs, les CAR-NK produisaient significativement plus d'IFN- γ que les NK NT contre les deux lignées RMS. En ce qui concerne les contrôles positifs et négatifs, les CAR-NK et NK NT étaient similaires. Test statistique : test t pour échantillons appariés. Alpha = 0.05. Si p est supérieur à 0.05 le test est non significatif (ns), si p est inférieur à 0.05 c'est significatif (*). Un astérisque est ajouté pour chaque N après la virgule Les valeurs de p pour les ratios 1 :2, 1 :4, 1 :8 et 1 :16 sont 0.0035, 0.0061, 0.0248 et 0.1113 respectivement. Les valeurs de p pour les ratios 1 :2, 1 :4, 1 :8 et 1 :16 sont 0.0035, 0.0061, 0.0248 et 0.1113 respectivement.

Comme les NK utilisés sont des NKAES, elles étaient activées pendant 7 jours. Donc le niveau de dégranulation et de IFN- γ n'était pas nul au jour 7 post expansion. De plus, ce niveau de dégranulation et de IFN- γ était similaires entre les NK non-transduites (NT) et les CAR (**Figure 13 graphique de gauche et de droite**). La deuxième condition était le contrôle positif : les NK étaient en contact avec K562, une lignée n'exprimant pas HLA (137), causant ainsi une importante activation des NK. Dans les deux autres conditions, les NK étaient mises en contact avec RD ou RH-30. À droite (**Figure 13**), pour les deux donneurs utilisés, la production de granules cytotoxique était plus élevée dans les CAR-NK (rouge) que dans les NK non transduites (noir). Il y avait aussi une différence entre les deux lignées. Les NK (transduites ou non-transduites) produisaient plus de granules cytotoxiques lorsqu'elles rencontraient RH-30 que lorsqu'elles rencontraient RD.

3.4 Évaluation de l'efficacité des CAR-NK anti-B7-H3 contre les sphéroïdes de RMS

Bien que contre RH-30 les CAR-NK ont été plus performantes que les NK non transduites, l'essai de cytotoxicité sur des lignées en deux dimensions n'est pas très représentatif de la complexité et l'hétérogénéité des tumeurs solides. Afin de s'approcher des conditions physiologiques d'une tumeur solide, le modèle en trois dimensions a été utilisé. Comme la lignée RH-30 était moins tuée par les NK NT que la lignée RD et qu'on pouvait voir une différence entre NK non transduites et CAR-NK, des sphéroïdes ont été formées à partir des cellules RH-30 et cultivés pendant 7 jours.

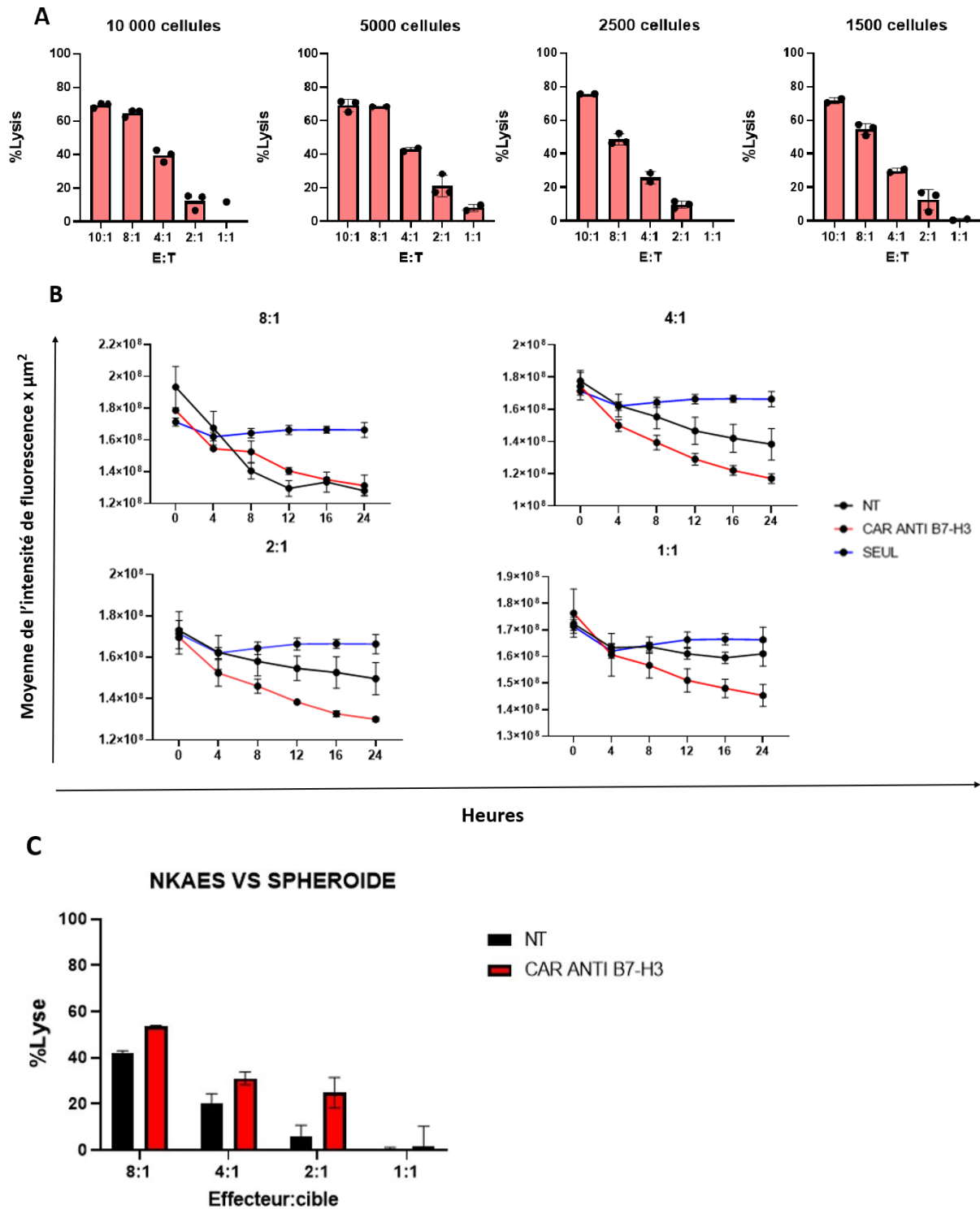


Figure 14. – Évaluation de la cytotoxicité des NK NT et CAR anti-B7-H3 contre des sphéroïdes

Les sphéroïdes ont été cultivés pendant 7 jours avant d'effectuer l'essai de cytotoxicité. La mesure de la cytotoxicité a été effectuée 24 heures après le début de l'expérience. **(A)** Pour déterminer la densité optimale à utiliser, plusieurs essais de cytotoxicité ont été effectués avec des NK non-transduites contre des sphéroïdes de différentes densités cellulaires. **(B)** L'évaluation de la

cytotoxicité des CAR-NK et des NK non-transduites (NT) en microscopie à fluorescence (Incucyte). Chaque graphique représente un ratio. Dans l'axe des ordonnées la fluorescence et l'aire du sphéroïde ont été mesurés. Dans l'axe des abscisses le temps en heures a été mesuré. **(C)** Le même essai de cytotoxicité mesurée à 24 heures en cytométrie en flux. N=1 pour l'ensemble de la figure, tests statistiques non-applicables.

Comme les sphéroïdes se rapprochent un peu plus des conditions physiologiques que les lignées cultivées en deux dimensions, nous avons dû ajuster les ratios utilisés afin de pouvoir observer une cytotoxicité des NKAES. Pour toutes les densités utilisées, le ratio 10:1 donnait une cytotoxicité de 80%, ce qui était très élevé et nous empêchait d'observer la différence entre les NK NT et les CAR-NK (**Figure 14a**). Donc ce ratio a été écarté. Les sphéroïdes formés à partir de 10 000 et 5 000 cellules présentaient une cytotoxicité élevée au ratio 8:1 contrairement aux sphéroïdes formés à partir de 2 500 et 1 500 cellules pour le même ratio. Donc nous avons décidé d'utiliser des sphéroïdes de densité de 2 500 cellules, car ils nous permettraient d'observer la différence d'efficacité entre les NK NT et les CAR-NK et ils avaient aussi un diamètre suffisant pour permettre le développement d'un milieu hypoxique(138).

Lorsque nous avons observé l'efficacité des CAR-NK contre les sphéroïdes à l'Incucyte, au plus grand ratio (8 :1), il n'y avait pas de différence entre les CAR-NK et les NK non-transduites. Cependant, pour les autres ratios (4 :1, 2 :1 et 1 :1), les CAR-NK étaient plus cytotoxiques que les NK non-transduites. Lorsque nous avons mesuré la cytotoxicité en cytométrie en flux, les CAR-NK étaient plus efficaces que les NK non-transduites pour les ratios 8 :1, 4 :1 et 2 :1. Pour le plus petit ratio, la lyse n'était pas observable. Donc globalement, les CAR-NK étaient plus efficaces et l'utilisation des deux techniques nous permet d'observer l'efficacité des NK sous différents angles. L'Incucyte mesure la fluorescence et la taille du sphéroïde et le cytomètre quantifie le nombre de cellules vivantes par sphéroïde une fois que celui-ci a été digéré.

3.5 L'évolution de l'expression du CAR anti-B7-H3 à la surface des cellules NK

Les cellules NK transduites avec la construction CAR anti-B7-H3 ont été triées afin d'obtenir une proportion élevée de cellules CAR⁺. Cependant, nous avons observé qu'au fur et à mesure des semaines, l'expression du CAR par les NK triés diminuait (**Figure 15**). La régulation à la baisse des CAR à la surface des cellules est fréquente chez les équipes travaillant avec ces récepteurs. Une des raisons de la régulation à la baisse des CAR est l'activation en absence de cible(139) . Pour

évaluer l'activation spontanée des NK, il est possible de détecter les protéines kinases qui se retrouvent activées à la suite de la stimulation par le CAR. La partie transmembranaire et intracellulaire du CAR est composée par des domaines KIRS2. Lors de l'engagement du CAR, le domaine intracellulaire KIRS2 interagit avec DAP12 donnant lieu à la phosphorylation de Syk. La construction CAR contient aussi un gène codant pour DAP12, une régulation à la baisse du CAR impliquerait aussi une régulation à la baisse de DAP12. Une des hypothèses possibles est que l'activation du CAR en absence de la cible pouvait avoir lieu lors de la semaine d'expansion, car les NK se trouvaient en présence d'importantes quantités de cellules K562 et d'IL-2. Nous avons donc mesuré l'expression de DAP12 et Syk phosphorylé pendant les 7 jours d'expansion (Figure 16).

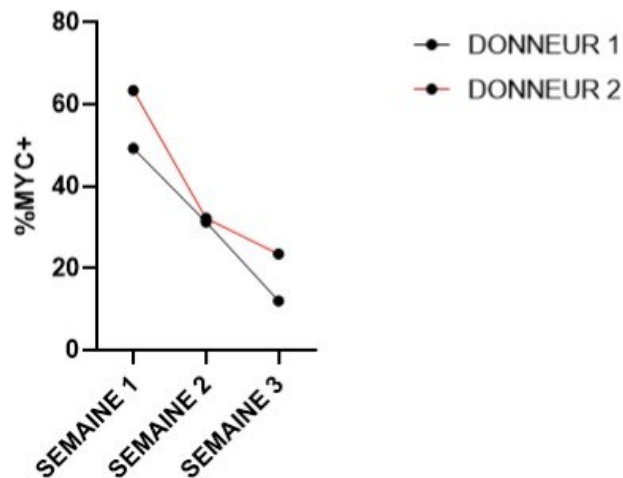


Figure 15. – Évolution de l'expression du CAR anti-B7-H3 à la surface des cellules NK transduites et triées.

Les NK provenant de deux donneurs ont été transduites avec le récepteur antigénique chimérique (CAR) anti-B7-H3 et triées. Elles ont par la suite été expansées pendant 3 semaines. L'expression du CAR à la surface cellulaire a été évaluée à l'aide d'anti-Myc-tag en cytométrie en flux. Chaque observation a été effectuée au jour 7 de la semaine d'expansion.

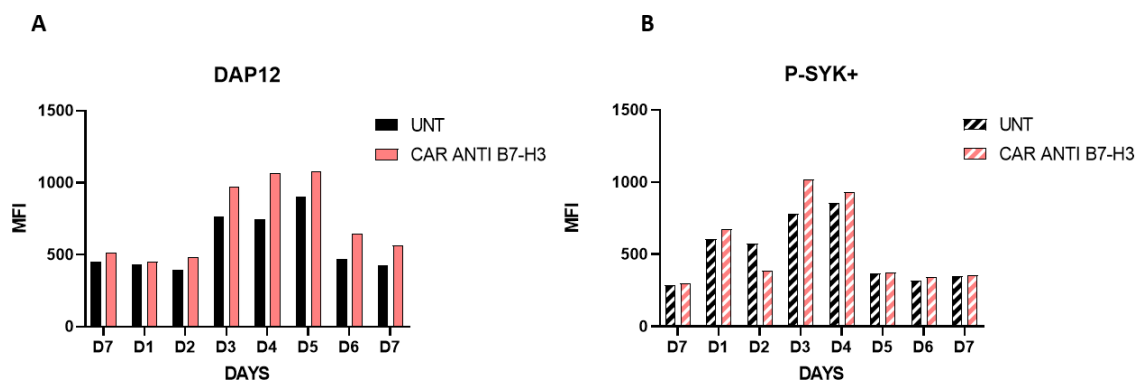


Figure 16. – Évaluation de l’activation des CAR-NK lors de la semaine d’expansion.

Les deux panneaux montrent l’intensité d’expression (MFI) de DAP12 et de Syk phosphorylé (P-Syk) en fonction des 7 jours d’expansion. **(A)** L’expression de DAP12 par les NK non-transduites (NT), en noir, et les CAR-NK (en rouge) au cours de la semaine d’expansion. **(B)** Les cellules ont été fixées et perméabilisées suivant le protocole de phosphoflow et marquées avec anti-phospho-Syk. N=1 pour l’ensemble de la figure, tests statistiques non-applicables.

L’expression de DAP12 et p-Syk semblait stable est similaire entre NK NT et CAR-NK pendant les deux premiers jours d’expansion. Au jour 3, l’expression de DAP12 et de SYK a augmenté pour les deux conditions. L’augmentation était plus importante dans les CAR-NK. Cette augmentation s’est maintenue pour DAP12 au jour 5 mais a diminuée pour p-Syk. Aux jours 6 et 7 l’expression de DAP12 et p-Syk était similaire à l’expression observée pendant les deux premiers jours de l’expansion.

3.6 Génération de NK-KLRC1 K.O et l’évaluation de leur efficacité

Un des mécanismes d’échappement immunitaire retrouvé dans les tumeurs solides est l’expression d’HLA-E par les cellules tumorales. Les cellules du RMS expriment HLA-E (**Figure 17A**). Les cellules NK peuvent reconnaître HLA-E via leur récepteur NKG2A, causant un signal inhibiteur et empêchant l’activation cellulaire. Afin de surpasser cette inhibition, les NK ont été transduites avec un vecteur lentiviral contenant une construction codant pour un ARN guide reconnaissant KLRC1 (le gène codant pour NKG2A), la protéine Cas9 et un gène codant pour la résistance à la puromycine. Les cellules transduites ont été traitées à la puromycine afin de sélectionner seulement les NK KLRC1 KO. Une semaine post sélection, les NK ont été marquées pour évaluer l’expression d’NKG2A (**Figure 17B**).

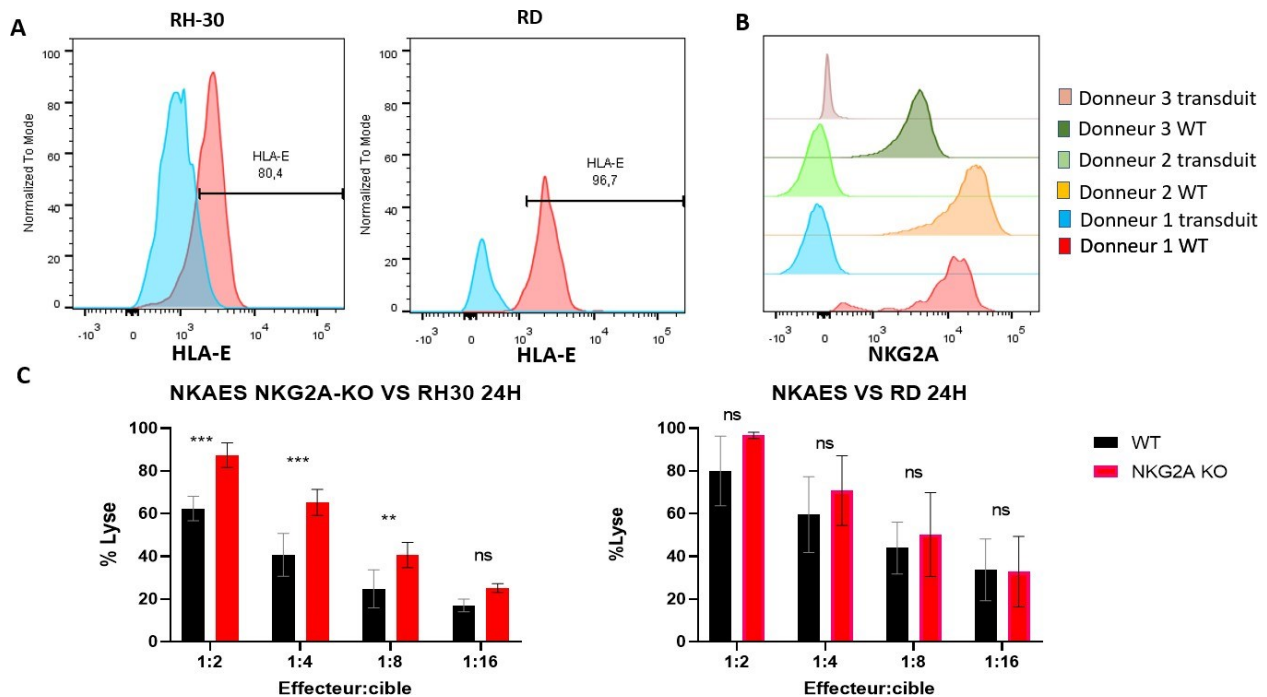


Figure 17. – Évaluation de l’efficacité des NK KLRC1 K.O contre les cellules RMS.

(A) L’expression d’HLA-E par les lignées de rhabdomyosarcome RH-30 (à gauche) et RD (à droite). En bleu, le contrôle isotypique pour chaque lignée. En rouge, les cellules marquées avec anti-HLA-E. **(B)** L’expression de NKG2A avant et après transduction pour trois donneurs différents. Les cellules NK avant la transduction pour chaque donneur sont considérées de type sauvage (WT). **(C)** Les trois donneurs ont été utilisés pour évaluer leur cytotoxicité contre RH-30 (à gauche) et RD (à droite) pendant un essai de cytotoxicité de 24 heures. Test statistique : test t pour échantillons appariés. Alpha = 0.05. Si alpha > à 0.05 c’est non significatif (ns), si c’est inférieur à 0.05 (*) et un astérisque est ajouté pour chaque N après la virgule.

Plus de 90% des cellules NK primaires non transduites exprimaient NKG2A à leur surface (**Figure 16b**). À la suite de la transduction, l’expression d’NKG2A était de moins de 2 %, pour tous les donneurs. Les cellules NK KLRC1 K.O étaient significativement plus cytotoxiques que les NK WT contre RH-30 ($p = 0.000212$, 0.000252 et 0.007995 pour les ratios 1 :2, 1 :4 et 1 :8 respectivement). Pour le ratio 1 :16, la différence de cytotoxicité entre les NK WT et NK KLRC1 K.O n’était pas significative ($p = 0,142458$). Pour la lignée RD la différence n’était pas significative ($p = 0.263817$, 0.396386 , 0.633260 et 0.947186 pour les ratios 1 :2, 1 :4, 1 :8 et 1 :16 respectivement).

3.7 Génération de NK doublement modifiée : KLRC1 K.O et CAR anti B7-H3

Notre hypothèse de départ était que l'expression du CAR allait améliorer l'efficacité des NK contre les cellules du RMS. Nous avons par la suite postulé que l'élimination de l'expression de NKG2A allait aussi améliorer l'efficacité des NK contre les cellules du RMS. Ces hypothèses ont été soutenues par les résultats préliminaires obtenus où une augmentation de l'efficacité contre RH-30 a été observée. Notre troisième hypothèse était que l'expression du CAR combinée avec le manque d'expression de NKG2A donnerait un effet synergique contre RH-30 et une efficacité plus élevée qu'avec le CAR seul ou le KO seul serait observé.

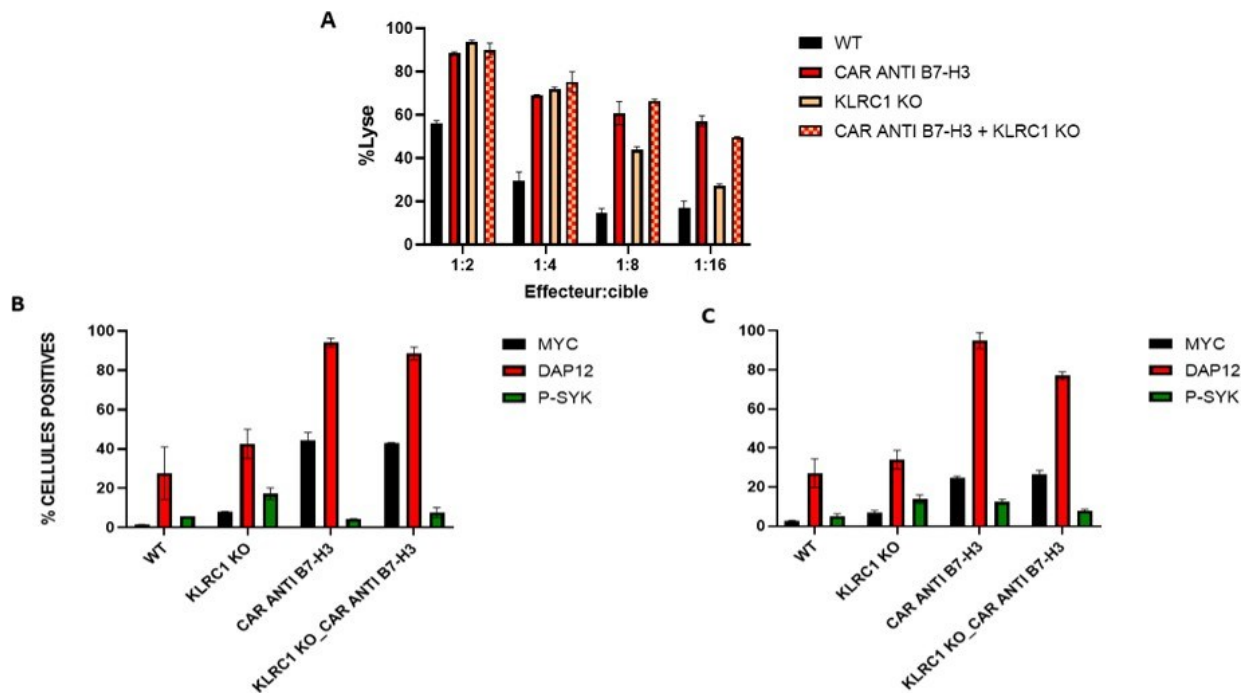


Figure 18. – Évaluation de l'efficacité des NK KLRC1 K.O contre les cellules RMS.

Les cellules NK KLRC1 K.O ont été transduites pour exprimer le CAR anti-B7-H3. **(A)** Un essai de cytotoxicité a été effectué avec les NK de type sauvage (WT) en noir, les NK exprimant le CAR anti-B7-H3(rouge), les NK KLRC1 K.O (jaune) et les NK doublement modifiées (jaune avec des points rouges) contre RH-30 pendant 24 heures. **(B)** Même donneur et mêmes conditions que pour l'essai de cytotoxicité. Un marquage de DAP12, P-Syk et Myc-tag (Myc) a été effectué pour évaluer leur expression lorsque les cellules sont en absence de cibles. **(C)** Même marquage, 4 heures après que les NK ont été mises en contact avec les cellules RH-30. N=1 pour l'ensemble de la figure, tests statistiques non-applicables.

Suite à l'essai de cytotoxicité des NK modifiés contre la lignée RH-30, la différence entre les NK CAR, KLRC1 K.O et les NK doublement modifiés n'était pas observable (**Figure 18a**). Cependant,

pour les plus faibles ratios 1:8 et 1:16, les CAR-NK étaient plus efficaces que les NK KLRC1 K.O mais la double modification ne donnait pas d'effet synergique ou additif. Les NK KLRC1 K.O CAR anti-B7-H3 étaient aussi efficaces que les CAR-NK. Lorsque nous avons observé l'activation de ces cellules (**Figure 18a et b**), nous avons remarqué que les NK KLRC1 K.O en absence de cible (**Figure 18a**) exprimaient plus de DAP12 et de P-Syk que les NK WT. Les CAR-NK quant à elles avaient une expression similaire de P-Syk que les NK WT en dépit de la surexpression de DAP12. Nous avons aussi remarqué que la double modification diminuait l'expression de P-Syk par rapport au NK KLRC1 K.O. Lorsque les NK ont été mises en contact avec les cellules RH-30 (**Figure 18b**), les NK exprimant le CAR (que ce soit des CAR-NK ou des NK KLRC1 K.O CAR) ont eu une diminution de l'expression de Myc d'environ 20% ce qui suggère que le CAR a été internalisé à la suite de la reconnaissance de la cible. Cependant, l'expression de P-Syk pour l'ensemble des conditions n'a pas changé.

Une autre façon d'évaluer le potentiel effet synergique que pourraient avoir les NK doublement modifiées est en s'approchant des conditions physiologiques d'une tumeur solide. Ainsi, nous avons effectué un essai de cytotoxicité contre des sphéroïdes formés à partir de cellules RH-30 (**Figure 19**). Les sphéroïdes d'une densité de 2 500 cellules ont été cultivés pendant 7 jours avant d'effectuer l'essai de cytotoxicité. Pour les ratios 2:1 et 1:1 nous avons observé un effet additif pour les NK KLRC1 K.O CAR comparativement aux CAR-NK et aux NK KLRC1 K.O (**Figure 19a**), ce qui confirmait notre hypothèse de départ.

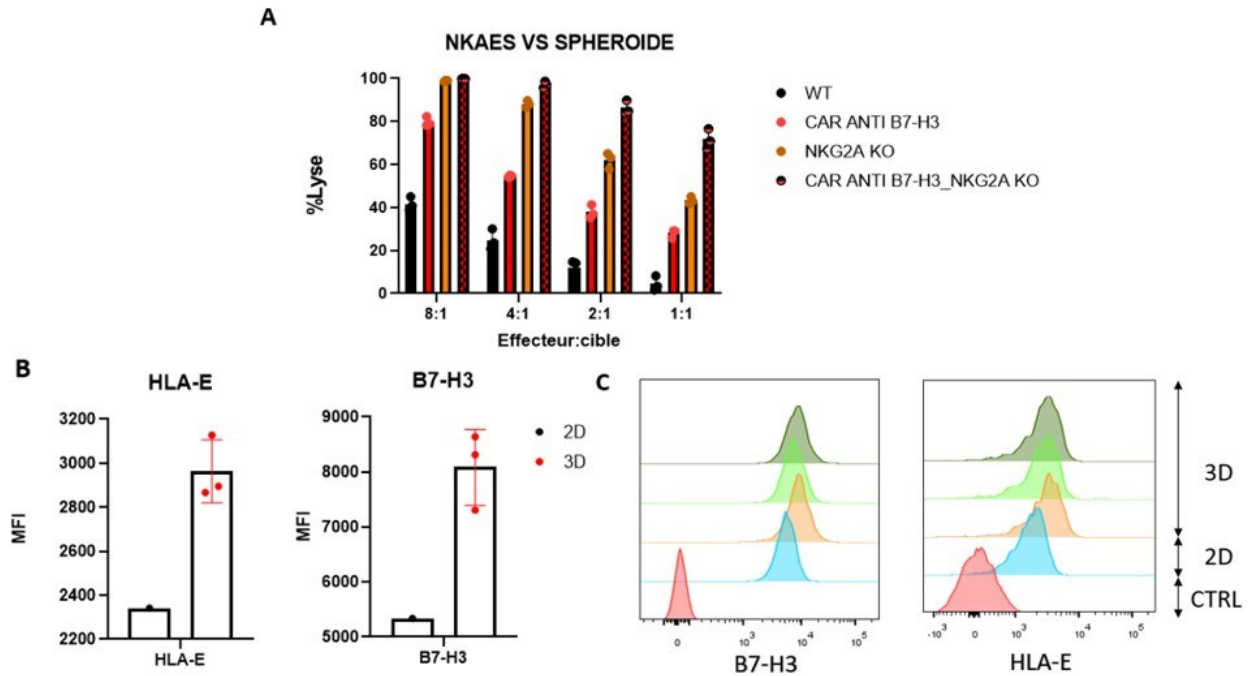


Figure 19. – Évaluation de l’efficacité des NK KLRC1 K.O et CAR anti-B7-H3 contre les sphéroïdes formés à partir de cellules RH-30.

(A) Après un essai de cytotoxicité de 24heures, le milieu a été aspiré et 100 µl de trypsine 0.25% a été ajouté pour défaire le sphéroïde et marquées. Le pourcentage de lyse est évalué par cytométrie en flux à partir des cellules vivantes GFP⁺. (B) L’expression de HLA-E (à gauche) et de B7-H3 (à droite) en MFI par les cellules RH-30 cultivés pendant 7 jours sous forme de sphéroïdes (3D) et les cellules RH-30 cultivées en deux dimensions dans une flasque (2D). (C) Les mêmes conditions que dans (B) représentées sous forme d’histogramme afin d’observer l’intensité d’expression entre les RH-30 en 2 dimensions (bleu) et les sphéroïdes (orange, vert clair et vert foncé). En rouge le contrôle isotypique (CTRL). N=1 pour l’ensemble de la figure, tests statistiques non-applicables.

L’expression des marqueurs visés B7-H3 et HLA-E était différente dans les sphéroïdes par rapport aux mêmes cellules cultivées en deux dimensions (Figure 19b et c). En effet, dans les sphéroïdes il y a eu une augmentation de l’expression de HLA-E et de B7-H3. Ce qui pourrait expliquer pourquoi nous avons été capables d’observer un effet plus important de la double modification dans les sphéroïdes et pas lors de l’essai de cytotoxicité avec des RH-30 cultivées en deux dimensions (Figure 19a).

4 Discussion

Le cancer solide, comparativement aux cancers « liquides » (ou hématologiques) représentent un défi pour l'immunothérapie. Comme mentionné précédemment, le rhabdomyosarcome est un cancer solide pédiatrique dont le taux de survie chez les patients à haut risque est très faible (65) avec les traitements conventionnels tels que la chimiothérapie et radiothérapie. Donc il est urgent de trouver de nouveaux traitements efficaces contre ce cancer. Les cellules NK, avec leur capacité intrinsèque à pouvoir faire de l'immunosurveillance et éliminer les cellules cancéreuses, représentent un candidat intéressant contre le cancer solide. Notre but est de pouvoir apporter une thérapie cellulaire à base de cellules NK, capable d'éliminer efficacement le rhabdomyosarcome. Pour cela nous avons tout d'abord postulé que les cellules NK exprimant un CAR à la surface ciblant les cellules du RMS seraient plus efficaces que les NK non-modifiées. Notre deuxième hypothèse était que l'élimination du NKG2A, à la surface des cellules NK réduirait l'inhibition causée par les cellules du RMS, permettant ainsi une meilleure efficacité de ces cellules NK. Finalement, nous avons postulé que l'expression d'un CAR combiné à l'inactivation de NKG2A sur les cellules NK produirait un effet synergique ou additif par rapport à la cytotoxicité des NK contre les cellules du RMS comparativement à l'expression du CAR seul ou le manque de NKG2A seul.

4.1 Obtention, expansion et transduction des NK primaires

Les cellules NK ($CD3^- CD56^+$) peuvent être obtenues de différentes sources, à partir de cellules pluripotentes induites (iPSCs), lignées cellulaires, sang de cordon et PBMCs(81). Il est possible d'obtenir des NK dérivés d'iPSCs et de sang de cordon, cependant le processus est long et exige plusieurs vérifications du phénotype et de l'efficacité des clones obtenus(140). Les lignées de NK tels que les NK92 n'expriment pas les mêmes récepteurs à leur surface que les NK primaires(81), ce qui pourrait affecter leur comportement (141). Donc, pour évaluer l'efficacité des modifications des cellules NK proposées, l'obtention des NK primaires à partir de PBMCs, semblait être la meilleure option.

Après avoir obtenu les PBMCs du sang périphérique, nous les avons cultivées avec des K562 exprimant l'IL21 à leur surface. Comme les K562 n'expriment pas de CMH de type I à leur surface, lorsque les NK les rencontrent elles s'activent et prolifèrent (137). La présence des cytokines IL-21 et IL-2 contribuent à l'expansion et au maintien des NK. Ceci nous a permis d'enrichir les PBMCs en cellules NK. En effet, après une semaine d'expansion, les cellules CD3⁺ ne représentaient que 27,3% des PBMCs, alors que 61% des cellules étaient CD3⁻ CD56⁺ (**Figure 7e**). Après la déplétion de cellules CD3⁺, seulement 0,5% de lymphocytes T étaient présents (**Figure 7f**). Lors des études cliniques impliquant la transplantation allogénique de cellules NK, un seuil maximum de 1% de lymphocytes T dans le produit a été déterminé pour prévenir la GvHD(142). Donc, avec la purification effectuée, nous étions en dessous du seuil maximum.

La première nécessité du projet était d'obtenir des NK exprimant les CAR d'intérêt (anti-B7-H3 et anti-FGFR4) afin d'évaluer leur efficacité. Lorsque des lymphocytes T sont utilisés pour évaluer l'efficacité des constructions CAR, il est possible de les transduire avec des vecteurs lentiviraux ayant une enveloppe VSV-G. Cependant les cellules NK sont résistantes à la transduction avec ce lentivirus (109). En effet, les vecteurs lentiviraux à enveloppe de VSV-G, reconnaissent les récepteurs de lipoprotéines de basse densité (LDL-R). Après l'activation des cellules T, l'expression de ce récepteur augmente, 97% des cellules l'expriment, permettant la transduction efficace de celles-ci avec le vecteur viral à enveloppe de VSV-G(143). Lorsque les cellules NK sont activées, l'expression de LDL-R n'est pas augmentée (143), donnant ainsi des taux de transduction proches de 3%. Afin de transduire efficacement les NK, un lentivirus avec enveloppe pseudotypée de Babouin (BaEV) a été utilisé. Cette enveloppe a comme récepteur les transporteurs d'acide aminés sodium dépendant 1 et 2 (ASCT1 et ASCT2)(109). Lorsque les cellules NK sont activées, l'expression d'ASCT1 et ASCT2 augmentent, permettant ainsi d'obtenir des efficacités de transduction de 80% lorsque le lentivirus à enveloppe de Babouin est utilisé(109).

Les cellules NK ont été transduites avec un vecteur lentiviral avec enveloppe pseudotypée de Babouin contenant la construction CAR. Le taux de transduction était variable selon les donneurs: de 15 à 60% de transduction. Ceci était probablement dû à la variabilité dans l'expression de ASCT1 et ASCT2 chez les différents donneurs. D'autres facteurs peuvent expliquer les différences dans les taux de transduction tels que la qualité de la production virale, la densité cellulaire lors

de la transduction, la présence de débris dus à l'expansion avec des cellules nourricières irradiées, entre autres

4.2 Évaluation de l'expression de la construction CAR anti-FGFR4.

Les composantes du CAR anti-FGFR4 étaient un scFv anti-FGFR4, un Myc-tag (ajouté à la construction pour faciliter la détection du CAR), un espaceur CH2CH3 et une partie transmembranaire et intracytoplasmique KIRS2. Lorsque les NK ont été transduites avec le vecteur lentiviral contenant la construction CAR anti-FGFR4, aucun signal Myc⁺ n'a été observé. La première hypothèse était que le séparateur CH2CH3 présent dans cette construction empêchait l'anti-Myc d'accéder au Myc-tag en raison d'un encombrement stérique. En effet, la partie extracellulaire de cette construction était différente de celle du CAR anti-B7-H3 observée avec le marquage anti-Myc. Dépendamment de la cible et de sa conformation, il est parfois nécessaire d'ajouter un espaceur afin que le scFv puisse atteindre et se lier de façon stable à sa cible(144). La construction CAR anti-FGFR4 utilisée a été testée dans des lymphocytes T. Deux versions de la construction ont été testées: la courte et la longue. Concernant la version courte, le CAR était composé des domaines CD3z, 4-1BB, du domaine transmembranaire CD8a, du séparateur CD8a et du scFv anti-FGFR4. La version longue avait un séparateur CH2CH3 au lieu d'un séparateur provenant du domaine CD8a. La construction longue présentait une meilleure cytotoxicité que la version courte(145). La construction que nous avons utilisée pour y insérer le scFv anti-FGFR4 était adaptée aux NK. Elle comportait un gène codant pour DAP12 et des domaines intracellulaires, transmembranaires et extracellulaires KIRS2 suivi du scFv. Dans la construction utilisée, nous avons déjà un séparateur provenant du domaine KIRS2. L'ajout d'un domaine CH2CH3 en plus du séparateur pourrait probablement causer des problèmes de conformation empêchant l'expression du CAR ou un encombrement stérique qui empêche la détection via le Myc. L'hypothèse du Myc-tag inaccessible n'a pas pu être confirmée, car comme les NK expriment différents récepteurs de FGFR4, la détection du CAR via l'utilisation d'une protéine chimérique FGFR4 conjuguée à un domaine Fc n'était pas concluante (**Figure 10a**). Cependant, lorsque nous avons effectué une PCR, nous avons observé que les cellules NK étaient transduites (**Figure 10c**). Ce qui nous dirige vers un problème d'expression de la construction CAR ou de conformation du CAR probablement causée par le CH2CH3.

Un autre problème possible qui aurait pu survenir à cause du séparateur CH₂CH₃, est l'inefficacité *in vivo*. En effet, le domaine CH₂CH₃ utilisé, provient de l'IgG1 et peut être reconnu par les cellules exprimant des récepteurs de Fcγ (FcγR). Ceci peut causer une expansion non spécifique des cellules CAR⁺ aux endroits où se trouvent les cellules exprimant (FcγR)(146). Pour éviter la reconnaissance de CH₂CH₃ par FcγR, il est possible de muter les acides aminés ELLG (aa233-236) et N (aa297) dans la région CH₂ par PVA et Q respectivement(146). La construction CAR anti-FGFR4 avait un CH₂CH₃ non muté, ce qui pourrait causer aussi un problème *in vivo*. Compte tenu de toutes ces informations, nous avons décidé de retirer le CH₂CH₃ et de seulement garder l'espaceur du KIRS2.

Afin de pouvoir déterminer facilement si le problème est la transcription ou l'expression à la surface (encombrement stérique, repliement, etc.), nous avons aussi ajouté une séquence codante pour ECFP, une protéine fluorescente qui ne dépend pas de la présence du CAR à la surface cellulaire. De plus, nous avons changé le promoteur SFFV par un promoteur EFS. Bien qu'il n'y ait pas d'études comparatives des différents promoteurs dans des NK primaires. Dans les lignées NK, le promoteur EFS a permis une expression stable de la GFP pendant 17 jours, alors que le promoteur SFFV donne un taux d'expression moins élevé et est susceptible d'être « silencé » (147)(78).

Suite à la modification de la construction CAR, nous avons effectivement pu observer l'expression du CAR à la surface des HEK293T et des NK avec un signal Myc et ECFP (**Figure 11a et b**). Cependant, nous avons observé que le signal ECFP n'était que de 5,57% alors que celui du Myc-tag était de 11,6%. Ce qui pourrait suggérer une diminution dans la transcription ou la traduction de la construction. Une semaine après, les signaux ECFP et Myc-tag n'étaient plus détectables par cytométrie en flux même si nous avons toujours un pourcentage similaire de cellules transduites détectées par ddPCR (**Figure 11c et d**). Il est possible que le problème ne soit pas dû au promoteur, mais bien à la construction CAR. En effet, la construction CAR contient une séquence P2A entre le KIRS2 et ECFP. Entre la fin de la séquence KIRS2 et le début de P2A nous ne retrouvons pas de séquences « linker ». L'ajout de certains acides aminés tels que GSG ou RRKR améliore le clivage de l'élément 2A(148). Il est possible que l'absence de ces acides aminés

causent un problème au niveau de la transcription ou au niveau de la conformation du CAR et diminuent sa stabilité à la surface.

4.3 Évaluation de l'efficacité des CAR-NK anti-B7-H3 contre les lignées RMS

Le rhabdomyosarcome se divise en deux sous catégories basées sur l'expression du gène fusionné PAX3/7 FOXO1. Lors de notre étude, deux lignées RMS ont été utilisées : la lignée RH-30 est fusion-positif(149) et la lignée RD est fusion négative (149). Bien que les deux sous-types de cellules surexpriment la protéine B7-H3, les cellules fusion positive la surexpriment 9,45 fois plus que les cellules saines contre 7,03 fois pour les cellules fusion négative(92). B7-H3, aussi connu comme CD276, est une glycoprotéine qui est rarement exprimée par le tissu sain et faiblement exprimée par les ostéoblastes, les cellules endothéliales, certains fibroblastes, les cellules souches présentes dans le liquide amniotique, etc. Même si le récepteur de cette protéine n'a pas encore été déterminé, trois récepteurs potentiels exprimés par les lymphocytes T ont été identifiés : TLT-2, IL20RA et PLA2R1(150) . Son interaction avec les lymphocytes T est inhibitrice, car lorsque les APC expriment B7-H3, l'activation des cellules T et l'expression de facteurs de transcriptions importants comme NF- κ B sont diminués(151) . En plus, de son rôle immunosuppresseur, B7-H3 a aussi un rôle dans la progression tumorale. L'élimination de cette protéine dans les cellules du cancer du sein a diminué leur capacité migratoires et d'invasion *in vitro*(150). De plus, l'expression de B7-H3 est associé à une expression accrue de métalloprotéinases matricielles(151) qui digèrent les protéines extracellulaires telles que le collagène, protéoglycanes et élastine, favorisant ainsi l'invasion métastatique(152). Tout cela fait en sorte que B7-H3 soit un potentiel candidat à cibler avec les CAR-NK. L'élimination des cellules tumorales permettrait de diminuer la tumeur et la glycoprotéine B7-H3, ce qui pourrait favoriser l'activation des lymphocytes T infiltrés. Nous pouvons aussi imaginer que l'utilisation des CAR-NK pourrait exercer une pression de sélection sur les tumeurs de RMS, permettant le développement de cellules B7-H3 négatives. Ces cellules seront moins immunosuppressives et leur potentiel invasif sera aussi diminué.

Concernant la spécificité des CAR-NK à cibler les cellules du RMS, la protéine B7-H3 est peu ou pas exprimée dans les cellules saines. Nous retrouvons une faible expression dans les cellules saines du foie, du pancréas, de l'estomac, du duodénum de la bile (93). Entre 5 à 20% des cellules

de ces organes sont positives pour l'expression de la protéine B7-H3 comparativement à une expression de 50 à 100% dans certaines cellules cancéreuses (93). En effet, dans les cellules saines, il existe une régulation post transcriptionnel via miARN-29, qui empêche la traduction de l'ARN messager codant pour B7-H3 (93). Dans une étude faite sur 9 tumeurs de rhabdomyosarcome, 6 d'entre elles étaient positives pour l'expression de B7-H3, avec 25 à 50% de cellules positives pour cette protéine(153).

Les CAR-NK anti-B7-H3 qui ont été produites étaient significativement plus cytotoxiques que les NK NT contre RH-30 (**Figure 12a**). Cependant, contre RD, il n'y avait pas de différence d'efficacité (**Figure 12b**). RD étant une lignée provenant de rhabdomyosarcome embryonnaire, elle présente moins de modifications génétiques que RH-30. En effet, RH-30 est une lignée qui provient du rhabdomyosarcome alvéolaire. Celui-ci se caractérise par des translocations chromosomiques comme 2;13 et 1;13 ainsi que la fusion PAX7-FOXO1 qui agit comme un facteur de transcription et augmente la transcription de plusieurs gènes reliés à la survie et à la prolifération tels que FGFR4, IGF2, MET, TFAP2B, etc (89). Tout cela pourrait rendre la lignée RH-30 plus résistante à la lyse, comparativement à la lignée RD où pour certains donneurs, les NK non transduites avaient une efficacité de lyse aussi importante que les CAR-NK aux ratios utilisés (**Figure 12b**).

Un autre moyen de mesurer l'efficacité des CAR-NK comparativement aux NK NT contre les lignées de RMS, consiste à évaluer la production de granules cytotoxiques et d'IFN- γ (**Figure 13**). Les NK avaient un niveau de dégranulation et de production d'IFN- γ qui n'était pas nul dans la condition où elles n'étaient pas mises en contact avec la cible. Ceci peut être dû au fait que même après 7 jours d'expansion, il reste quelques cellules nourricières K562 dans le milieu, ce qui active les NK.

Les contrôles positifs étaient la condition où les NK étaient mises en contact avec les cellules K562. Celles-ci n'expriment pas de CMH de classe I à leur surface, ce qui active les NK. Les cellules K562 expriment très peu B7-H3 et nous pouvons voir que face à ces cellules, les CAR-NK et les NK NT ont une dégranulation et une production d'IFN- γ similaire. Cependant, lorsque les cibles expriment B7-H3, dans la condition où les NK sont mises en contact avec les lignées RD et RH-30, nous avons vu une différence significative dans la production d'IFN- γ et une dégranulation plus

importante. Même si, pour le pourcentage de lyse, la différence entre les CAR-NK et les NK NT n'a pas été observé pour RD, en mesurant l'activation des cellules, nous avons pu observer qu'il y avait effectivement une meilleure performance des CAR-NK contre cette lignée. Ceci nous indique que les CAR-NK reconnaissent la cible, s'activent, produisent (entre autres) de l'IFN- γ et dégranulent plus que les NK NT. Tout cela abouti à une lyse plus élevée de la cible (**Figure 12**).

4.4 Évaluation de l'efficacité des CAR-NK anti-B7-H3 contre les sphéroïdes de RMS

L'utilisation de sphéroïdes nous a permis d'observer l'efficacité des NK modifiés dans des conditions qui s'approchent des conditions physiologiques. Lorsque les cellules RH-30 étaient cultivées en deux dimensions (2D), le ratio NK : cible le plus élevé était de 1:2. À ce ratio, nous observions autour de 70% de lyse pour les NK NT (**Figure 12a**). En revanche, lorsque la cytotoxicité des NK NT a été évaluée contre cette même lignée cultivée en trois dimensions (3D), le ratio le plus élevé était de 10:1 avec le même pourcentage de lyse qu'en 2D (**Figure 14a**). En effet, lorsque les cellules sont cultivées en 3D, il y a une série de changements qui s'opèrent qui rendent les cellules plus résistantes aux traitements. Contrairement aux cultures en 2D, les sphéroïdes sont hétérogènes. Les cellules qui se trouvent à la surface du sphéroïde, prolifèrent, les cellules qui se trouvent dans la deuxième couche du sphéroïde sont sénescents et celles qui se trouvent au centre, sont nécrotiques(153). À l'intérieur du sphéroïde, l'hypoxie fait en sorte que les cellules convertissent le pyruvate en lactate (l'effet Warburg), diminuant ainsi le pH(154). De plus, la structure adoptée permet aux cellules d'être en contact rapproché, ce qui active des voies de signalisation observées dans les tumeurs solides dans des conditions physiologiques(154). Lorsque les cellules NK s'infiltrent dans le sphéroïde, elles rencontrent un microenvironnement pauvre en glucose, acidifié par le lactate et hypoxique(155). Ceci peut affecter les fonctions cytotoxiques des cellules NK. En effet, en présence de lactate, la production de cytokines diminue, notamment l'IFN- γ . Le pH bas peut acidifier le milieu intracellulaire, diminuer la production d'ATP causant l'apoptose(156). L'hypoxie diminue aussi la dégranulation (155). Bien que toutes ces conditions immunosuppressives soient présentes, nous avons pu observer que l'ajout d'un CAR à la surface des NK a permis d'obtenir une lyse des cellules RH-30 10 à 15% plus élevée comparativement aux NK NT (**Figure 14 b et c**). Ce qui est inférieur à l'efficacité observé des CAR-

NK lorsque les cellules RH-30 étaient cultivés en 2D. Donc le degré d'efficacité des CAR-NK comparativement aux NK NT, semble dépendre du mode de culture des cellules RMS. En effet, dans un contexte plus proche du contexte physiologique *in vivo*, le milieu immunosuppresseur diminue l'efficacité des CAR-NK. Il est probable qu'en plus du milieu hypoxique et acidifié, la culture en 3D modifie le transcriptome des cellules RH-30, causant l'expression ou l'augmentation de l'expression de certaines molécules inhibitrices(157).

4.5 L'évolution de l'expression du CAR anti-B7-H3 à la surface des cellules NK

Lorsque les cellules NK sont mises en expansion avec des cellules nourricières K562 exprimant l'IL-21 à leur surface, il y a une activation des cellules NK, un changement dans leur morphologie et dans l'expression génétique(157). Lorsque les cellules NK sont transduites, l'insertion du transgène se fait de façon aléatoire dans les zones du génome non méthylés. Par la suite le transgène est exprimé. L'expression du transgène étudié (CAR) a été observé dans les cellules NK à la suite de la transduction (**Figure 15**). Une semaine après la transduction, l'expression était entre 50 et 60%. Deux semaines après, l'expression a diminué à 15 et 20% respectivement. Il est possible que l'insertion du transgène ait eu lieu dans une zone du génome qui est régulé à la baisse au fur et à mesure des semaines d'expansion. Une autre hypothèse était que l'utilisation de cellules nourricières K562 pourrait causer une suractivation de la cellule NK qui pourrait réguler à la baisse le CAR. Cependant, les cellules K562 utilisées, n'expriment pas la cible du CAR (B7-H3), c'est pour cela que le comportement des NK non transduites et CAR était similaire (**Figure 16**). L'hypothèse suivante était que l'expression du CAR à la surface des cellules, pourrait causer une activation spontanée de la cellule. Cette activation causerait l'internalisation du CAR et sa dégradation et avec le temps, l'expression du CAR serait régulée à la baisse. En effet, dans d'autres cellules exprimant des CAR, il est possible d'observer une régulation à la baisse due à une activation constitutive. Dans les CAR-T, la signalisation spontanée a été reliée à de forts niveaux d'expression du CAR à la surface cellulaire. Ce qui causait une agglomération de ceux-ci et une activation en absence de cible. Une autre cause de la régulation à la baisse était le type de domaines de signalisation présent dans la queue du CAR. Dans les lymphocytes T, l'utilisation d'une queue 28.z augmente la phosphorylation spontanée des motifs ITAM(158). Cependant, lorsque la queue 28.z était remplacée par une queue KIRS2/DAP12, la stabilité du CAR était

augmentée et la toxicité des lymphocytes T était diminué (159). Dans les cellules NK, lorsque les CAR basés sur les queues CD3 ζ ont été comparés aux CAR KIRS2/DAP12, la cytotoxicité ainsi que la stabilité du CAR étaient améliorées (160). Ceci indique que l'activation spontanée est moindre lorsque la queue KIRS2/DAP12 est utilisée. Lorsque le CAR reconnaît sa cible, l'adaptateur DAP12 est phosphorylé. SYK ou ZAP70 sont alors recrutés via leur domaine SH2 et permettent de continuer la cascade d'activation. La phosphorylation des résidus (Tyr 525/526) de Syk indique l'activation de celui-ci(161). En effet, lorsque nous avons évalué l'activation des CAR-NK via la phosphorylation de Syk (**Figure 16**), nous avons observé que lorsque la cible est absente, la différence dans l'expression de phospho-Syk est similaire dans les CAR-NK et dans les NK NT sauf à jour 3. En ce qui concerne l'expression de DAP12, il y a une augmentation d'expression aux jours 3,4 et 5. Nous pourrions spéculer que cette différence à ces jours-là est suffisante pour causer une régulation à la baisse du CAR au fur et à mesure des semaines d'expansion. L'utilisation d'un ratio inférieur à 10:1 cellules nourricières : NK pourrait probablement améliorer la persistance du CAR. La modification du promoteur utilisé pourrait aussi aider. En effet, le promoteur utilisé est SFFV, un promoteur d'origine viral, fort et prone à être silencier(162). L'utilisation d'un promoteur moins fort pourrait améliorer la persistance du CAR.

4.6 Génération de NK-KLRC1 K.O et l'évaluation de leur efficacité

Les récepteurs NKG2 sont une série de récepteurs qui sont exprimés à la surface des cellules NK. Ils forment un hétérodimère avec CD94. CD94 n'a pas de domaine cytoplasmique, donc il n'a aucune fonction de signalisation. Cependant, sans CD94, les récepteurs NKG2 ne peuvent pas être exprimés à la surface(163). Cette famille de récepteurs contient des récepteurs activateurs et inhibiteurs. Le gène KLRC1 code pour la glycoprotéine inhibitrice NKG2A. Celle-ci contient une queue cytoplasmique avec deux motifs d'inhibition basés sur la tyrosine (ITIM)(163) et reconnaît HLA-E, une molécule non classique HLA de classe I. Lorsque NKG2A reconnaît HLA-E, les deux ITIMS sont nécessaires pour recruter SHP-1 et SHP-2 phosphatases afin de transmettre un signal d'inhibition(164). Les cellules de rhabdomyosarcome expriment HLA-E, ce qui favorise un milieu immunosuppresseur (**Figure 17a**)(165). Une des stratégies pour améliorer l'efficacité des NK contre les tumeurs exprimant HLA-E, est d'éliminer l'expression du NKG2A. Lorsque NKG2A n'est plus exprimé, comme dans le cas du K.O KLRC1 (**Figure 17b**), CD94 n'est plus disponible pour les

autres glycoprotéines NKG2. Une de ces protéines est NKG2C, une glycoprotéine capable de reconnaître HLA-E. Contrairement à NKG2A, NKG2C a une plus faible affinité pour HLA-E(166). De plus, NKG2C n'a pas de domaines ITIMS ou ITAMS dans sa partie cytoplasmique. Pour transmettre un signal, NKG2C se lie à l'adaptateur DAP12 qui contient deux ITAM et transmet un signal activateur(95). Nous pourrions spéculer que les cellules NK KLRC1 K.O régulent à la hausse l'expression de NKG2C à leur surface. Cette régulation à la hausse pourrait avoir deux effets : d'un côté, l'augmentation de la densité de NKG2C à la surface pourrait causer une activation de ces cellules en absence d'HLA-E, et de l'autre, une meilleure cytotoxicité due à l'absence de NKG2A et à la présence accrue d'NKG2C. En effet, l'efficacité des NK KLRC1 K.O était significativement supérieure à celle des NK WT, lorsqu'elles étaient mises en contact avec RH-30 (**Figure 17c**). Les donneurs KLRC1 K.O utilisés avaient tous une expression d'NKG2A inférieur à 2%. Il est possible que NKG2A ne soit plus produit par KLRC1, car à la suite de l'action du CRISPR, il est possible de causer des mutations telles que celles qui empêchent la transcription du gène : codon d'arrêt au milieu du gène, frame shift, etc. Il est aussi possible que le gène soit transcrit, mais que la protéine contienne une mutation qui l'empêcherait d'acquérir une conformation adéquate, et donc, n'est pas exprimée à la surface. Afin de s'assurer du K.O obtenu, une PCR pourrait être effectuée pour évaluer à quel endroit le gène a été modifié.

Bien que les NK KLRC1 K.O performaient mieux que les NK WT, l'utilisation d'un lentivirus pour effectuer le K.O du gène, pourrait causer plusieurs problèmes. En effet, le lentivirus contient une construction codant pour le système CRISPR Cas9. Celui-ci sera produit de façon continue dans la cellule. Il est donc possible qu'au fur et à mesure des semaines, d'expansion des coupures non spécifiques soient faites au niveau du génome et affectent l'efficacité des NK. Même si le système CRISPR Cas9 est spécifique, il est possible d'observer des coupures hors site, si un mésappariement entre l'ARNg et l'ADN génomique est de moins de 3 nucléotides(167). Le nombre de sites de clivages non spécifiques peuvent aussi dépendre de la quantité de Cas9 exprimés(168). De plus, si le calcul du titre viral n'est pas assez précis, il est probable que les NK soient transduites à des MOI plus élevés. Même si le titre viral est précis lors de la transduction, il est possible que certaines cellules soient transduites avec plus d'une particule virale. Avec le temps, ces cellules seront sélectionnées et nous obtiendrons une population de cellules NK qui

contient plusieurs copies du transgène par cellule. Ceci pourrait expliquer pourquoi l'expression d'NKG2A est si faible dans les NK transduits. Donc, bien que ces NK soient plus efficaces, il est probable qu'avec le temps, nous ayons des problèmes d'expansions, des changements dans le phénotype, la cancérisation des cellules, etc. Une approche sans intégration du transgène serait plus favorable. L'utilisation de méthodes telles que la nucléofection ou des systèmes capables d'acheminer des protéines au noyau comme les « Nanoblades »(169).

4.7 Génération de NK doublement modifiés : KLRC1 K.O et CAR anti B7-H3

L'expression de HLA-E par les lignées de RMS utilisées pourrait limiter l'efficacité des CAR NK à cause de l'interaction entre NKG2A et HLA-E. Cependant, ce n'est pas ce que nous avons observé lorsque nous avons mis en contact des NK CAR KLRC1 K.O avec RH-30 (**Figure 18a**). En effet, la capacité cytotoxique des CAR-NK était aussi élevée que celle des NK doublement modifiées.

Lorsque nous avons évalué l'activation de ces cellules, les cellules NK KLRC1 K.O présentaient une activation spontanée plus élevée lorsque nous avons observé phospho-Syk (**Figure 18b**). Ceci pourrait être dû à l'augmentation de l'expression de NKG2C tel que discuté précédemment. Lorsque le CAR est exprimé par les cellules NK KLRC1 K.O, l'activité spontanée est diminuée. En effet, le CAR contient une queue KIRS2 qui utilise DAP12 lors de son transport du Golgi au cytoplasme(170) et lorsque la cible est reconnue. Comme NKG2C utilise aussi DAP12, il pourrait y avoir une compétition pour DAP12 entre le CAR et NKG2C, ce qui expliquerait la diminution de l'activation spontanée. Lorsque des cibles sont ajoutées, l'augmentation de phospho-Syk n'est pas observée. Il est probable que ceci soit à cause du moment où l'observation a été effectuée. En effet, lorsque ces protéines sont observées par suite de l'activation, le moment de l'observation se situe entre 3 et 15 minutes. De plus, lors de ces observations, pour activer les cellules des anticorps sont utilisés(171), causant un effet presque instantané. Lorsque nous avons effectué cette expérience, ce sont des cellules RH-30 qui ont été utilisées. Contrairement aux anticorps, les NK doivent avoir le temps de se déposer au fond du puit où les cellules adhérentes se trouvent, de trouver les cellules (car elles ne sont pas confluentes) et de s'activer. Même si à 4 heures après le début de l'essai de cytotoxicité, l'augmentation de phospho-Syk n'a pas été observée. Nous avons observé une régulation à la baisse du Myc-tag. Ce qui indique que le CAR a reconnu sa cible

et a été internalisé. La régulation à la baisse du CAR suite à la reconnaissance de la cible est souvent observée et peut durer pendant plusieurs heures(172). Dans les lymphocytes T, cette régulation s'apparente à celle du TCR suite à son engagement. Si le TCR n'était pas internalisé, la signalisation permanente via celui-ci pourrait faire en sorte que la cellule s'épuise et ne soit plus capable de s'activer lors de la rencontre de la prochaine cible(172).

Comme la régulation à la baisse peut durer pendant plusieurs heures, il est possible qu'à 4 heures le CAR est régulé à la baisse depuis plusieurs minutes ou heures déjà. Ce qui fait en sorte que les NK soient capables de contrôler leur activation afin de ne pas s'épuiser. Ainsi, 4 heures après, la phosphorylation de phospho-Syk ne serait plus observable. L'observation de l'activation à des temps inférieurs, nous permettrait d'observer la phosphorylation des cellules NK.

L'activation des cellules peut aussi dépendre de la densité de l'antigène à la surface des cellules cibles. Les RH-30 utilisés ont été cultivés en 2D. Dans les conditions physiologiques, certains antigènes sont régulés à la hausse. En effet, lorsque nous avons observé les antigènes d'intérêt B7-H3 et HLA-E dans les cellules RH-30 cultivés sous forme de sphéroïdes, nous avons remarqué que l'expression de ces derniers avait augmenté par rapport aux RH-30 en 2D (**Figure 19b et c**). D'ailleurs, les cellules NK CAR KLRC1 K.O montraient un effet additif par rapport aux CAR NK et NK KLRC1 K.O (**Figure 19a**). Contrairement à l'essai de cytotoxicité en deux dimensions, les CAR-NK étaient moins performants que les NK KLRC1 K.O. Ceci concorde avec l'augmentation de l'expression d'HLA-E. Même si les sphéroïdes expriment plus fortement HLA-E, les cellules ayant à leur surface un CAR, sont capables de lyser plus que les cellules NK modifiées. De plus, le CAR pourrait favoriser l'infiltration des NK dans le sphéroïde à cause de l'augmentation dans l'expression de B7-H3. Il est possible que lors d'un essai de cytotoxicité prolongée, les cellules RH-30 régulent à la baisse B7-H3 comme résultat de la pression de sélection effectué. Comme les NK ont une capacité intrinsèque à éliminer les cellules tumorales, les CAR-NK infiltrés pourraient quand même avoir un effet cytotoxique basal sur les cellules RH-30.

Les NK s'activent en fonction des signaux activateurs et inhibiteurs reçus. Si la cellule reçoit plus de signaux activateurs qu'inhibiteurs, elle s'activera, et vice versa(173). Nous pouvons spéculer que le CAR fait basculer la tendance vers l'activation parce qu'il constitue un signal activateur

absent chez les cellules NK NT. Donc bien que le sphéroïde exprime plus de ligands inhibiteurs, l'expression d'un CAR à la surface pourrait être suffisante pour activer les cellules NK. Cependant, cette activation semble limitée, parce que lorsque NKG2A n'est plus exprimé par les NK, la capacité cytotoxique des NK est augmentée. Ce qui nous indique que l'inhibition via HLA-E est importante au niveau du sphéroïde. L'augmentation du NKG2C dans ces cellules pourrait aussi jouer un rôle dans l'augmentation du pourcentage de lyse. C'est pour cela que lorsque les deux modifications étaient présentes, l'effet activateur du CAR combiné à l'absence de l'inhibition d'HLA-E et à la présence d'une plus grande densité de B7-H3, permet d'obtenir un effet additif avec 80% de lyse au ratio le plus bas. Ainsi nous pouvons conclure que plus nous nous approchons des conditions physiologiques du rhabdomyosarcome, plus nous observons les effets du CAR et du K.O KLRC1 combinés. D'autres expériences sont requises pour mieux étudier l'efficacité de cette double modification, telles que l'optimisation du phospho-flow, l'ajout de cellules myéloïdes inhibitrices dans les sphéroïdes, l'évaluation du CAR in vivo, etc.

5 Perspectives

Les résultats issus des expériences effectuées lors de ma maîtrise, permettent d'enrichir les connaissances sur le potentiel des CAR-NK contre le rhabdomyosarcome. À partir de ces résultats il sera possible de continuer le projet. D'autres expériences pourront être faites pour évaluer l'efficacité des CAR-NK anti B7-H3, NK KLRC1 K.O et CAR-NK KLRC1 K.O. D'abord, nous amélioreront les méthodes utilisées pour obtenir les NK KLRC1 K.O. Au lieu de transduire avec une construction contenant des gènes codant pour le complexe CRISPR Cas9 de façon constante, nous effectuerons une électroporation ou en utilisant les petits ARN en épingle à cheveux (sh)(129). Nous avons observé que le comportement des NK modifiés est différent plus nous nous approchons des conditions physiologiques du cancer solide tel que les sphéroïdes. Donc afin d'étudier plus précisément l'efficacité des modifications apportées aux NK, des expériences in vivo seront nécessaires. Les souris utilisées seraient immunosupprimées NOD.Cg-Prkdcscid Il2rgtm1Wjl/SzJ (NSG) (130) et permettront d'observer l'effet des NK modifiés contre le rhabdomyosarcome dans un contexte plus proche à celui de l'utilisation clinique. Aussi, pour

améliorer la persistance des NK in vivo, les NK seraient transduites pour exprimer l'IL-15 (131). Finalement, concernant la régulation à la baisse du CAR, il a été observé dans un contexte d'expansion in vitro durant plusieurs semaines. Lors des expériences in vivo, il sera possible d'évaluer si les CAR-NK se comportent de la même façon.

6 Conclusions

Les résultats obtenus permettent d'observer que dépendamment du mode de culture des lignées tumorales, les CAR-NK anti-B7-H3 étaient 20 à 40% plus efficaces contre la lignée de RMS RH-30 que les NK non transduites. Nous avons aussi observé que l'expression de HLA-E par RH-30 inhibait l'activation des cellules NK, limitant aussi la capacité cytotoxique des CAR-NK. L'absence d'expression de NKG2A par les NK KLRC1 K.O permettait de surmonter cette inhibition. En effet, comparativement aux NK NKG2A⁺, les NK NKG2A⁻ étaient 20% plus cytotoxiques contre les cellules RH-30. L'inhibition par HLA-E était d'autant plus présente lorsque les cellules RH-30 étaient cultivées en sphéroïdes où l'expression d'HLA-E et B7-H3 étaient régulés à la hausse. L'expression du CAR seul était moins efficace que les NK NKG2A⁻ n'exprimant pas le CAR. L'expression du CAR seul ou l'absence de NKG2A seul à la surface des NK ne permettait pas d'obtenir autant de cytotoxicité que la combinaison des deux (CAR-NK anti-B7-H3 KLRC1 K.O). Cependant, les conditions in vitro ne sont pas idéales. En effet, les ratios utilisés sont beaucoup plus élevés que ceux retrouvés dans les conditions physiologiques, l'essai de cytotoxicité ne peut pas être effectué pendant plusieurs semaines, les lignées utilisées ne sont pas identiques à la tumeur primaire, etc. L'utilisation d'un modèle murin souffrant de rhabdomyosarcome dérivé de patient permettrait de reproduire jusqu'à un certain point les difficultés qui accompagnent le traitement d'un cancer solide en clinique. Ces résultats préliminaires nous permettent d'observer le potentiel prometteur des cellules NK modifiées contre un cancer solide comme le rhabdomyosarcome.

7 Références bibliographiques

1. Coffelt SB, de Visser KE. (2015). Immune-mediated mechanisms influencing the efficacy of anticancer therapies. *Trends in Immunology*, (4):198-216.
<https://doi.org/10.1016/j.it.2015.02.006>
2. Dobosz P, Dzieciatkowski T. (2019). The Intriguing History of Cancer Immunotherapy. *Frontiers in Immunology*, (10):2965. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02965>
3. Topalian SL, Drake CG, Pardoll DM. (2015). Immune Checkpoint Blockade: A Common Denominator Approach to Cancer Therapy. *Cancer Cell*, 27(4):450-61.
<https://doi.org/10.1016/j.ccell.2015.03.001>
4. Mazhar S, Taylor SE, Sangodkar J, Narla G. (2019). Targeting PP2A in cancer: Combination therapies. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*, (1):51-63.
<https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2018.08.020>
5. Postow MA, Callahan MK, Wolchok JD (2015). Immune Checkpoint Blockade in Cancer Therapy. *J Clin Oncol*, 33(17):1974-82. DOI: 10.1200/JCO.2014.59.4358
6. Willsmore ZN, Coumbe BGT, Crescioli S, Reci S, Gupta A, Harris RJ, et al (2021). Combined anti-PD-1 and anti-CTLA-4 checkpoint blockade: Treatment of melanoma and immune mechanisms of action. *European Journal of Immunology*, 51(3):544-56.
<https://doi.org/10.1002/eji.202048747>
7. Bertrand A, Kostine M, Barnetche T, Truchetet ME, Schaeffer T (2015). Immune related adverse events associated with anti-CTLA-4 antibodies: systematic review and meta-analysis. *BMC Med*, 13:211. DOI : 10.1186/s12916-015-0455-8
8. Jenkins RW, Barbie DA, Flaherty KT (2018). Mechanisms of resistance to immune checkpoint inhibitors. *Br J Cancer*, 118(1):9-16. DOI: 10.1038/bjc.2017.434

9. Stanifer ML, Pervolaraki K, Boulant S (2019). Differential Regulation of Type I and Type III Interferon Signaling. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(6):1445. DOI: 10.3390/ijms20061445
10. Conlon KC, Miljkovic MD, Waldmann TA (2019). Cytokines in the Treatment of Cancer. *J Interferon Cytokine Res*, 39(1):6-21. DOI: 10.1089/jir.2018.0019
11. Herndon TM, Demko SG, Jiang X, He K, Gootenberg JE, Cohen MH, et al (2012). U.S. Food and Drug Administration Approval: Peginterferon-alfa-2b for the Adjuvant Treatment of Patients with Melanoma. *Oncologist*, 17(10):1323-8. DOI: 10.1634/theoncologist.2012-0123
12. Ali Bazarbachi et al (2010). Meta-Analysis on the Use of Zidovudine and Interferon-Alfa in Adult T-Cell Leukemia/Lymphoma Showing Improved Survival in the Leukemic Subtypes | *Journal of Clinical Oncology*, 20;28(27):4177-83. DOI: 10.1200/JCO.2010.28.0669
13. Medina-Echeverz J, Haile LA, Zhao F, Gamrekelashvili J, Ma C, Métais JY, et al (2014). IFN- γ regulates survival and function of tumor-induced CD11b+Gr-1high myeloid derived suppressor cells by modulating the anti-apoptotic molecule Bcl2a1. *Eur J Immunol*, 44(8):2457-67. DOI: 10.1002/eji.201444497
14. Yang Y, Lundqvist A (2020). Immunomodulatory Effects of IL-2 and IL-15; Implications for Cancer Immunotherapy. *Cancers*, 12(12):3586. DOI: 10.3390/cancers12123586
15. McDermott DF, Atkins MB (2006). Interleukin-2 therapy of metastatic renal cell carcinoma--predictors of response. *Semin Oncol*, 33(5):583-7. DOI: 10.1053/j.seminoncol.2006.06.004
16. Maria-Elisabeth Goebeler et Ralf C. Bargou (2020). T cell-engaging therapies — BiTEs and beyond | *Nature Reviews Clinical Oncology*, 418–434 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41571-020-0347-5>
17. Allen C, Zeidan AM, Bewersdorf JP (2021). BiTEs, DARTS, BiKEs and TriKEs—Are Antibody Based Therapies Changing the Future Treatment of AML? *Life*, 11(6):465. DOI: 10.3390/life11060465

18. Heath WR, Carbone FR (2001). Cross-presentation in viral immunity and self-tolerance. *Nat Rev Immunol*, 1(2):126-34. DOI: 10.1038/35100512
19. Andrés Alloatti, Fiorella Kotsias, Joao Gamelas Magalhaes, Sebastian Amigorena (2016). Dendritic cell maturation and cross-presentation: timing matters! *Immunological Reviews - Wiley Online Library*, (272). <https://doi.org/10.1111/imr.12432>
20. Stefanie K. Wculek, Francisco J. Cueto, Adriana M. Mujal, Ignacio Melero, Matthew F. Krummel & David Sancho (2019). Table 1 Human and mouse DC subsets. *Nature Reviews Immunology*, 20(1): 7–24. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41577-019-0210-z>
21. Wculek SK, Cueto FJ, Mujal AM, Melero I, Krummel MF, Sancho D (2020). Dendritic cells in cancer immunology and immunotherapy. *Nat Rev Immunol*, 20(1):7-24. DOI: 10.1038/s41577-019-0210-z
22. Mehrotra S, Britten CD, Chin S, Garrett-Mayer E, Cloud CA, Li M, et al (2017). Vaccination with poly(IC:LC) and peptide-pulsed autologous dendritic cells in patients with pancreatic cancer. *Journal of Hematology & Oncology*. 7 avr 2017;10(1):82. DOI : 10.1186/s13045-017-0459-2
23. Saluja SS, Hanlon DJ, Sharp FA, Hong E, Khalil D, Robinson E, et al (2014). Targeting human dendritic cells via DEC-205 using PLGA nanoparticles leads to enhanced cross-presentation of a melanoma-associated antigen. *Int J Nanomedicine*; 9:5231-46. DOI: 10.2147/IJN.S66639
24. Bloemendal M, Bol KF, Boudewijns S, Gorris MAJ, de Wilt JHW, Croockewit SAJ, et al (2022). Immunological responses to adjuvant vaccination with combined CD1c+ myeloid and plasmacytoid dendritic cells in stage III melanoma patients. *OncolImmunology*; 11(1):2015113. DOI: 10.1080/2162402X.2021.2015113
25. Saxena M, van der Burg SH, Melief CJM, Bhardwaj N (2021). Therapeutic cancer vaccines. *Nat Rev Cancer*; 21(6):360-78. DOI: 10.1038/s41568-021-00346-0
26. Schumacher TN, Scheper W, Kvistborg P (2019). Cancer Neoantigens. *Annual Review of Immunology* ;37(1):173-200. DOI: 10.1146/annurev-immunol-042617-053402

27. Bommareddy PK, Shettigar M, Kaufman HL (2018). Integrating oncolytic viruses in combination cancer immunotherapy. *Nat Rev Immunol* ;18(8):498-513. DOI : 10.1038/s41577-018-0014-6
28. Kobiyama K, Ishii KJ (2022). Making innate sense of mRNA vaccine adjuvanticity. *Nat Immunol* ;23(4):474-6. DOI: 10.1038/s41590-022-01168-4
29. Tian Y, Xie D, Yang L (2022). Engineering strategies to enhance oncolytic viruses in cancer immunotherapy. *Sig Transduct Target Ther.* ;7(1):1-21. DOI: 10.1038/s41392-022-00951-x
30. Mantwill K, Klein FG, Wang D, Hindupur SV, Ehrenfeld M, Holm PS, et al (2021). Concepts in Oncolytic Adenovirus Therapy. *International Journal of Molecular Sciences* ;22(19):10522. DOI: 10.3390/ijms221910522
31. Nestić D, Božinović K, Pehar I, Wallace R, Parker AL, Majhen D (2021). The Revolving Door of Adenovirus Cell Entry: Not All Pathways Are Equal. *Pharmaceutics* ;13(10):1585. DOI : 10.3390/pharmaceutics13101585
32. Hemminki O, dos Santos JM, Hemminki A (2020). Oncolytic viruses for cancer immunotherapy. *Journal of Hematology & Oncology* ;13(1):84. DOI: 10.1186/s13045-020-00922-1
33. Hans-Jochem Kolb (2008). Graft-versus-leukemia effects of transplantation and donor lymphocytes. *Blood*. American Society of Hematology; 112 (12): 4371–4383. DOI: <https://doi.org/10.1182/blood-2008-03-077974>
34. Sweeney C, Vyas P (2019). The Graft-Versus-Leukemia Effect in AML. *Frontiers in Oncology*;9. DOI: <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.01217>
35. Kumar A, Watkins R and Vilgelm AE (2021) Cell Therapy With TILs: Training and Taming T Cells to Fight Cancer. *Front. Immunol.* 12:690499. DOI: 10.3389/fimmu.2021.690499
36. Lee S, Margolin K (2012). Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Melanoma. *Curr Oncol Rep.* 1; 14(5):468-74. DOI: 10.1007/s11912-012-0257-5

37. Veatch JR, Lee SM, Fitzgibbon M, Chow IT, Jesernig B, Schmitt T, et al (2018). Tumor-infiltrating BRAFV600E-specific CD4+ T cells correlated with complete clinical response in melanoma. *J Clin Invest*; 128(4):1563-8. DOI : 10.1172/JCI98689
38. Dafni U, Michielin O, Lluesma SM, Tsourti Z, Polydoropoulou V, Karlis D, et al (2019). Efficacy of adoptive therapy with tumor-infiltrating lymphocytes and recombinant interleukin-2 in advanced cutaneous melanoma: a systematic review and meta-analysis. *Ann Oncol.*; 30(12):1902-13. DOI : 10.1093/annonc/mdz398
39. Dafni U, Michielin O, Lluesma SM, Tsourti Z, Polydoropoulou V, Karlis D, et al (2019). Efficacy of adoptive therapy with tumor-infiltrating lymphocytes and recombinant interleukin-2 in advanced cutaneous melanoma: a systematic review and meta-analysis. *Annals of Oncology.* ;30(12):1902-13. DOI : 10.1093/annonc/mdz398
40. Leko V, Rosenberg SA (2020). Identifying and Targeting Human Tumor Antigens for T Cell-Based Immunotherapy of Solid Tumors. *Cancer Cell.*;38(4):454-72. DOI : 10.1016/j.ccell.2020.07.013
41. Ugur M, Mueller SN (2019). T cell and dendritic cell interactions in lymphoid organs: More than just being in the right place at the right time. *Immunological Reviews* ;289(1):115-28. DOI : 10.1111/imr.12753
42. Jorgovanovic D, Song M, Wang L, Zhang Y (2020). Roles of IFN- γ in tumor progression and regression: a review. *Biomark Res.*;8(1):49. DOI : 10.1186/s40364-020-00228-x
43. Ingaramo PI, Ronco MT, Francés DEA, Monti JA, Pisani GB, Ceballos MP, et al (2011). Tumor necrosis factor alpha pathways develops liver apoptosis in type 1 diabetes mellitus. *Molecular Immunology*;48(12):1397-407. DOI: 10.1016/j.molimm.2011.03.015
44. Raskov H, Orhan A, Christensen JP, Gögenur I (2021). Cytotoxic CD8+ T cells in cancer and cancer immunotherapy. *Br J Cancer*;124(2):359-67. DOI : 10.1038/s41416-020-01048-4
45. Wu F, Fan J, He Y, Xiong A, Yu J, Li Y, et al (2021). Single-cell profiling of tumor heterogeneity and the microenvironment in advanced non-small cell lung cancer. *Nat Commun.*;12(1):2540. DOI : 10.1038/s41467-021-22801-0

46. Ni L, Lu J (2018). Interferon gamma in cancer immunotherapy. *Cancer Medicine*;7(9):4509-16. DOI: 10.1002/cam4.1700
47. Karpisheh V, Ahmadi M, Abbaszadeh-Goudarzi K, Mohammadpour Saray M, Barshidi A, Mohammadi H, et al (2022). The role of Th17 cells in the pathogenesis and treatment of breast cancer. *Cancer Cell Int.*;22(1):108. DOI : 10.1186/s12935-022-02528-8
48. Ohue Y, Nishikawa H (2019). Regulatory T (Treg) cells in cancer: Can Treg cells be a new therapeutic target? *Cancer Science*;110(7):2080-9. DOI : 10.1111/cas.14069
49. Malfitano AM, Pisanti S, Napolitano F, Di Somma S, Martinelli R, Portella G (2020). Tumor-Associated Macrophage Status in Cancer Treatment. *Cancers*;12(7):1987. DOI: 10.3390/cancers12071987
50. Chew GL, Campbell AE, De Neef E, Sutliff NA, Shadle SC, Tapscott SJ, et al (2019). DUX4 Suppresses MHC Class I to Promote Cancer Immune Evasion and Resistance to Checkpoint Blockade. *Developmental Cell. 9 sept 2019*;50(5):658-671.e7. DOI : 10.1016/j.devcel.2019.06.011
51. Nair, R., Westin, J. (2020). CAR T-Cells. *Immunotherapy. Advances in Experimental Medicine and Biology*; 1244. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-030-41008-7_10
52. Jayaraman J, Mellody MP, Hou AJ, Desai RP, Fung AW, Pham AHT, et al (2020). CAR-T design: Elements and their synergistic function. *EBioMedicine*; 58:102931. DOI: 10.1016/j.ebiom.2020.102931
53. Salter AI, Ivey RG, Kennedy JJ, Voillet V, Rajan A, Alderman EJ, et al (2018). Phosphoproteomic analysis of chimeric antigen receptor signaling reveals kinetic and quantitative differences that affect cell function. *Science Signaling*;11(544). DOI: 10.1126/scisignal.aat6753
54. Guedan S, Posey AD, Shaw C, Wing A, Da T, Patel PR, et al (2018). Enhancing CAR T cell persistence through ICOS and 4-1BB costimulation. *JCI Insight*; 3(1):e96976. DOI: 10.1172/jci.insight.96976

55. Tokarew N, Ogonek J, Endres S, von Bergwelt-Baildon M, Kobold S (2019). Teaching an old dog new tricks: next-generation CAR T cells. *Br J Cancer*;120(1):26-37. DOI: 10.1038/s41416-018-0325-1
56. Curran KJ, Pegram HJ, Brentjens RJ (2012). Chimeric antigen receptors for T cell immunotherapy: current understanding and future directions. *The Journal of Gene Medicine*;14(6):405-15. DOI: 10.1002/jgm.2604
57. Lai Y, Weng J, Wei X, Qin L, Lai P, Zhao R, et al (2018). Toll-like receptor 2 costimulation potentiates the antitumor efficacy of CAR T Cells. *Leukemia* ;32(3):801-8. DOI: 10.1038/leu.2017.249
58. Kouro T, Himuro H, Sasada T. Exhaustion of CAR T cells: potential causes and solutions. *Journal of Translational Medicine*;20(1):239. DOI: 10.1186/s12967-022-03442-3
59. Sheth VS, Gauthier J. Taming the beast: CRS and ICANS after CAR T-cell therapy for ALL. *Bone Marrow Transplant*; 56(3):552-66. DOI: 10.1038/s41409-020-01134-4
60. Shimabukuro-Vornhagen A, Gödel P, Subklewe M, Stemmler HJ, Schlößer HA, Schlaak M, et al (2018). Cytokine release syndrome. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer.*;6(1):56. DOI: 10.1186/s40425-018-0343-9
61. Neelapu SS (2019). Managing the toxicities of CAR T-cell therapy. *Hematological Oncology* ;37(S1):48-52. DOI: 10.1002/hon.2595
62. Sattva S. et al (2017). Axicabtagene Ciloleucel CAR T-Cell Therapy in Refractory Large B-Cell Lymphoma | NEJM. *The New England Journal of Medecine.*; 377:2531-2544. DOI: 10.1056/NEJMoa1707447
63. Vuillefroy de Silly R, Dietrich PY, Walker PR (2016). Hypoxia and antitumor CD8+ T cells: An incompatible alliance? *Oncoimmunology.*;5(12):e1232236. DOI: 10.1080/2162402X.2016.1232236
64. Research C for DE and. FDA approves tisagenlecleucel for adults with relapsed or refractory large B-cell lymphoma. FDA. 2 sept 2019.

65. Foeng J, Comerford I, McColl SR (2022). Harnessing the chemokine system to home CAR-T cells into solid tumors. *Cell Reports Medicine*.;3(3):100543. DOI: 10.1016/j.xcrm.2022.100543
66. Sengsayadeth S, Savani BN, Oluwole O, Dholaria B (2022). Overview of approved CAR-T therapies, ongoing clinical trials, and its impact on clinical practice. *eJHaem*.;3(S1):6-10. DOI: 10.1002/jha2.338
67. Schito, L. (2019). Hypoxia-Dependent Angiogenesis and Lymphangiogenesis in Cancer | SpringerLink. 1136; pp 71–85. DOI: https://doi.org/10.1007/978-3-030-12734-3_5
68. Teleanu RI, Chircov C, Grumezescu AM, Teleanu DM (2020). Tumor Angiogenesis and Anti-Angiogenic Strategies for Cancer Treatment. *Journal of Clinical Medicine*;9(1):84. DOI: 10.3390/jcm9010084
69. Bourhis M, Palle J, Galy-Fauroux I, Terme M (2021). Direct and Indirect Modulation of T Cells by VEGF-A Counteracted by Anti-Angiogenic Treatment. *Frontiers in Immunology*;12. DOI: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.616837>
70. Chen J (2012). Regulation of Tumor Initiation and Metastatic Progression by Eph Receptor Tyrosine Kinases. Dans: Daar IO, éditeur. *Advances in Cancer Research. Academic Press*; p. 1-20. DOI: 10.1016/B978-0-12-386503-8.00001-6
71. Damaghi M, Wojtkowiak JW and Gillies RJ (2013) pH sensing and regulation in cancer. *Front. Physiol.* 4:370. DOI: 10.3389/fphys.2013.00370
72. Tu VY, Ayari A, O'Connor RS (2021). Beyond the Lactate Paradox: How Lactate and Acidity Impact T Cell Therapies against Cancer. *Antibodies (Basel)*; 10(3):25. DOI: 10.3390/antib10030025
73. Xie G, Dong H, Liang Y, Ham JD, Rizwan R, Chen J (2020). CAR-NK cells: A promising cellular immunotherapy for cancer. *EBioMedicine*; 2020; 59:102975. DOI: 10.1016/j.ebiom.2020.102975

74. Sivori S, Vacca P, Del Zotto G, Munari E, Mingari MC, Moretta L. Human NK cells: surface receptors, inhibitory checkpoints, and translational applications. *Cell Mol Immunol*. Mai 2019;16(5):430-41. DOI : 10.1038/s41423-019-0206-4
75. Pende D, Falco M, Vitale M, Cantoni C, Vitale C, Munari E, Bertaina A, Moretta F, Del Zotto G, Pietra G, Mingari MC, Locatelli F and Moretta L (2019). Killer Ig-Like Receptors (KIRs): Their Role in NK Cell Modulation and Developments Leading to Their Clinical Exploitation. *Front. Immunol*. 10:1179. DOI: 10.3389/fimmu.2019.01179.
76. Holmes TD, El-Sherbiny YM, Davison A, Clough SL, Blair GE, Cook GP (2011). A Human NK Cell Activation/Inhibition Threshold Allows Small Changes in the Target Cell Surface Phenotype To Dramatically Alter Susceptibility to NK Cells. *The Journal of Immunology*; 186(3):1538-45. DOI: 10.4049/jimmunol.1000951
77. Ran G he, Lin Y qing, Tian L, Zhang T, Yan D mei, Yu J hua, et al. Natural killer cell homing and trafficking in tissues and tumors: from biology to application. *Sig Transduct Target Ther*. 29 juin 2022;7(1):1-21.
78. Gong, Y., Klein Wolterink, R.G.J., Wang, J. et al (2021). Chimeric antigen receptor natural killer (CAR-NK) cell design and engineering for cancer therapy. *J Hematol Oncol*; (14), 73. <https://doi.org/10.1186/s13045-021-01083-5>
79. Use of CAR-Transduced Natural Killer Cells in CD19-Positive Lymphoid Tumors | NEJM. *The New England Journal of Medecine*; 382:545-553.
80. Loredana Ruggeri et al (2002). Effectiveness of Donor Natural Killer Cell Alloreactivity in Mismatched Hematopoietic Transplants. *Science*295, 2097-2100. DOI:10.1126/science.1068440
81. Shimasaki N, Jain A, Campana D (2020). NK cells for cancer immunotherapy. *Nat Rev Drug Discov*; 19(3):200-18. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41573-019-0052-1>
82. Knorr DA, Bachanova V, Verneris MR, Miller JS (2014). Clinical utility of natural killer cells in cancer therapy and transplantation. *Seminars in Immunology*; 26(2):161-72. DOI: 10.1016/j.smim.2014.02.002

83. May Daher; Katayoun Rezvani (2021). Outlook for New CAR-Based Therapies with a Focus on CAR NK Cells: What Lies Beyond CAR-Engineered T Cells in the Race against Cancer | *Cancer Discovery | American Association for Cancer Research*; 11 (1): 45–58. DOI: <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-20-0556>
84. Depil S, Duchateau P, Grupp SA, Mufti G, Poirot L (2020). ‘Off-the-shelf’ allogeneic CAR T cells: development and challenges. *Nat Rev Drug Discov.*;19(3):185-99. DOI: 10.1038/s41573-019-0051-2
85. Skapek SX, Ferrari A, Gupta AA, Lupo PJ, Butler E, Shipley J, et al (2019). Rhabdomyosarcoma. *Nat Rev Dis Primers*; 5(1):1-19. DOI: 10.1038/s41572-018-0051-2
86. Ben Arush M, Minard-Colin V, Mosseri V, Defachelles AS, Bergeron C, Algret N, et al (2015). Does aggressive local treatment have an impact on survival in children with metastatic rhabdomyosarcoma? *European Journal of Cancer* ;51(2):193-201. DOI: 10.1016/j.ejca.2014.11.009
87. Marielle EY, et al (2019). Insights into pediatric rhabdomyosarcoma research: Challenges and goals. *Pediatric Blood & Cancer - Wiley Online Library*. DOI: <https://doi.org/10.1002/pbc.27869>
88. Linardic CM (2008). PAX3-FOXO1 Fusion Gene in Rhabdomyosarcoma. *Cancer Lett*;270(1):10-8. DOI: 10.1016/j.canlet.2008.03.035
89. Parham, David M. MD; Barr, Frederic G. MD, PhD (2013). Classification of Rhabdomyosarcoma and Its Molecular Basis: *Advances in Anatomic Pathology*; 20(6):p 387-397. DOI: 10.1097/PAP.0b013e3182a92d0d
90. Samuels Y, Waldman T (2010). Oncogenic Mutations of PIK3CA in Human Cancers. *Curr Top Microbiol Immunol.*;347:21-41.
91. Kim S, Jeong S (2019). Mutation Hotspots in the β -Catenin Gene: Lessons from the Human Cancer Genome Databases. *Mol Cells.*;42(1):8-16.

92. Lavoie RR, Gargollo PC, Ahmed ME, Kim Y, Baer E, Phelps DA, et al (2021). Surfaceome Profiling of Rhabdomyosarcoma Reveals B7-H3 as a Mediator of Immune Evasion. *Cancers*.;13(18):4528.
93. Nathan M Kendsersky et al. (2021). The B7-H3–Targeting Antibody–Drug Conjugate m276-SL-PBD Is Potently Effective Against Pediatric Cancer Preclinical Solid Tumor Models | *Clinical Cancer Research | American Association for Cancer Research*; 27 (10): 2938–2946. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-20-4221
94. Levine KM, Ding K, Chen L, Oesterreich S (2020). FGFR4: A promising therapeutic target for breast cancer and other solid tumors. *Pharmacology & Therapeutics*; 214:107590. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2020.107590
95. Borst L, van der Burg SH, van Hall T (2020). The NKG2A–HLA-E Axis as a Novel Checkpoint in the Tumor Microenvironment. *Clinical Cancer Research*; 26(21):5549-56. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-19-2095>
96. Monaco EL, Tremante E, Cerboni C, Melucci E, Sibilio L, Zingoni A, et al (2011). Human Leukocyte Antigen E Contributes to Protect Tumor Cells from Lysis by Natural Killer Cells. *Neoplasia*.;13(9):822-IN14. DOI: 10.1593/neo.101684
97. Borrego F, Masilamani M, Kabat J, Sanni TB, Coligan JE (2005). The cell biology of the human natural killer cell CD94/NKG2A inhibitory receptor. *Molecular Immunology*;42(4):485-8. DOI: 10.1016/j.molimm.2004.07.031
98. Fisher JG, Doyle ADP, Graham LV, Khakoo SI, Blunt MD (2022). Disruption of the NKG2A: HLA-E Immune Checkpoint Axis to Enhance NK Cell Activation against Cancer. *Vaccines* ;10(12):1993. DOI: 10.3390/vaccines10121993
99. Bissig KD, Wieland SF, Tran P, Isogawa M, Le TT, Chisari FV, et al (2010). Human liver chimeric mice provide a model for hepatitis B and C virus infection and treatment. *J Clin Invest*;120(3):924-30. DOI: 10.1172/JCI40094
100. Wang X, Xiong H, Ning Z. Implications of NKG2A in immunity and immune-mediated diseases. *Frontiers in Immunology*. 2022;13.

101. Barrangou R, Marraffini LA (2014). CRISPR-Cas Systems: Prokaryotes Upgrade to Adaptive Immunity. *Molecular Cell.*;54(2):234-44.
102. Prashant Mali, Kevin M Esvelt & George M Church (2013). Figure 1: Functioning of the type II CRISPR-Cas systems in bacteria3. | *Nature Methods.*; pages957–963.
<https://doi.org/10.1038/nmeth.2649>
103. Peters JM, Silvis MR, Zhao D, Hawkins JS, Gross CA, Qi LS (2015). Bacterial CRISPR: accomplishments and prospects. *Current Opinion in Microbiology.*;27:121-6. DOI: 10.1016/j.mib.2015.08.007.
104. Wu X, Kriz AJ, Sharp PA (2014). Target specificity of the CRISPR-Cas9 system. *Quant Biol.*;2(2):59-70. DOI: 10.1007/s40484-014-0030-x
105. Xue C, Greene EC (2021). DNA Repair Pathway Choices in CRISPR-Cas9-Mediated Genome Editing. *Trends in Genetics.*;37(7):639-56. DOI: 10.1016/j.tig.2021.02.008
106. Rani R, Yadav P, Barbadikar KM, Baliyan N, Malhotra EV, Singh BK, et al (2016). CRISPR/Cas9: a promising way to exploit genetic variation in plants. *Biotechnol Lett.*;38(12):1991-2006. DOI: 10.1007/s10529-016-2195-z
107. Liu M, Rehman S, Tang X, Gu K, Fan Q, Chen D, et al (2019). Methodologies for Improving HDR Efficiency. *Frontiers in Genetics.*;9. <https://doi.org/10.3389/fgene.2018.00691>
108. PAM site and seed region of CRISPR guide RNA. Synthego. 2022.
109. Colamartino ABL, Lemieux W, Bifsha P, Nicoletti S, Chakravarti N, Sanz J, et al (2019). Efficient and Robust NK-Cell Transduction With Baboon Envelope Pseudotyped Lentivector. *Front Immunol.* 16 déc 2019;10. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02873>
110. Naeimi Kararoudi M, Tullius BP, Chakravarti N, Pomeroy EJ, Moriarity BS, Beland K, et al (2020). Genetic and epigenetic modification of human primary NK cells for enhanced antitumor activity. *Seminars in Hematology.*;57(4):201-12. DOI: 10.1053/j.seminhematol.2020.11.006

111. Streltsova MA, Barsov E, Erokhina SA, Kovalenko EI (2017). Retroviral gene transfer into primary human NK cells activated by IL-2 and K562 feeder cells expressing membrane-bound IL-21. *Journal of Immunological Methods*;450:90-4. DOI: 10.1016/j.jim.2017.08.003
112. Fung H, Gerson SL (2014). Chapter 3 - Viral Insertion Site Detection and Analysis in Cancer Gene Therapy. Dans: Lattime EC, Gerson SL, éditeurs. *Gene Therapy of Cancer (Third Edition)*. San Diego: Academic Press; p. 35-46. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394295-1.00003-2>
113. Derek A Persons (2020).Lentiviral Vector Gene Therapy: Effective and Safe? *Molecular Therapy*; 18 :861-862. DOI:<https://doi.org/10.1038/mt.2010.70>
114. Poletti V, Mavilio F (2018). Interactions between Retroviruses and the Host Cell Genome. *Molecular Therapy - Methods & Clinical Development*;8:31-41. DOI: 10.1016/j.omtm.2017.10.001
115. Amirache F, Lévy C, Costa C, Mangeot PE, Torbett BE, Wang CX, et al (2014). Mystery solved: VSV-G-LVs do not allow efficient gene transfer into unstimulated T cells, B cells, and HSCs because they lack the LDL receptor. *Blood*; 123(9):1422-4. DOI: 10.1182/blood-2013-11-540641
116. Van Ewijk R, Vaarwerk B, Breunis WB, Schoot RA, ter Horst SAJ, van Rijn RR, et al (2021). The Value of Early Tumor Size Response to Chemotherapy in Pediatric Rhabdomyosarcoma. *Cancers*;13(3):510. DOI: 10.3390/cancers13030510
117. Biedka M, Kuźba-Kryszak T, Nowikiewicz T, Żyromska A (2016). Fertility impairment in radiotherapy. *Contemp Oncol (Pozn)*;20(3):199-204. DOI: 10.5114/wo.2016.57814
118. Oun R, Moussa YE, Wheate NJ (2018). The side effects of platinum-based chemotherapy drugs: a review for chemists. *Dalton Trans*;47(19):6645-53. DOI: 10.1039/c8dt00838h
119. Liu Q, Li J, Zheng H, Yang S, Hua Y, Huang N, et al (2023). Adoptive cellular immunotherapy for solid neoplasms beyond CAR-T. *Molecular Cancer*;22(1):28. <https://doi.org/10.1186/s12943-023-01735-9>

120. Mackall CL, Cui YK (2018). Anti-cd276 chimeric antigen receptors. US20180346544A1.
121. Khan J, Baskar S, ORENTAS RJ, Dimitrov DS, Zhu Z (2017). Anticorps monoclonaux spécifiques du récepteur de facteur de croissance des fibroblastes 4 (fgfr4) et leurs procédés d'utilisation. WO2017049296A1.
122. Jessica Kunkiel et al (2017). The CpG-sites of the CBX3 ubiquitous chromatin opening element are critical structural determinants for the anti-silencing function | *Scientific Reports*; 7919. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-04212-8>
123. Girard-Gagnepain A, Amirache F, Costa C, Lévy C, Frecha C, Fusil F, et al (2014). Baboon envelope pseudotyped LVs outperform VSV-G-LVs for gene transfer into early-cytokine-stimulated and resting HSCs. *Blood*;124(8):1221-31. DOI: 10.1182/blood-2014-02-558163
124. Somanchi SS, Lee DA (2016). Ex Vivo Expansion of Human NK Cells Using K562 Engineered to Express Membrane Bound IL21. *Natural Killer Cells: Methods and Protocols. New York, NY: Springer*; p. 175-93. DOI: 10.1007/978-1-4939-3684-7_15
125. German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH: Details. DSMZ.
126. RD - CCL-136 | ATCC
127. CHOPCHOP. <https://chopchop.cbu.uib.no/>
128. Sanjana NE, Shalem O, Zhang F (2014). Improved vectors and genome-wide libraries for CRISPR screening. *Nat Methods*;11(8):783-4. DOI: 10.1038/nmeth.3047
129. Becker PSA, Suck G, Nowakowska P, Ullrich E, Seifried E, Bader P, et al (2016). Selection and expansion of natural killer cells for NK cell-based immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother*;65(4):477-84. DOI: 10.1007/s00262-016-1792-y
130. Fang Fang et al (2022). Advances in NK cell production | *Cellular & Molecular Immunology*; 460-481. <https://doi.org/10.1038/s41423-021-00808-3>
131. Van Looveren D, Giacomazzi G, Thiry I, Sampaolesi M, Gijsbers R (2021). Improved functionality and potency of next generation BinMLV viral vectors toward safer gene

therapy. *Molecular Therapy - Methods & Clinical Development*;23:51-67. DOI: 10.1016/j.omtm.2021.07.003

132. Snapp EL. Fluorescent Proteins: A Cell Biologist's User Guide. *Trends Cell Biol*; 19(11):649-55. DOI: 10.1016/j.tcb.2009.08.002
133. Gwalani LA, Orange JS (2018). Single Degranulations in NK Cells Can Mediate Target Cell Killing. *The Journal of Immunology*; 200(9):3231-43. DOI: 10.4049/jimmunol.1701500
134. Prager I, Watzl C (2019). Mechanisms of natural killer cell-mediated cellular cytotoxicity. *Journal of Leukocyte Biology*; 105(6):1319-29. <https://doi.org/10.1002/JLB.MR0718-269R>
135. Gocher AM, Workman CJ, Vignali DAA (2022). Interferon- γ : teammate or opponent in the tumour microenvironment? *Nat Rev Immunol*;22(3):158-72. DOI: 10.1038/s41577-021-00566-3
136. Cohnen A, Chiang SC, Stojanovic A, Schmidt H, Claus M, Saftig P, et al (2013). Surface CD107a/LAMP-1 protects natural killer cells from degranulation-associated damage. *Blood*; 122(8):1411-8. DOI: 10.1182/blood-2012-07-441832
137. Fei F, Rong L, Jiang N, Wayne AS, Xie J (2022). Targeting HLA-DR loss in hematologic malignancies with an inhibitory chimeric antigen receptor. *Molecular Therapy*; 30(3):1215-26. DOI: 10.1016/j.ymthe.2021.11.013
138. Riffle S, Hegde RS (2017). Modeling tumor cell adaptations to hypoxia in multicellular tumor spheroids. *J Exp Clin Cancer Res*;36(1):102. DOI : 10.1186/s13046-017-0570-9
139. Ajina A, Maher J (2017). Strategies to Address Chimeric Antigen Receptor Tonic Signaling. *Molecular Cancer Therapeutics*; 17(9):1795-815. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-17-1097>
140. Goldenson BH, Hor P, Kaufman DS (2022). iPSC-Derived Natural Killer Cell Therapies - Expansion and Targeting. *Frontiers in Immunology*;13. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.841107>

141. Sarkar S, Sabhachandani P, Ravi D, Potdar S, Purvey S, Beheshti A, et al (2017). Dynamic Analysis of Human Natural Killer Cell Response at Single-Cell Resolution in B-Cell Non-Hodgkin Lymphoma. *Frontiers in Immunology*;8. DOI: 10.3389/fimmu.2017.01736
142. Lee DA (2019). Cellular therapy: Adoptive immunotherapy with expanded natural killer cells. *Immunological Reviews*;290(1):85-99. DOI: 10.1111/imr.12793
143. Bari R, Granzin M, Tsang KS, Roy A, Krueger W, Orentas R, Schneider D, Pfeifer R, Moeker N, Verhoeyen E, Dropulic B and Leung W (2019) A Distinct Subset of Highly Proliferative and Lentiviral Vector (LV)-Transducible NK Cells Define a Readily Engineered Subset for Adoptive Cellular Therapy. *Front. Immunol. 10:2001*. DOI: 10.3389/fimmu.2019.02001
144. Hudecek M, Sommermeyer D, Kosasih PL, Silva-Benedict A, Liu L, Rader C, et al (2015). The non-signaling extracellular spacer domain of chimeric antigen receptors is decisive for in vivo antitumor activity. *Cancer Immunol Res*; 3(2):125-35. DOI: 10.1158/2326-6066.CIR-14-0127
145. Shivaprasad N, Xiong Y, Yohe M, Schneider D, Shern J, Baskar S, et al (2016). Developing FGFR4 Chimeric Antigen Receptor CAR T Cell Therapy Against Rhabdomyosarcoma. *Molecular Therapy*;24: S257-8. DOI:[https://doi.org/10.1016/S1525-0016\(16\)33457-8](https://doi.org/10.1016/S1525-0016(16)33457-8)
146. Watanabe N, Bajgain P, Sukumaran S, Ansari S, Heslop HE, Rooney CM, et al (2016). Fine-tuning the CAR spacer improves T-cell potency. *Oncot Immunology*; 5(12):e1253656. DOI: 10.1080/2162402X.2016.1253656
147. Hoffmann D, Schott JW, Geis FK, Lange L, Müller FJ, Lenz D, et al (2017). Detailed comparison of retroviral vectors and promoter configurations for stable and high transgene expression in human induced pluripotent stem cells. *Gene Ther*;24(5):298-307. DOI: 10.1038/gt.2017.20
148. Chng J, Wang T, Nian R, Lau A, Hoi KM, Ho SC, et al (2015). Cleavage efficient 2A peptides for high level monoclonal antibody expression in CHO cells. *MAbs*.;7(2):403-12. DOI: 10.1080/19420862.2015.1008351

149. Sun W, Chatterjee B, Wang Y, Stevenson HS, Edelman DC, Meltzer PS, et al (2015). Distinct methylation profiles characterize fusion-positive and fusion-negative rhabdomyosarcoma. *Mod Pathol.*; 28(9):1214-24. DOI: 10.1038/modpathol.2015.82
150. Zhao B, Li H, Xia Y, Wang Y, Wang Y, Shi Y, et al (2022). Immune checkpoint of B7-H3 in cancer: from immunology to clinical immunotherapy. *Journal of Hematology & Oncology*;15(1):153. <https://doi.org/10.1186/s13045-022-01364-7>
151. Kontos F, Michelakos T, Kurokawa T, Sadagopan A, Schwab JH, Ferrone CR, et al (2021). B7-H3: An Attractive Target for Antibody-based Immunotherapy. *Clinical Cancer Research*;27(5):1227-35. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-20-2584>
152. Kurzepa J, Kurzepa J, Golab P, Czerska S, Bielewicz J (2013). The significance of matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 in the ischemic stroke. *International Journal of Neuroscience*; 124(10):707-16. <https://doi.org/10.3109/00207454.2013.872102>
153. Schmitz C, Potekhina E, Irianto T, Belousov VV, Lavrentieva A (2021). Hypoxia Onset in Mesenchymal Stem Cell Spheroids: Monitoring With Hypoxia Reporter Cells. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*; 9: 611837. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.611837>
154. Costa EC, Moreira AF, de Melo-Diogo D, Gaspar VM, Carvalho MP, Correia IJ (2016). 3D tumor spheroids: an overview on the tools and techniques used for their analysis. *Biotechnology Advances*;34(8):1427-41. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2016.11.002
155. Terrén I, Orrantia A, Vitallé J, Zenarruzabeitia O and Borrego F (2019) NK Cell Metabolism and Tumor Microenvironment. *Front. Immunol.* 10:2278. doi: 10.3389/fimmu.2019.02278
156. Dratkiewicz E, Simiczyjew A, Mazurkiewicz J, Ziętek M, Matkowski R, Nowak D (2021). Hypoxia and Extracellular Acidification as Drivers of Melanoma Progression and Drug Resistance. *Cells*; 10(4):862. DOI: 10.3390/cells10040862
157. Trillitye Paullin, Chase Powell, Christopher Menzie, Robert Hill, Feng Cheng, Christopher J. Martyniuk, Sandy D. Westerheide (2017). Spheroid growth in ovarian cancer alters transcriptome responses for stress pathways and epigenetic responses | *PLOS ONE*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0182930>

158. Gomes-Silva D, Mukherjee M, Srinivasan M, Krenciute G, Dakhova O, Zheng Y, et al (2017). Tonic 4-1BB Costimulation in Chimeric Antigen Receptors Impedes T Cell Survival and Is Vector-Dependent. *Cell Reports*; 21(1):17-26. DOI: 10.1016/j.celrep.2017.09.015
159. Wang E, Wang LC, Tsai CY, Bhoj V, Gershenson Z, Moon E, et al (2015). Generation of Potent T-cell Immunotherapy for Cancer using DAP12-based, Multichain, Chimeric Immunoreceptors. *Cancer Immunol Res*; 3(7):815-26. DOI : 10.1158/2326-6066.CIR-15-0054
160. Töpfer K, Cartellieri M, Michen S, Wiedemuth R, Müller N, Lindemann D, et al (2015). DAP12-Based Activating Chimeric Antigen Receptor for NK Cell Tumor Immunotherapy. *The Journal of Immunology*; 194(7):3201-12. DOI : 10.4049/jimmunol.1400330
161. Brungs S, Kolanus W, Hemmersbach R (2015). Syk phosphorylation – a gravisensitive step in macrophage signalling. *Cell Commun Signal*;13(1):9. DOI :10.1186/s12964-015-0088-8
162. Kampmann M, Horlbeck MA, Chen Y, Tsai JC, Bassik MC, Gilbert LA, et al (2015). Next-generation libraries for robust RNA interference-based genome-wide screens. *Proceedings of the National Academy of Sciences*; 112(26):E3384-91. DOI: 10.1073/pnas.1508821112
163. Gupta RK, Gupta GS (2012). NKG2 Subfamily C (KLRC). Dans: Gupta GS, éditeur. *Animal Lectins: Form, Function and Clinical Applications*. Vienna: Springer; p. 639-66. https://doi.org/10.1007/978-3-7091-1065-2_30
164. Eric Le Dréan, Frédéric Vély, Lucia Olcese, Anna Cambiaggi, Sophie Guia, Gerald Krystal, Nadine Gervois, Alessandro Moretta, Francine Jotereau, Eric Vivier (2006). Inhibition of antigen-induced T cell response and antibody-induced NK cell cytotoxicity by NKG2A: association of NKG2A with SHP-1 and SHP-2 protein-tyrosine phosphatases. *European Journal of Immunology*; 28(1): p264-276. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-4141\(199801\)28:01<264::AID-IMMU264>3.0.CO;2-O](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-4141(199801)28:01<264::AID-IMMU264>3.0.CO;2-O)
165. Omer N, Nicholls W, Ruegg B, Souza-Fonseca-Guimaraes F and Rossi GR (2021) Enhancing Natural Killer Cell Targeting of Pediatric Sarcoma. *Front. Immunol.* 12:791206. doi: 10.3389/fimmu.2021.791206

166. Kaiser BK, Barahmand-pour F, Paulsene W, Medley S, Geraghty DE, Strong RK (2005). Interactions between NKG2x Immunoreceptors and HLA-E Ligands Display Overlapping Affinities and Thermodynamics1. *The Journal of Immunology.*;174(5):2878-84. DOI: 10.4049/jimmunol.174.5.2878
167. Guo C, Ma X, Gao F, Guo Y (2023). Off-target effects in CRISPR/Cas9 gene editing. *Front Bioeng Biotechnol*; 11:1143157. DOI : 10.3389/fbioe.2023.1143157
168. O'Geen H, Henry IM, Bhakta MS, Meckler JF, Segal DJ (2015). A genome-wide analysis of Cas9 binding specificity using CHIP-seq and targeted sequence capture. *Nucleic Acids Research*; 43(6):3389-404. DOI : 10.1093/nar/gkv137
169. Mangeot, P.E., Risson, V., Fusil, F. et al (2019). Genome editing in primary cells and in vivo using viral-derived Nanoblades loaded with Cas9-sgRNA ribonucleoproteins | *Nature Communications*; 10,45. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-07845-z>
170. Mulrooney TJ, Posch PE, Hurley CK (2013). DAP12 impacts trafficking and surface stability of killer immunoglobulin-like receptors on natural killer cells. *J Leukoc Biol*; 94(2):301-13. DOI : 10.1189/jlb.0213093
171. Perbellini, O.; Cavallini, C.; Chignola, R.; Galasso, M.; Scupoli, M.T(2022). Phospho-Specific Flow Cytometry Reveals Signaling Heterogeneity in T-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia. *Cell Lines*; 11(13):2072. <https://doi.org/10.3390/cells11132072>
172. Wentao Li, et al (2020). Chimeric Antigen Receptor Designed to Prevent Ubiquitination and Downregulation Showed Durable Antitumor Efficacy - ScienceDirect; 53, p456-470.e6. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2020.07.011>
173. Vivier E, Nunès JA, Vély F (2004). Natural killer cell signaling pathways. *Science*;306(5701):1517-9. DOI : 10.1126/science.1103478