

Université de Montréal

**Nouvelles approches thérapeutiques pour prévenir les
rechutes du neuroblastome : Étude préclinique et
translationnelle**

par Assila Belounis

Département de microbiologie, infectiologie et immunologie
Faculté de médecine

Thèse présentée
en vue de l'obtention du grade de doctorat
en microbiologie et immunologie

Avril 2019

© Assila Belounis, 2019

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :
**Nouvelles approches thérapeutiques pour prévenir les rechutes du neuroblastome :
Étude préclinique et translationnelle**

Présentée par :
Assila Belounis

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Réjean Lapointe

Président-rapporteur

~~~~

Dr Michel Duval

*Directeur de recherche*

~~~~

Dr Hervé Sartelet

Co-directeur de recherche

~~~~

Dre Nathalie Johnson

*Membre de jury*

~~~~

Dr David Mitchell

Examineur externe

~~~~

Dr Gilles Hickson

*Représentant du doyen*

## Résumé

Le neuroblastome (NB) est la tumeur extra-crânienne la plus fréquente du jeune enfant. Malgré une thérapie multimodale très agressive, 40% des patients atteints de NB à haut risque rechutent. Le traitement de ces patients consiste à éliminer la tumeur par chirurgie, radiothérapie et chimiothérapie, à reconstituer la moelle osseuse par une greffe de cellules souches autologues et enfin à éliminer la maladie résiduelle (MRD) par une immunothérapie visant l'antigène GD2 exprimé par les neuroblastes. Notre étude préclinique a examiné l'efficacité de deux stratégies de traitements qui visent à potentialiser les thérapies actuelles et réduire leur toxicité. La première consiste à réduire la masse tumorale par la radiothérapie ciblée combinée à des radiosensibilisants. La deuxième approche est basée sur l'activation des cellules natural killer (NK) pour potentialiser l'effet de l'immunothérapie anti-GD2 et éliminer la MRD.

L'autophagie est un processus catabolique qui élimine les protéines et organelles endommagées par différents stress incluant les irradiations. Par conséquent, inhiber l'autophagie pourrait sensibiliser les neuroblastes aux irradiations. Or, nous avons montré qu'étant très radiosensibles, les neuroblastes ne sont pas davantage éliminés par les irradiations quand ils sont traités avec un inhibiteur de l'autophagie. De plus, l'absence d'un inhibiteur efficace de l'autophagie à usage thérapeutique ne permet pas actuellement d'adopter cette approche.

Notre étude a également permis de révéler une nouvelle approche de stimulation des cellules NK par les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC) activées par un ligand du récepteur *Toll-like*, capable d'éradiquer la MRD et prévenir les rechutes de NB. Nos résultats ont permis, d'une part, d'élucider les mécanismes impliqués dans la lyse des cellules NK activées par les pDC contre les neuroblastes et, d'une autre part, de démontrer que l'axe pDC-NK chez le patient est fonctionnel, augmente l'efficacité de l'anti-GD2 et élimine efficacement les neuroblastes. Ainsi, l'immunothérapie par les cellules NK est une stratégie très prometteuse pour traiter le NB. Cette étude préclinique servira de base à l'élaboration d'un essai clinique pour traiter les enfants atteints de NB au CHU Sainte Justine.

**Mots-clés :** Neuroblastome, Autophagie, Immunothérapie anti-GD2, Cellules Natural Killer, Cellules dendritiques plasmacytoïdes, Immunothérapie du cancer.

## Abstract

Neuroblastoma (NB) is the most common extracranial solid tumor in childhood. Despite aggressive multimodal therapy, 40% of patients with high-risk NB relapse. The current therapy comprises an induction treatment with chemotherapy and surgery, a consolidation treatment including radiotherapy and high-dose chemotherapy followed by bone marrow rescue with autologous hematopoietic stem cell transplantation and finally anti-GD2 immunotherapy targeting the disialoganglioside (GD2) antigen expressed by neuroblasts to treat minimal residual disease (MRD). Our preclinical study proposes two treatment strategies to potentiate current therapies and reduced toxicities. The first aim to reduce tumor mass by targeted radiotherapy combined with radiosensitizers. The second approach is based on the activation of natural killer (NK) cells to potentiate the effect of anti-GD2 therapy and eliminate MRD.

Autophagy is a catabolic process that recycle damaged proteins and organelles, induced under various conditions of cellular stress including irradiation. Therefore, inhibiting autophagy could sensitize neuroblasts to irradiation. However, our study showed that neuroblasts were highly sensitive to irradiation and autophagy inhibitor failed to increase neuroblasts sensitization to irradiation. In addition, the absence of a potent autophagy inhibitor for therapeutic use does not allow this approach to be adopted.

Our preclinical study demonstrated a novel approach based on NK cell stimulation with Toll-like activated plasmacytoid dendritic cells (pDC) that enhances the efficacy of anti-GD2 immunotherapy and prevent NB relapse. We elucidated the mechanisms involved in pDC-activated NK cells killing of neuroblasts. We further demonstrated that neuroblasts were efficiently killed by patient's NK cells after stimulation by activated pDC. This is further increased by the addition of anti-GD2 antibody. Altogether, our study demonstrates that NK cell-based immunotherapy has a real potential to enhance anti-GD2 immunotherapy effect and prevent NB relapse. This preclinical study will serve as a basis for the development of a clinical trial to treat children with NB at CHU Sainte Justine.

**Keywords:** Neuroblastoma, Autophagy, anti-GD2 immunotherapy, Natural killer cells, plasmacytoid dendritic cells, Cancer immunotherapy

# Table des matières

|                                                                          |              |
|--------------------------------------------------------------------------|--------------|
| <b>Résumé</b> .....                                                      | <b>I</b>     |
| <b>Abstract</b> .....                                                    | <b>II</b>    |
| <b>Table des matières</b> .....                                          | <b>III</b>   |
| <b>Liste des tableaux</b> .....                                          | <b>VII</b>   |
| <b>Liste des figures</b> .....                                           | <b>VIII</b>  |
| <b>Liste des sigles &amp; abréviations</b> .....                         | <b>IX</b>    |
| <b>Remerciements</b> .....                                               | <b>XVIII</b> |
| <b>Introduction</b> .....                                                | <b>1</b>     |
| <b>Chapitre 1 : Le neuroblastome</b> .....                               | <b>2</b>     |
| 1.1    Origine et développement du neuroblastome .....                   | 2            |
| 1.2    Épidémiologie .....                                               | 5            |
| 1.3    Présentation clinique.....                                        | 6            |
| 1.4    Diagnostic et facteurs de pronostic .....                         | 7            |
| 1.4.1    Diagnostic .....                                                | 7            |
| 1.4.1.1    Tests de laboratoire de diagnostic.....                       | 7            |
| 1.4.1.2    Imagerie radiographique et évaluation métastatique. ....      | 7            |
| 1.4.1.3    Évaluation histologique .....                                 | 8            |
| 1.4.2    Stratification des patients : facteurs de pronostic .....       | 8            |
| 1.4.2.1    Facteurs pronostic histologiques.....                         | 11           |
| 1.4.2.2    Facteurs de pronostic moléculaires.....                       | 14           |
| 1.5    Traitements du NB.....                                            | 20           |
| 1.5.1    L'induction : la chimiothérapie.....                            | 22           |
| 1.5.2    La chirurgie.....                                               | 22           |
| 1.5.3    La consolidation : chimiothérapie myéloablative et TCSHA.....   | 23           |
| 1.5.4    L'entretien : l'acide rétinoïque et l'immunothérapie .....      | 24           |
| 1.5.4.1    Thérapie de différenciation : l'acide 13-cis-rétinoïque ..... | 24           |
| 1.5.4.2    L'immunothérapie.....                                         | 25           |

|         |                                                                                                                 |           |
|---------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 1.5.5   | Le traitement du NB en rechute et/ou réfractaire.....                                                           | 30        |
| 1.5.5.1 | La chimiothérapie .....                                                                                         | 30        |
| 1.5.5.2 | La radiothérapie .....                                                                                          | 30        |
| 1.6     | Problématique du NB en rechute et/ou réfractaires aux traitements.....                                          | 31        |
|         | <b>Hypothèses et objectifs .....</b>                                                                            | <b>34</b> |
|         | <b>Chapitre 2 : Autophagie et radiothérapie par MIBG.....</b>                                                   | <b>36</b> |
| 2.1     | L'autophagie .....                                                                                              | 36        |
| 2.1.1   | Mécanismes de l'autophagie.....                                                                                 | 38        |
| 2.1.2   | Régulation de l'autophagie .....                                                                                | 39        |
| 2.1.3   | Rôle de l'autophagie dans le cancer.....                                                                        | 40        |
| 2.1.4   | Les inhibiteurs de l'autophagie .....                                                                           | 42        |
| 2.2     | La Radiothérapie par MIBG .....                                                                                 | 45        |
| 2.2.1   | La MIBG.....                                                                                                    | 45        |
| 2.3     | Hypothèses et objectifs .....                                                                                   | 46        |
| 2.4     | Matériels et méthodes .....                                                                                     | 47        |
| 2.5     | Résultats.....                                                                                                  | 50        |
| 2.5.1   | Les cellules du NB ont un niveau basal d'autophagie élevé.....                                                  | 50        |
| 2.5.2   | L'irradiation n'augmente pas le niveau d'autophagie .....                                                       | 51        |
| 2.5.3   | L'HCQ ne sensibilise pas les neuroblastes à l'irradiation .....                                                 | 56        |
| 2.6     | Discussion.....                                                                                                 | 58        |
| 2.7     | Conclusions et perspectives .....                                                                               | 61        |
|         | <b>Chapitre 3 : L'immunothérapie basée sur les cellules NK pour traiter le NB à haut risque</b><br><b>.....</b> | <b>63</b> |
| 3.1     | Les cellules NK.....                                                                                            | 63        |
| 3.1.1   | Les cellules NK.....                                                                                            | 63        |
| 3.1.2   | Les récepteurs des cellules NK.....                                                                             | 63        |
| 3.1.2.1 | Les Récepteurs de la superfamille des Immunoglobulines.....                                                     | 64        |
| 3.1.2.2 | Les Récepteurs de la superfamille des Lectines de type-C.....                                                   | 67        |
| 3.1.2.3 | Les récepteurs de la cytotoxicité naturelle (NCR).....                                                          | 67        |
| 3.1.2.4 | La famille des molécules d'adhésions (récepteurs de costimulation).....                                         | 68        |

|                  |                                                                                                                                                                           |           |
|------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 3.1.2.5          | CD16 (récepteur Fc $\gamma$ RIII) .....                                                                                                                                   | 68        |
| 3.1.3            | Le rôle des cellules NK.....                                                                                                                                              | 69        |
| 3.1.3.1          | Les mécanismes de cytotoxicité.....                                                                                                                                       | 69        |
| 3.1.3.2          | Fonction de production de cytokines .....                                                                                                                                 | 70        |
| 3.1.4            | La régulation des cellules NK.....                                                                                                                                        | 70        |
| 3.1.5            | Les cellules NK dans l’immunothérapie du NB .....                                                                                                                         | 71        |
| 3.2              | Les cellules dendritiques plasmacytoïdes .....                                                                                                                            | 72        |
| 3.2.1            | Phénotype et fonctions des pDC .....                                                                                                                                      | 72        |
| 3.2.2            | Signalisation des récepteurs TLR .....                                                                                                                                    | 73        |
| 3.2.3            | Les ligands des TLR .....                                                                                                                                                 | 74        |
| 3.3              | L’axe pDC-NK.....                                                                                                                                                         | 75        |
| <b>Résultats</b> | .....                                                                                                                                                                     | <b>77</b> |
| 3.4.1            | Article 1   BREAKING THE RESISTANCE OF NEUROBLASTOMA THROUGH ACTIVATION<br>OF NATURAL KILLER CELLS BY PLASMACYTOID DENDRITIC CELLS .....                                  | 78        |
| 3.4.1.1          | Préface.....                                                                                                                                                              | 78        |
| 3.4.1.2          | Contribution des auteurs .....                                                                                                                                            | 78        |
|                  | <i>Abstract</i> .....                                                                                                                                                     | 80        |
|                  | <i>Introduction</i> .....                                                                                                                                                 | 81        |
|                  | <i>Materials and Methods</i> .....                                                                                                                                        | 84        |
|                  | <i>Results</i> .....                                                                                                                                                      | 88        |
|                  | <i>Discussion</i> .....                                                                                                                                                   | 97        |
|                  | <i>Acknowledgements</i> .....                                                                                                                                             | 102       |
|                  | <i>Abbreviations</i> .....                                                                                                                                                | 102       |
|                  | <i>References</i> .....                                                                                                                                                   | 103       |
|                  | <i>Legends of supplemental figures</i> .....                                                                                                                              | 110       |
|                  | <i>Figures</i> .....                                                                                                                                                      | 111       |
| 3.4.1.3          | Reprint permission .....                                                                                                                                                  | 118       |
| 3.4.2            | Article 2   STIMULATION OF PATIENT’S NATURAL KILLER CELLS BY ACTIVATED<br>PLASMACYTOID DENDRITIC CELLS INCREASES EFFICACY OF IMMUNOTHERAPY AGAINST<br>NEUROBLASTOMA ..... | 119       |

|         |                                          |            |
|---------|------------------------------------------|------------|
| 3.4.2.1 | Préface.....                             | 119        |
| 3.4.2.2 | Contribution des auteurs .....           | 119        |
|         | <i>Abstract</i> .....                    | 121        |
|         | <i>Background</i> .....                  | 122        |
|         | <i>Methods</i> .....                     | 125        |
|         | <i>Results</i> .....                     | 131        |
|         | <i>Discussion</i> .....                  | 136        |
|         | <i>Conclusion</i> .....                  | 140        |
|         | <i>List of Abbreviations</i> .....       | 141        |
|         | <i>Declarations</i> .....                | 143        |
|         | <i>References</i> .....                  | 145        |
|         | <i>Figures legend</i> .....              | 150        |
|         | <i>Figures</i> .....                     | 155        |
|         | <b>Discussion</b> .....                  | <b>163</b> |
|         | <b>Conclusions et perspectives</b> ..... | <b>169</b> |
|         | <b>Bibliographie</b> .....               | <b>172</b> |
|         | <b>Annexe 1   Article 3</b> .....        | <b>i</b>   |



## Liste des tableaux

|                                                                                                                                           |           |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>Tableau I - Système de classification préopératoire – <i>International Neuroblastoma Risk Group Staging System (INRGSS)</i> .....</b>  | <b>9</b>  |
| <b>Tableau II - Système de classification – <i>International Neuroblastoma Risk Group (INRG)</i> .....</b>                                | <b>10</b> |
| <b>Tableau III - Système de classification histologique – <i>International Neuroblastoma Pathology Classification (INPC)</i> .....</b>    | <b>12</b> |
| <b>Tableau IV – Effet de la modulation de l'autophagie sur l'amélioration de la radiosensibilité de différents types de cancers .....</b> | <b>44</b> |
| <b>Tableau V - Les récepteurs des cellules NK .....</b>                                                                                   | <b>66</b> |

## Article 2

|                                                                  |            |
|------------------------------------------------------------------|------------|
| <b>Table 1 - <i>Characteristics of patients (n=5)</i>. .....</b> | <b>154</b> |
|------------------------------------------------------------------|------------|

## Liste des figures

|                                                                                         |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figure 1   Le développement de la crête neurale et le NB .....                          | 3  |
| Figure 2   Caractéristiques histologiques du NB.....                                    | 13 |
| Figure 3   Courbe de survie des patients atteints de NB selon le groupe de risque ..... | 20 |
| Figure 4   Schémas du traitement du NB selon le groupe de risque.....                   | 22 |
| Figure 5   L'immunothérapie du NB.....                                                  | 27 |
| Figure 6   Les principaux types d'autophagie chez les mammifères .....                  | 38 |
| Figure 7   Le niveau d'autophagie dans les cellules du NB.....                          | 51 |
| Figure 8   Effet de l'irradiation sur la modulation de l'autophagie .....               | 54 |
| Figure 9   L'HCQ ne sensibilise pas les cellules de NB à l'irradiation.....             | 57 |

### Article 1

|                   |     |
|-------------------|-----|
| Figure 1.1 .....  | 111 |
| Figure 1.2 .....  | 112 |
| Figure 1.3 .....  | 113 |
| Figure 1.4 .....  | 114 |
| Figure 1.5 .....  | 115 |
| Figure 1S.1 ..... | 116 |
| Figure 1S.2 ..... | 117 |

### Article 2

|                   |     |
|-------------------|-----|
| Figure 2.1 .....  | 155 |
| Figure 2.2 .....  | 156 |
| Figure 2.3 .....  | 157 |
| Figure 2.4 .....  | 158 |
| Figure 2S.1 ..... | 159 |
| Figure 2S.2 ..... | 160 |
| Figure 2S.3 ..... | 161 |
| Figure 2S.4 ..... | 162 |

## Liste des sigles & abréviations

### 0-9

7AAD        *7-aminoactinomycin D*

13 cis-RA    *Retinoic acid*

### A

Ac            Anticorps

ADN          Acide désoxyribonucléique

ALK          *Anaplastic lymphoma kinase*

ATG          *Autophagy related genes*

ATRX        *Alpha thalassemia/mental retardation syndrome X-linked gene*

ABS          Absolu

ADCC        *Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity* / Cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps

AKT          Protéine kinase B/AKT

APC          Allophycocyanine

ARN          Acide ribonucléique

ARNm        Acide ribonucléique messenger

ATP          Adénosine triphosphate

### B

BDCA        *Blood dendritic cell antigen* / Antigène des cellules dendritiques du sang

BSA *Bovine serum albumin* / Albumine de sérum bovin

## C

CAR *Chimeric antigen receptor* / Récepteur antigénique chimérique

CB *Cord blood* / Sang de cordon ombilical

CBMC Cellules mononuclées du sang de cordon

CCL Ligand de chemokine

CD *Cluster of differentiation* / Groupe de différenciation

CDC Cytotoxicité dépendante du complément

CFSE Carboxyfluorescéine diacétique ester succinimidylique

CHD5 Chromodomain helicase DNA binding protein 5

Cis conformation cis (réf à l'Isotrétinoïne)

CMH Complexe majeur d'histocompatibilité

COG *Children's Oncology Group*

CpG Motif cytosine-guanine d'ADN bactérien

CPA Cellule présentatrice d'antigène

CQ Chloroquine

CSC Cellule souche cancéreuse

CTL Contrôle

CXCL Chemokine à motif C-X-C

## D

D Domaine

|      |                                                                                      |
|------|--------------------------------------------------------------------------------------|
| DAMP | <i>Damage-associated molecular patterns</i> / Motifs moléculaires associés au danger |
| DC   | <i>Dendritic cell</i> / Cellule dendritique                                          |
| DMEM | <i>Dubelcco's Modified Eagle Medium</i>                                              |
| DMT  | Dose maximale tolérée                                                                |
| DR   | Sous-classe D du CMH de classe I                                                     |

## **E**

|      |                                                                              |
|------|------------------------------------------------------------------------------|
| EDTA | Acide éthylène diamine tétraacétique                                         |
| E:T  | <i>Effector : Target</i> / Ratio de cellules effectrices sur cellules cibles |
| EFS  | <i>Event-Free Survival</i> / Taux de survie sans complication                |
| ERO  | Espèces réactives de l'oxygène                                               |
| ESN  | Énolase spécifique des neurones / <i>Neuron specific enolase</i>             |

## **F**

|        |                                                                                    |
|--------|------------------------------------------------------------------------------------|
| FCN    | Facteur de croissance neurale / <i>NGF Neural growth factor</i>                    |
| Fab    | <i>Fragment antigen-binding</i> / Région variable d'un anticorps                   |
| FADD   | <i>FAS associated death domain</i> / Protéine associée aux domaines de mort du FAS |
| FAS    | <i>First apoptosis signal</i> / Fragment inducteur d'apoptose                      |
| FASL   | Ligand du fragment inducteur d'apoptose                                            |
| FBS    | <i>Fetal bovine serum</i> / Sérum bovin foetal                                     |
| Fc     | <i>Fragment Crystallizable</i> / Région constante d'un anticorps                   |
| F.D.A. | <i>Food and drug administration</i>                                                |
| FGF    | <i>Fibroblast Growth Factors</i> / Facteur de croissance des fibroblastes          |

FITC Isothiocyanate de fluorescéine

FLT3 *FMS-related tyrosine kinase 3*

## G

GD2 Disialoganglioside

GM-CSF *Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor* / Facteur de stimulation des colonies de granulocytes-macrophages

GN Ganglioneurome

GNB Ganglioneuroblastome

GSP Ganglions Sympathiques Primaires

GvHD *Graft-versus-host disease* / Maladie du greffon contre l'hôte

GvT *Graft-versus-tumor* / Greffon contre la tumeur

GWAS *Genome wide association study* / Étude d'association pangénomique

## H

HCQ Hydroxychloroquine

HE Coloration à l'hématoxyline et l'éosine

HLA *Human leukocyte antigen* / Antigène des leucocytes humains

HVA *HomoVanilic Acid* / l'acide homovanillique

HDAC Histones déacétylases

## I

I-131 Iode 131 ( $I^{131}$ ), isotope de l'iode

|        |                                                                                                                        |
|--------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| IDRF   | <i>Image-defined risk factors</i> / Facteurs de risques définis par l'image                                            |
| IFN    | Interféron                                                                                                             |
| Ig     | Immunoglobuline                                                                                                        |
| IL     | Interleukine                                                                                                           |
| INRG   | <i>International Neuroblastoma Risk Group</i>                                                                          |
| INRGSS | <i>International Neuroblastoma Risk Group Staging System</i>                                                           |
| INSS   | <i>International Neuroblastoma Staging System</i>                                                                      |
| IRF    | <i>Interferon-regulatory transcription factor</i>                                                                      |
| ITAM   | <i>Immunoreceptor tyrosine-based activation motif</i> / Motifs activateurs des immunorécepteurs associés à la tyrosine |
| ITIM   | <i>Immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif</i> / Motifs inhibiteurs des immunorécepteurs associés à la tyrosine |

## **K**

|     |                                     |
|-----|-------------------------------------|
| kDa | Kilodalton                          |
| KIR | <i>Killer cell Ig-like receptor</i> |

## **L**

|     |                                                           |
|-----|-----------------------------------------------------------|
| L   | Longue chaîne cytoplasmique                               |
| LAL | Leucémie lymphoblastique aiguë                            |
| LC3 | <i>Microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3</i> |
| LFA | <i>Lymphocyte function-associated antigen</i>             |
| LOH | <i>Loss of heterozygosity</i> / Perte d'hétérozygotie     |
| LRR | <i>Leucine-rich repeats</i> / Répétition riche en leucine |

## **M**

|      |                                                                           |
|------|---------------------------------------------------------------------------|
| mAb  | <i>Monoclonal antibody</i> / Anticorps monoclonal                         |
| MAPK | <i>Mitogen-activated protein kinases</i>                                  |
| mDC  | <i>Myeloid dendritic cells</i> / Cellules dendritiques myéloïdes          |
| MDSC | <i>Myeloid-Derived Suppressor Cells</i> / Cellules myéloïdes suppressives |
| MIBG | Méta-iodobenzylguanidine                                                  |
| MKI  | Index mitotique et caryorrhexis                                           |
| MRD  | <i>Minimal residual disease</i> / Maladie résiduelle                      |
| mTOR | <i>Mammalian target of rapamycin</i>                                      |
| MYCN | Gène MYCN                                                                 |

## **N**

|     |                                                                             |
|-----|-----------------------------------------------------------------------------|
| NCR | <i>Natural cytotoxicity receptors</i> / Récepteurs naturels de cytotoxicité |
| NK  | <i>Natural Killer</i>                                                       |
| NS  | Non-stimulé                                                                 |

## **O**

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

## **P**

|      |                                                                                            |
|------|--------------------------------------------------------------------------------------------|
| PAMP | <i>Pathogen-Associated Molecular Pattern</i> / Motifs moléculaires associés aux pathogènes |
|------|--------------------------------------------------------------------------------------------|



|         |                                                                                        |
|---------|----------------------------------------------------------------------------------------|
| PBMC    | <i>Peripheral blood mononuclear cells</i> / Cellules mononucléées du sang périphérique |
| PBS     | <i>Phosphate-buffered saline</i> / Tampon phosphate salin                              |
| pDC     | <i>Plasmacytoid dendritic cells</i> / Cellules dendritiques plasmacytoïdes             |
| PGP 9.5 | <i>Protein gene product</i>                                                            |
| PHOX2B  | <i>Paired-like homeobox 2b</i>                                                         |
| PE      | Phycoérythrine                                                                         |
| PE/Cy7  | Phycoérythrine/cyanine-7                                                               |
| PI      | <i>Propidium iodide</i> / Iodure de propidium                                          |
| PMO     | Protéines morphogénétiques osseuses / <i>BMP Bone morphogenetic protein</i>            |

## **R**

|      |                                                                                 |
|------|---------------------------------------------------------------------------------|
| RPMI | <i>Roswell Park Memorial Institute</i> / Milieu Roswell Park Memorial Institute |
|------|---------------------------------------------------------------------------------|

## **S**

|     |                                                                   |
|-----|-------------------------------------------------------------------|
| S   | Chaîne courte cytoplasmique                                       |
| SD  | <i>Standard deviation</i> / Déviation standard                    |
| SEM | <i>Standard error of the mean</i> / Erreur standard de la moyenne |

## **T**

|       |                                                                       |
|-------|-----------------------------------------------------------------------|
| TAA   | <i>Tumor associated antigen</i> / Antigène associé aux tumeurs        |
| TAM   | <i>Tumor-Associated Macrophage</i> / Macrophages associés à la tumeur |
| TCSHA | Transplantation de cellules souches hématopoïétiques autologue        |

|       |                                                                                                                                       |
|-------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| TGF   | <i>Transforming Growth Factor</i> / Facteur de croissance transformant                                                                |
| TIC   | <i>Tumor initiating cell</i> / Cellule initiatrice de tumeur                                                                          |
| TLR   | <i>Toll-Like Receptor</i> / Récepteur de type Toll                                                                                    |
| TNF   | <i>Tumor necrosis factor</i> / Facteur de nécrose tumorale                                                                            |
| TRAIL | <i>Tumor-necrosis-factor related apoptosis inducing ligand</i> / Ligand induisant l'apoptose apparenté au facteur de nécrose tumorale |

## V

|         |                                                                                            |
|---------|--------------------------------------------------------------------------------------------|
| VIPomas | <i>Vasoactive intestinal peptide</i> / Peptide Vasoactif Intestinal sécrété par une tumeur |
| VMA     | <i>Vanillylmandelic Acid</i> / Acide vanylmandélique                                       |

*À tous les enfants atteints de neuroblastome,*

## Remerciements

En écrivant ces lignes aujourd'hui, un grand chapitre se termine. L'aventure de la recherche est certes longue et pleine de défis mais tellement fascinante. Les choses n'ont pas toujours été faciles. Si j'y suis arrivée aujourd'hui c'est grâce à une équipe formidable qui m'a soutenue et fait à ce que je vienne chaque matin au labo avec joie et plaisir !

Dr Duval, je vous remercie d'avoir cru en moi, quand je doutais de moi-même. Merci pour votre soutien, délicatesse et surtout votre légendaire gentillesse. Je me souviens encore quand j'ai débuté dans le labo, vous aviez dit durant une présentation que votre fille avait écrit dans un devoir d'école : « *Everyday, my father goes to his work with his friends* » J'ai vite compris ce jour-là que j'avais tapé à la bonne porte et je ne m'étais pas trompée. Vous n'étiez pas un boss traditionnel mais celui qui guidait tout le monde à bon port. Vous m'avez appris que le leadership était un mélange de confiance, de soutien et de valorisation de chacun car c'est ce qui fait la réussite et l'épanouissement de tous. Merci Dr Duval pour tout ce que vous m'avez appris et apporté. Ce fut un grand honneur.

Sabine, Tu as été celle qui m'a tant appris, celle qui m'a guidée et qui m'a toujours soutenue ! tu as été mon modèle et mon inspiration durant toutes ces années. Je te remercie de m'avoir fait confiance et cru en moi. Merci pour ta présence, ta patience et ta générosité, merci de m'avoir transmis ton expertise et de n'avoir jamais hésité à m'aider. Merci de m'avoir accompagné à confronter ma peur des souris :), merci d'avoir toujours été là quand ça n'allait pas... Je te dois toutes mes réalisations au cours de ce parcours. Merci à toi chère Sabine.

Paulo, nos discussions vont me manquer, je garderai de toi les bons souvenirs, la perspicacité et le sens de la perfection. Merci d'avoir toujours répondu présent quand j'avais besoin d'aide, tu as été mon sauveur quand j'étais mal prise. Merci de m'avoir soutenue et pris en main le projet quand je devais être absente. Merci pour ton amitié et d'avoir ri à mes blagues et écouté quand ça n'allait pas. Je t'en suis très reconnaissante Paulo.

Marina, tu as très vite été une collègue formidable et une amie attentionnée. Merci de m'avoir aidée quand j'étais débordée. Je te souhaite beaucoup de succès.

Mathieu, les vampires sont loin d'être des héros mais toi tu l'es ! Mille merci d'avoir été mon héros durant toutes ces années. Je suis désolée de t'avoir fait si souvent réveiller tôt et surtout de t'avoir vidé de ton sang ! Merci Mathieu !

D'autres personnes absolument formidables m'ont apporté soutien et amitié. Amel, Louise, Sophie, Mélanie B, Sonia, Ines et Sabriya, vous êtes des femmes incroyables et nos discussions vont énormément me manquer. Je vous souhaite tout le succès.

Je remercie aussi toutes ces personnes qui ont fait que mon expérience soit unique et enrichissante. Je pense ici à Martine, Martin, Yildian, Mélanie D, Yasmine, Hervé et Nicolas. Je pense également à Sandy, Annie, Cristina, Kirstine, Rasheed, Aziz, Thomas, Hugo, Aurélien, William, Sylvia, Panos, Harika, Gael, Cynthia, Basma, Ohan, Benjamin, Pauline, Lina, Simon, Jasmine, Stéphanie ainsi que tous les volontaires pour leur précieuse contribution.

Je voudrais également remercier Dr Teira pour son soutien et d'avoir apporté des critiques constructives et une valeur ajoutée à nos recherches.

Je remercie également Marie Saint-Jacques, Yves-Line Delva et Marjolaine Blanchet pour leur disponibilité et leur gentillesse. Tout ce projet ne se serait pas réalisé sans leur aide.

Je remercie les organismes subventionnaires, FRQS, Fondation CHU Sainte Justine, Fondation Charles-Bruneau, la faculté des études supérieures et postdoctorale de l'UdeM ainsi que le département de microbiologie, infectiologie et immunologie de l'UdeM pour leur soutien.

Dr Sartelet, je n'allais sans doute pas finir ces lignes sans vous remercier d'avoir été le point de départ de toute cette aventure. Je ne vous remercierai jamais assez pour votre confiance, compréhension et énorme gentillesse.

Je voudrai aussi remercier des personnes très chères qui ont toujours été à mes côtés et qui m'ont apporté amour et soutien. Tonton Kheireddine, tata Souad, Selma, Sara.. merci !

Enfin, je remercie ma famille, sans laquelle rien ne se serait réalisé, pour leur amour et leur soutien sans fin, merci...

L'espoir passe par la recherche et sans vous tous, cet espoir n'existerait pas

M E R C I !

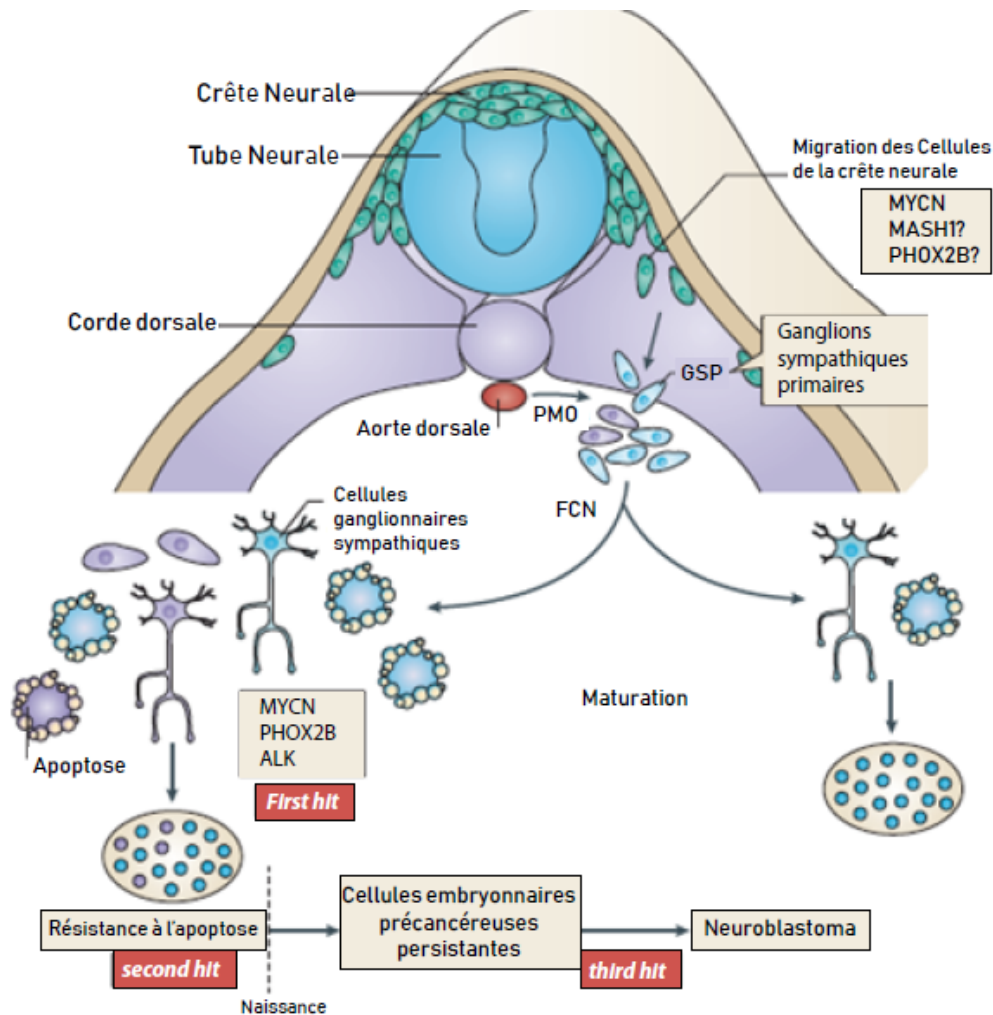
# **Introduction**

# Chapitre 1 : Le neuroblastome

Le neuroblastome (NB) est une tumeur du système nerveux autonome qui se développe à partir de cellules progénitrices de la crête neurale qui persistent anormalement durant le développement du système nerveux sympathique <sup>1</sup>. Le NB est un cancer presque exclusivement pédiatrique qui apparaît chez le très jeune enfant ou durant l'enfance. La tumeur prend naissance le plus souvent dans la glande médullosurrénale ou la chaîne parasymphatique et forme une masse au niveau du cou, le thorax, l'abdomen ou le pelvis <sup>2</sup>. Le NB est une maladie très complexe et hétérogène avec une présentation clinique allant d'une masse asymptomatique qui peut régresser spontanément à une tumeur invasive, largement disséminée et résistante à la chimiothérapie <sup>3,4</sup>. Cette hétérogénéité est associée à de nombreux facteurs tels que l'âge au diagnostic, le stade de la maladie et les caractéristiques biologiques de la tumeur. L'ensemble de ces facteurs influence le pronostic et les possibilités de traitements <sup>5</sup>. Des progrès significatifs ont été réalisés dans le traitement du NB dans la dernière décennie, cependant, environ 40% des patients atteints de NB à haut risque rechutent. Il existe donc un besoin urgent de développer de nouvelles approches thérapeutiques pour ces patients à haut risque.

## 1.1 Origine et développement du neuroblastome

De nombreuses évidences suggèrent que le NB se développe *in utero* au cours du développement sympatho-surrénalien et qu'il existe une phase précancéreuse embryonnaire <sup>6</sup>. En effet, plusieurs gènes candidats liés au développement sympatho-surrénalien seraient impliqués dans l'initiation du NB. Les cellules matures de la glande médullosurrénale et des ganglions sympathiques proviennent d'un ensemble de progéniteurs transitoires de la crête neurale. La différenciation de ces progéniteurs nécessite des signaux extrinsèques régulés spatialement et temporellement. Ces signaux sont responsables des étapes de migration, de spécification, de divergence et de maturation <sup>6</sup> (Figure 1).



**Figure 1 | Le développement de la crête neurale et le NB**

Sous l'influence du MYCN (*neuroblastoma derived MYC*) et des protéines morphogénétiques osseuses (PMO), les progéniteurs des neuroblastes migrent de la crête neurale vers la région latérale de la corde et à l'aorte dorsale. Les cellules subissent alors une spécification en tant que ganglions sympathiques primaires (GSP) avant la divergence en cellules neurales des ganglions sympathiques matures ou des cellules chromaffines. MYCN est considéré comme un « *first hit* », alors que les mutations de ALK et PHOX2B sont des mutations germinales. L'accès aux facteurs de croissance nerveuse (FCN) détermine si une cellule ganglionnaire sympathique normale (bleue) arrive à maturité donnant ainsi une cellule ganglionnaire terminale ou subit de l'apoptose. La survie postnatale des cellules neuroblastiques précancéreuses (violet) résulterait de la résistance au retrait des FCN. Ces cellules précancéreuses persistantes subiraient ensuite un troisième *hit* responsable de la transformation maligne. *Illustration adaptée de G.M. Marshall, D.R. Carter et al, 2014* <sup>6</sup>.



Au cours du développement sympatho-surrénal normal, l'expression du proto-oncogène MYCN (*neuroblastoma derived MYC*) est élevée dans la crête neurale post-migratoire précoce, où elle régule la migration ventrale et l'expansion des cellules de la crête neurale. Les niveaux de la protéine MYCN diminuent progressivement lors de la différenciation des neurones sympathiques, ce qui suggère que la maturation sympatho-surrénale nécessite une absence ou une faible expression de MYCN. En accord avec cette découverte, la transduction de la protéine MYCN dans les neurones sympathiques quiescents du rat réactive le cycle cellulaire et bloque la mort cellulaire qui est induite par le retrait du facteur de croissance nerveuse (FCN) <sup>7,8</sup>. Après la spécification sympatho-surrénalienne et l'expansion des ganglions sympathiques primaires, le développement du précurseur sympatho-surrénalien diverge et détermine le destin cellulaire vers une fin neuronale ou chromaffine. Sur la base des profils d'expression des marqueurs de différenciation, il est plausible que la cellule la plus précoce du NB est une cellule de la crête neurale spécifique à la lignée sympatho-surrénalienne qui n'a pas reçu ou répondu aux signaux qui déterminent le destin cellulaire <sup>6</sup> (Figure 1).

Au bout de 5 semaines de développement humain, la cellule de la crête neurale migrant vers ses sites définitifs et déclenche un programme transcriptionnel qui spécifie les propriétés neuronales et catécholaminergiques des ganglions sympathiques primaires en expansion <sup>9</sup>. PHOX2B (*Paired-like homeobox 2b*) entraîne l'expression d'enzymes pour la biosynthèse des catécholamines et initie un programme transcriptionnel secondaire, qui contrôle la différenciation sympatho-surrénale terminale <sup>6</sup>. Les mutations de la lignée germinale hétérozygote de PHOX2B seraient, par ailleurs, associées à un sous-ensemble de NB familiaux <sup>10,11</sup>.

Les protéines LIN28A et LIN28B (*Lin-28 homolog A/B*) seraient quant à elles en charge de contrôler la synchronisation du développement et la croissance cellulaire au cours de l'engagement des lignées résultantes des cellules de la crête neurale <sup>12</sup>. L'expression ciblée de LIN28B dans la crête neurale en développement chez des souris transgéniques induit le NB <sup>13</sup>. LIN28B est connu pour être crucial dans le maintien du caractère souche tout au long du développement embryonnaire, et cette fonction pourrait maintenir le phénotype des neuroblastes indifférenciés <sup>13,14</sup>. Ainsi la fonction de LIN28B dans la neurogenèse est en accord avec un

modèle d'initiation du NB qui nécessite une régulation aberrante des protéines du développement.

Enfin, la tyrosine kinase ALK (*Anaplastic lymphoma kinase*) joue un rôle clé dans le développement précoce sympatho-adrénérique pour protéger la croissance des neuroblastes *in utero* contre la privation de nutriments. Les mutations germinales et somatiques de ALK qui provoquent l'activation constitutive de la kinase sont présentes dans 8 à 10% des cas de NB et sont associées à un mauvais pronostic <sup>15</sup>.

## 1.2 Épidémiologie

Le NB est le cancer solide extra-crânien le plus fréquent représentant environ 8-10% des cancers pédiatriques et jusqu'à 15% des décès par cancer dans cette catégorie d'âge. L'incidence du NB est estimée à 10,5 cas par million d'enfants de moins de 15 ans en Amérique du Nord et en Europe <sup>16,17</sup>. La maladie survient généralement chez le jeune enfant avec une majorité de cas diagnostiqués avant l'âge de 5 ans <sup>18,19</sup>. L'âge médian des patients au diagnostic est de 17 à 19 mois <sup>3,20</sup>. Il survient un peu plus fréquemment chez les garçons que chez les filles.

Des études nationales de dépistage systématique à grande échelle chez les nourrissons par l'évaluation des taux urinaires de catécholamines ont permis de diagnostiquer le NB chez un plus grand nombre d'enfants. Cependant, la plupart des tumeurs détectées étaient de faible risque, avec des caractéristiques cliniques et biologiques favorables <sup>21-23</sup>. Le dépistage des nourrissons asymptomatiques n'a pas permis d'augmenter les taux de détection du NB à haut risque qui se manifeste habituellement à un âge plus avancé.

Des cas de NB familiaux ont été rapportés chez 1 à 2% des patients. Ce résultat suggère que les taux de mutations oncogéniques de la lignée germinale chez les patients atteints de NB sont faibles <sup>24</sup>. Ces cas de NB familiaux se présentent souvent avec des tumeurs primaires surrenaliennes multifocales ou bilatérales et sont diagnostiquées à un âge médian de 9 mois. Même si des anomalies génétiques de PHOX2B ont été initialement rapportées, les mutations germinales de ALK sont responsables de la majorité des cas héréditaires <sup>3,20</sup>.

### 1.3 Présentation clinique

Les caractéristiques cliniques du NB sont très variables et dépendent du site de la tumeur primaire, de l'étendue de la maladie métastatique et de la présence de syndromes paranéoplasiques associés.

Le NB peut, en effet, apparaître n'importe où dans le système nerveux sympathique bien que la majorité des tumeurs primaires se localisent dans la glande médullosurrénale. Les masses tumorales s'infiltrant souvent dans les structures locales et entourent les nerfs ou les vaisseaux vitaux tels que l'axe de l'artère coéliquaie<sup>5</sup>. Les métastases surviennent dans plus de 50% des cas et sont typiquement retrouvées dans les ganglions lymphatiques régionaux, dans la moelle osseuse, dans le foie et dans les tissus sous-cutanés<sup>25</sup>. Le NB métastasé au foie chez les jeunes enfants (moins de 18 mois) atteints de tumeurs de stade 4S constitue un groupe unique chez qui une régression complète peut se produire sans intervention médicale<sup>26</sup>.

Le NB peut être découvert fortuitement lors du dépistage chez les nourrissons ou les enfants. Des symptômes non spécifiques tels que la douleur et des malaises peuvent accompagner une maladie à un stade précoce. Dans de rares cas, l'augmentation de la noradrénaline ou de l'adrénaline sécrétée par les tumeurs peut entraîner une hypertension artérielle. Les tumeurs thoraciques peuvent se présenter comme des cancers découverts par hasard lors de radiographies thoraciques<sup>5</sup>. Des symptômes dus à la compression d'organes tels que la constipation ou la rétention urinaire caractérisent les NB situés au niveau abdominal. En revanche, les enfants atteints d'une maladie métastatique étendue présentent des symptômes de plus grande gravité. Une ecchymose périorbitaire caractéristique (yeux de raton laveur) est observée chez les enfants atteints de NB métastatique dans les régions orbitaires. Une minorité de cas peut présenter une diarrhée aqueuse abondante secondaire à des tumeurs sécrétant le peptide intestinal vasoactif (VIPomas)<sup>5</sup>.

## **1.4 Diagnostic et facteurs de pronostic**

### **1.4.1 Diagnostic**

Lorsque le NB est suspecté, des tests de laboratoire, d'imagerie radiographique et d'évaluation histologique de la tumeur sont réalisés. Le stade et la biologie de la tumeur sont déterminés et les patients sont stratifiés pour recevoir un traitement adapté selon leur niveau de risque.

#### **1.4.1.1 Tests de laboratoire de diagnostic.**

Les catécholamines et les métabolites de catécholamines, y compris la dopamine, l'acide homovanillique (HVA) et/ou l'acide vanillylmandélique (VMA), sont dosés dans l'urine. Un niveau élevé de ces composés est observé dans 90% des cas de NB. Les quantités de métabolites de la catécholamine dans l'urine sont corrélées au degré de différenciation cellulaire des cellules tumorales dérivées de la crête neurale. Des taux élevés de dopamine ou un rapport HVA/VMA sont associés à une maladie défavorable<sup>27</sup>. Des niveaux élevés de catécholamines associés à des tests en pathologie qui révèlent la présence de petites cellules rondes bleues typiques dans les tumeurs ou la moelle osseuse après coloration à l'hématoxyline et l'éosine (HE) sont considérés comme suffisants pour confirmer le diagnostic de NB<sup>1</sup>.

#### **1.4.1.2 Imagerie radiographique et évaluation métastatique.**

Une imagerie étendue est requise pour la stratification, la caractérisation de la tumeur et la planification chirurgicale. Celle-ci comprend l'évaluation radiologique de la tumeur primaire et des métastases ostéo-médullaires et/ou des tissus mous. Bien que l'échographie soit fréquemment la première modalité d'imagerie utilisée pour le NB en raison de son accessibilité et de son caractère non invasif, une évaluation locale supplémentaire nécessite l'imagerie par tomodensitométrie ou par IRM<sup>1</sup>.

Les tumeurs sont souvent de densité hétérogène et présentent fréquemment des calcifications et une atteinte régionale des ganglions lymphatiques. L'imagerie radiographique peut être utilisée pour définir les facteurs de risque pour l'exérèse chirurgicale de la tumeur et permet la stratification de la tumeur. En effet, l'imagerie décrit l'extension locale de la tumeur

primaire, qui peut consister en une atteinte périvasculaire avec un enveloppement artériel, une infiltration de tissus et d'organes adjacents (comme les reins ou le foie) et une infiltration de l'espace épidural du canal rachidien <sup>28</sup>.

L'étendue de la maladie métastatique est quant à elle évaluée par un scanner de métabiodobenzylguanidine (MIBG), qui utilise un radio-marqueur appelé, MIBG (une molécule ayant une structure similaire à la noradrénaline et se lie spécifiquement aux neuroblastes qui expriment le transporteur de la noradrénaline). L'iode-123 (I123) est préféré à l'utilisation de l'I131 pour le radio-marquage du MIBG car il a une dose de rayonnement plus faible, une demi-vie plus courte, produit des images de meilleure qualité et a une toxicité thyroïdienne inférieure à l'I131 <sup>29</sup>. Des méthodes semi-quantitatives de score basées sur la MIBG sont actuellement évaluées pour leur signification pronostique au diagnostic de NB et pendant le suivi <sup>30</sup>.

#### **1.4.1.3 Évaluation histologique**

La biopsie de la tumeur et/ou de la moelle osseuse confirme le diagnostic et fournit d'importantes informations sur le pronostic. Le NB se différencie des autres tumeurs neuroectodermiques par des critères morphologiques et immunohistochimiques tels que l'expression de la tyrosine hydroxylase (TH), du facteur de transcription PHOX2B, de NB84, de PGP 9.5 (*protein gene product*), de la synaptophysine ou encore du GD2 (Disialoganglioside) <sup>31,32</sup>. Les tumeurs neuroectodermiques telles que le NB, le ganglioneurome (GN) et le ganglioneuroblastome (GNB), ont des niveaux de maturation différents. Les cellules de NB sont principalement immatures alors qu'un ganglioneurome est composé de cellules matures et différenciées. Un ganglioneuroblastome est quant à lui composé de cellules tumorales immatures et matures <sup>18</sup>.

#### **1.4.2 Stratification des patients : facteurs de pronostic**

Étant donné l'hétérogénéité biologique et clinique du NB, la stratification des patients est essentielle afin de déterminer le pronostic et le traitement. Les stratégies de traitement sont adaptées selon la réponse anticipée au traitement et les risques de rechute. Le défi est donc d'identifier quels sont les patients qui peuvent bénéficier d'une thérapie réduite ou au contraire ceux qui nécessitent une thérapie intensifiée.

Plusieurs systèmes de stratifications des patients atteints de NB ont été développés. Le premier système est basé sur des critères standards de diagnostic, INSS (*International Neuroblastoma Staging System*)<sup>33,34</sup>. Les tumeurs de Stade 1 sont localisées et complètement excisées sans atteinte ganglionnaire. Les tumeurs partiellement réséquées ou présentant une implication des ganglions homolatérales sont soit des Stades 2A ou des Stades 2B. Les tumeurs de Stade 3 sont de grandes tumeurs qui traversent la ligne médiane, des tumeurs non résécables au moment du diagnostic, ou celles qui ont une atteinte ganglionnaire controlatérale. Les métastases à distance caractérisent les tumeurs de Stade 4. Les tumeurs de Stade 4S sont un sous-ensemble unique limité aux nourrissons de moins de 1 an avec une maladie métastatique limitée à la peau, au foie et à la moelle osseuse.

Un groupe européen nommé *The International Neuroblastoma Risk Group Task Force* a établi des critères de classification qui tiennent compte des risques chirurgicaux évalués par l'imagerie (*Image-defined risk factors / IDRF*) et les ont incorporés dans une nouvelle classification, *International Neuroblastoma Risk Group Staging System / INRGSS*<sup>28</sup> (Tableau I). Dans l'INRGSS, l'étendue de la maladie locorégionale est déterminée par la présence ou l'absence d'IDRF. Les tumeurs localisées qui sont confinées dans un seul compartiment et n'impliquant pas des structures vitales ou des vaisseaux sanguins majeurs sont classées comme L1 et sont typiquement réséquées en amont. Les tumeurs L2 ont un ou plusieurs IDRFs qui impliquent soit une continuité ipsilatéral de différents compartiments ou des structures vitales. Le stade M représente une maladie avec des métastases à distance alors que le stade MS est limité aux enfants de moins de 18 mois avec des métastases à distance.

**Tableau I - Système de classification préopératoire – *International Neuroblastoma Risk Group Staging System (INRGSS)***

| Stade | Critères                                                                                                     |
|-------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| L1    | Tumeur localisée qui n'implique aucune structure vitale ou adjacente sans IDRF                               |
| L2    | Tumeur locorégionale avec $\geq 1$ IDRF                                                                      |
| M     | Métastases à distance                                                                                        |
| MS    | Maladie métastatique chez l'enfant < 18 mois (métastases limitées à la peau, au foie et à la moelle osseuse) |

IDRF: Image-defined risk factors. *Tableau reproduit de Monclair, T., et al 2009*<sup>28</sup>

L'INRGSS est désormais utilisé parce qu'il offre l'avantage de stratification du traitement basée sur un diagnostic d'imagerie préopératoire objectif, plutôt que des approches opératoires variables. De plus, il fait maintenant partie de l'un des sept facteurs pronostiques dans le système de classification internationale INRG (*International Neuroblastoma Risk Group*) qui définit le prétraitement des cohortes de patients au moment du diagnostic<sup>35</sup> (Tableau II). Le système de classification INRG comprend le stade INRGSS, l'âge du patient, l'histologie, le grade de la tumeur, le statut MYCN, l'état d'altération 11q et la ploïdie de l'ADN.

**Tableau II - Système de classification – *International Neuroblastoma Risk Group (INRG)***

| Stade INRG | Age (mois) | Catégorie histologique | Grade       | MYCN                                    | 11q | Ploïdie      | Groupe de risque |               |
|------------|------------|------------------------|-------------|-----------------------------------------|-----|--------------|------------------|---------------|
| L1/L2      |            | GN, GNB mixte          |             |                                         |     |              | Très bas         |               |
| L1         |            | Aucun excepté GN/GNB   |             | NA                                      |     |              | Très bas         |               |
|            |            |                        |             | Amp                                     |     |              | Haut             |               |
| L2         | < 18       | Aucun excepté GN/GNB   | Différencié | NA                                      | Non |              | Bas              |               |
|            |            |                        |             |                                         | Oui |              | Intermédiaire    |               |
|            | ≥ 18       | GNB nodulaire, NB      |             | Pauvrement différencié ou indifférencié | NA  | Non          |                  | Bas           |
|            |            |                        |             |                                         |     | Oui          |                  | Intermédiaire |
| M          | < 18       |                        |             | NA                                      |     | Hyperploïdie | Bas              |               |
|            | < 12       |                        |             | NA                                      |     | Diploïdie    | Intermédiaire    |               |
|            | 12 à < 18  |                        |             | NA                                      |     | Diploïdie    | Intermédiaire    |               |
|            | < 18       |                        |             | Amp                                     |     |              | Haut             |               |
|            | ≥ 18       |                        |             |                                         |     |              | Haut             |               |
| MS         |            |                        |             | NA                                      | Non |              | Très bas         |               |
|            |            |                        |             |                                         | Oui |              | Haut             |               |
|            |            |                        |             | Amp                                     |     |              | Haut             |               |

GN, Ganglioneurome; GNB, Ganglioneuroblastoma; NA, non amplifié; Amp, Amplifié. *Tableau reproduit de Cohn, S. et al. 2009*<sup>35</sup>.

### 1.4.2.1 Facteurs pronostic histologiques

Le NB est caractérisé par la présence de neuroblastes, cellules dont la maturation peut varier de la forme la plus immature (petites cellules rondes et bleues) jusqu'à la forme la plus mature (cellules ganglionnaires). Les neuroblastes se colorent positivement pour l'énolase spécifique des neurones (*neuron specific enolase / NSE*), la tyrosine hydroxylase, la synaptophysine et le NB84 (Figure 2)<sup>36</sup>. L'analyse microscopique distinguera également les pseudo-rosettes caractéristiques de Homer Wright autour des vaisseaux sanguins. Le système de classification histopathologique Shimada de 1984 est le système de classification le plus largement utilisé qui distingue les groupes cliniques favorables et défavorables<sup>37</sup>. Le système international de classification INPC (*International Neuroblastoma Pathology Classification System*)<sup>38</sup> a été développé sur la base du système Shimada où l'histologie favorable se distingue de l'histologie défavorable par l'âge, les caractéristiques morphologiques de la différenciation neuroblastique, le développement stromal Schwannien et de l'indice cellulaire de mitose et de karyorexix (MKI) (Tableau III).

Le NB se différencie de certaines tumeurs d'origine neuroectodermique par deux principales composantes, à savoir les cellules neuroblastiques - avec différents degrés de différenciation - et les cellules de Schwann, en proportions variables.

Ces tumeurs sont affectées à l'une des quatre catégories suivantes :

1. Le NB (pauvre en stroma schwannien) : Par définition, la proportion de tissu tumoral présentant une histologie riche en stroma ne doit pas dépasser 50%. Trois sous-types sont alors distingués : 1-NB indifférencié : constitué de neuroblastes indifférenciés sans neuropiles discernables et dans lequel des techniques complémentaires (immunohistochimie, microscopie électronique et / ou cytogénétique) sont habituellement nécessaires pour établir le diagnostic. 2-NB peu différencié : défini comme une tumeur au moins avec des foyers de neuropiles identifiables. 3-NB



différencié : une tumeur avec 5% ou plus des cellules tumorales montrant une différenciation synchrone (nucléaire et cytoplasmique) vers les cellules ganglionnaires.

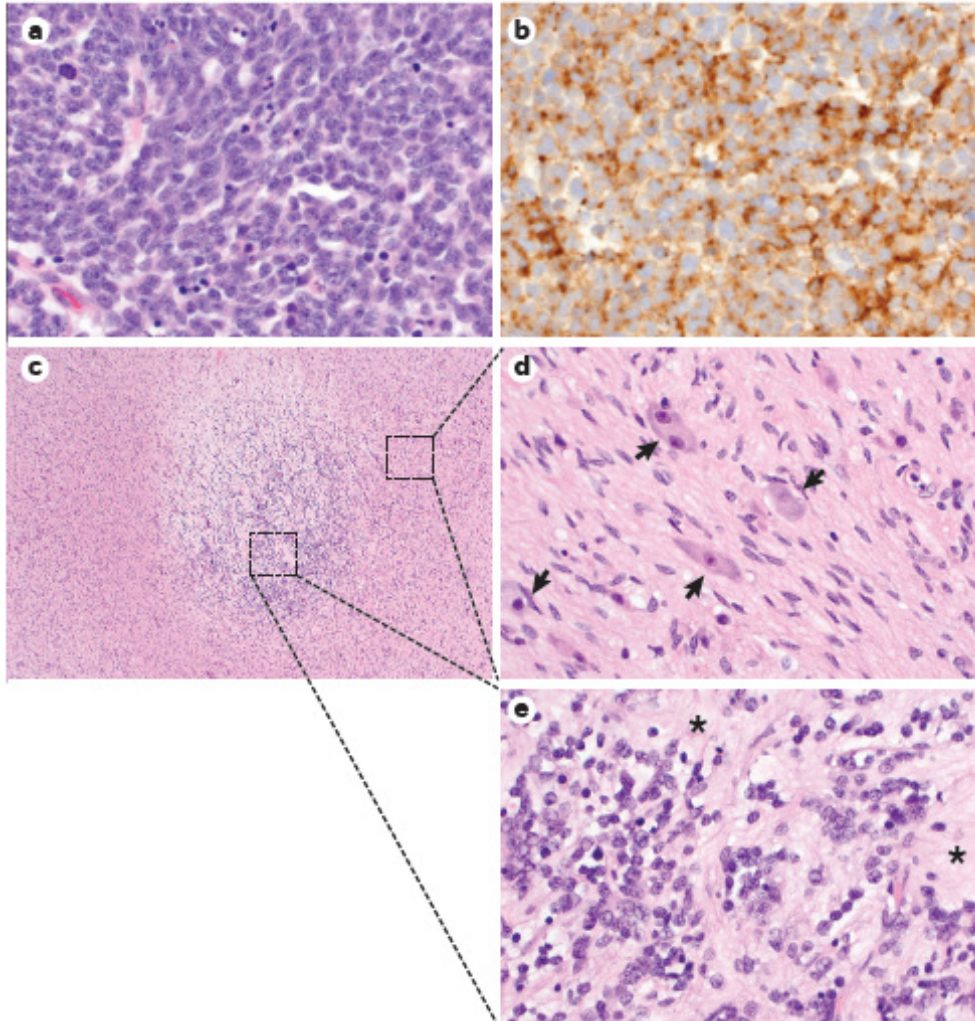
| Type de tumeur                                          | Histologie                                                             | Classification originale de Shimada         | Groupe pronostic |
|---------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------|------------------|
| <b>Neuroblastoma</b>                                    |                                                                        |                                             |                  |
| <b>Favorable</b>                                        | (Pauvre en stroma schwannien)                                          |                                             |                  |
| <b>&lt;1.5 ans</b>                                      | Peu différencié ou différencié avec un indice MKI bas ou intermédiaire | Pauvre en stroma (Favorable)                | Favorable        |
| <b>1.5 – 5 ans</b>                                      | Différencié et indice MKI bas                                          |                                             |                  |
| <b>Non favorable</b>                                    |                                                                        |                                             |                  |
| <b>&lt;1.5 ans</b>                                      | a) Tumeur non différenciée<br>b) Indice MKI élevé                      |                                             |                  |
| <b>1.5 – 5 ans</b>                                      | a) Non- ou peu différenciée<br>b) Indice MKI intermédiaire ou élevé    | Non favorable                               | Non favorable    |
| <b>&gt;5 ans</b>                                        | Toutes les tumeurs                                                     |                                             |                  |
| <b>Ganglioneuroblastome mélangé</b>                     | Riche en stroma schwannien                                             | Mélangé (riche en stroma de Schwann)        | Favorable        |
| <b>Ganglioneurome (Mature ou en voie de maturation)</b> | Stroma schwannien dominant                                             | Ganglioneurome bien différencié (Favorable) | Favorable        |
| <b>Ganglioneuroblastome nodulaire</b>                   | Stroma composite riche et pauvre                                       | Nodulaire riche en stroma                   | Non favorable    |

**Tableau III - Système de classification histologique – *International Neuroblastoma Pathology Classification (INPC)***

Tableau reproduit de *Shimada, H. et al, 1999*<sup>38</sup>.

- 2 Le ganglioneuroblastome mélangé (riche en stroma de Schwann) (GNB) : une tumeur dans laquelle des nids microscopiques bien définis de cellules neuroblastiques sont mélangés, ou distribués aléatoirement, dans une composante ganglionnaire (Figure 2). Les nids sont

constitués de cellules neuroblastiques à divers stades de différenciation - généralement des neuroblastes différenciés et des cellules ganglionnaires en cours de maturation.



## Figure 2 | Caractéristiques histologiques du NB

**a.b.** Biopsie d'un NB non différencié d'un patient de 3 ans au moment du diagnostic. **a.** Le NB est composé de petites cellules bleues rondes immatures avec des noyaux hyperchromatiques caractéristiques des cellules cancéreuses. Le MKI est élevé (>4%). **b.** L'immunohistochimie montre que les cellules de NB sont positives pour la synaptophysine. **c-e,** Biopsie provenant d'un patient âgé de 12 ans diagnostiqué avec un GNB mélangé. La région centrale montre une histologie indicative d'un NB (**partie c**), avec des régions périphériques indicatives d'un GN (les flèches indiquent des cellules ganglionnaires matures, **partie d**). Des foyers neuropiles sont aussi observés (**partie e**). Grossissement : (a,d et e: x400) et (c: x40). GN, Ganglioneurome ; GNB, Ganglioneuroblastome ; MKI, indice cellulaire de mitose et de karyorrexis. *Illustration reproduite de Matthay, K., et al 2016*<sup>1</sup>.

- 3 Le ganglioneurome (stroma schwannien dominant) (GN) : est constitué d'une composante stromale schwannienne prédominante avec des cellules ganglionnaires complètement différenciées ou en voie de maturation.
- 4 Le ganglioneuroblastome nodulaire (à stroma composite riche et pauvre, classique ou variant) : caractérisé par la présence d'un ou plusieurs nodules microscopiques de NB pauvre en stroma dans un contexte de composant riche en stroma ou dominant. Le terme "composite" implique que la tumeur est composée de clones biologiquement différents.

#### **1.4.2.2 Facteurs de pronostic moléculaires**

La biologie moléculaire des tumeurs est également évaluée au diagnostic et est couramment utilisée pour l'obtention d'informations pronostiques en raison de l'influence des caractéristiques génétiques.

##### **1. L'indice ADN**

L'indice d'ADN ou la ploïdie est utilisé pour l'attribution des risques et constitue un indicateur important du succès du traitement. En effet, l'indice ADN est la quantité d'ADN contenu dans le noyau des cellules tumorales déterminée par analyse cytogénétique. La triploïdie ou l'hyperploïdie (indice d'ADN > 1) sont des altérations chromosomiques qui prédisent une meilleure réponse à la chimiothérapie<sup>39,40</sup>. Dans ce cas, l'augmentation du contenu d'ADN est causée par des défauts de la mitose qui conduisent à des gains chromosomiques sans anomalies segmentaires<sup>41,42</sup>.

##### **2. Anomalies chromosomiques**

Les tumeurs diploïdes sont caractérisées par des anomalies chromosomiques segmentaires et sont associées à une maladie réfractaire<sup>40,43</sup>.

### ***Amplification du gène MYCN***

MYCN fait partie de la famille des facteurs de transcription MYC qui régulent plusieurs processus cellulaires, y compris la prolifération, le cycle cellulaire, la glycolyse, la glutaminolyse, les fonctions mitochondriales et la biogenèse <sup>44,45</sup>. Le gène *MYCN* sur le chromosome 2p24 a été découvert en 1983 dans des lignées de cellules de NB humain par Schwab et ses collègues et est alors appelé *MYCN* <sup>46</sup>. On observe une amplification du gène *MYCN* (augmentation du nombre de copies du gène) dans au moins 20% des NB et environ 40% des NB à haut risque <sup>35,47,48</sup>. L'expression de *MYCN* est essentielle pour le développement prénatal normal du système sympathique et est présente jusqu'à quelques semaines après la naissance <sup>49</sup>. Les amplifications du gène *MYCN* sont par ailleurs responsables de l'augmentation de la croissance tumorale, la prolifération et le développement du NB <sup>50</sup>.

### ***Altérations chromosomiques***

Les aberrations chromosomiques segmentaires (gains ou pertes de fragments chromosomiques) peuvent également être utilisées pour évaluer l'agressivité des NB. La perte des chromosomes 1p, 3p, 4p, 14q, 16p et 19q ou le gain des chromosomes 1q, 2p, 7q, 9p, 11p, 12q et 17q sont observés dans le NB <sup>51,52</sup>. Parmi eux, la délétion des chromosomes 1p et 11q et le gain de 17q sont les altérations chromosomiques les plus fréquentes dans la maladie à haut risque <sup>53,54</sup>. Le groupe international de NB (INRG) a analysé une cohorte de 8 800 enfants diagnostiqués avec un NB et a montré que les délétions de 1p ou 11q et le gain de 17q sont significativement associés à un mauvais pronostic <sup>35</sup>.

- Altération du chromosome 1p

La perte d'hétérozygotie (*Loss of heterozygosity/LOH*) au chromosome 1p survient dans 30 à 35% des cas de NB. En outre, LOH 1p est fréquemment trouvé dans les NB défavorables et est associée à l'amplification *MYCN* <sup>55,56</sup>. Une LOH à la bande chromosomique 1p36 est associée à un mauvais pronostic chez les patients atteints de NB <sup>57</sup>. De ce fait, une LOH fréquente sur le chromosome 1p soulève la possibilité que cette région contienne des gènes suppresseurs de tumeurs et que la perte de ces gènes suppresseurs de tumeurs contribue à la tumorigenèse. En accord avec cette hypothèse, la réintroduction du chromosome 1p dans le NB induit une différenciation et une mort cellulaire <sup>58</sup>.

- Altération du chromosome 11q

La perte allélique du chromosome 11q se produit dans environ 33-43% des patients NB et est associée à un mauvais pronostic. La suppression de 11q est inversement associée à la délétion 1p et à l'amplification de *MYCN* et en fait par conséquent un biomarqueur pour les tumeurs agressives chez les patients ne présentant pas une amplification *MYCN*<sup>57,59,60</sup>.

- Altération du chromosome 17q

Le gain chromosomique au niveau du bras du chromosome distal 17q (17q21-qter) est l'aberration la plus souvent retrouvée dans les NB et se produit dans 50-70% des tumeurs. Le gain de 17q est fréquemment associé à une 1p LOH, à une 11q LOH, à l'amplification du gène *MYCN*, à l'âge avancé et un stade avancé<sup>61</sup>.

### 3. Mutations génétiques

#### *ALK*

Le séquençage de nouvelle génération d'échantillons de NB a permis d'identifier des mutations germinales dans le gène *ALK* dans la plupart des NB familiaux ainsi que des mutations somatiques dans 14% des NB à haut risque<sup>15,62,63</sup>. *ALK* est exprimé dans le système nerveux central et périphérique et joue un rôle critique au cours du développement du système nerveux<sup>64</sup>. Contrairement à d'autres cancers dans lesquels des translocations du gène *ALK* ont été observées<sup>65,66</sup>, aucune fusion du gène *ALK* n'a été mise en évidence dans le NB. Seules des mutations ponctuelles et des amplifications conduisant à une surexpression aberrante d'*ALK* ont été observées dans le NB<sup>67</sup>. Les mutations germinales découvertes comprennent R1275Q, R1192P, G1128A, T1151M, T1087I<sup>62,68</sup>, et, dans de rares cas, les mutations F1245V et F1174V<sup>69</sup>. La majorité de ces mutations se situent dans le domaine d'activation de la kinase F1174, R1245 et R1275 représentent 85% des mutations somatiques retrouvées dans les NB sporadiques<sup>63</sup>. Ces mutations sont corrélées avec de faible taux de survie<sup>13</sup>. Des études ont montré que le *knockdown* des mutants *ALK* ou un traitement avec un inhibiteur d'*ALK*, inhibe la prolifération cellulaire du NB<sup>70,71</sup>. Ce résultat suggère qu'*ALK* a un rôle oncogénique dans le développement du NB.

En raison de leurs emplacements similaires sur 2p, *ALK* et *MYCN* peuvent être co-amplifiés. De plus, la co-expression du mutant *ALK*, F1174L, et *MYCN* accélère l'apparition du NB et augmente la pénétrance tumorale en comparaison avec l'amplification *MYCN* seule suggérant un effet de coopération entre ces deux oncogènes <sup>72,73</sup>. Ceci peut être expliqué en raison de l'activation de la signalisation PI3K (phosphoinositide 3-kinase) médiée par *ALK* et conduisant à la stabilisation de la protéine *MYCN*. *ALK* active également la voie de *RAS*, ce qui conduit à l'activation de la voie *MAPK* (*Mitogen-activated protein kinases*). La voie *MAPK* est fréquemment activée dans les NB en rechute <sup>74,75</sup>.

### ***PHOX2B***

Une majorité de patients avec une anomalie congénitale des cellules dérivées de la crête neurale comme le syndrome d'hypoventilation alvéolaire centrale congénitale (*congenital central hypoventilation syndrome / CCHS*) portent des mutations dans le gène *PHOX2B*. Le NB est plus fréquent chez ces patients <sup>76,77</sup>, suggérant que *PHOX2B* peut être associé à la tumorigenèse du NB. L'analyse de la séquence d'ADN a montré que les mutations germinales du gène *PHOX2B* sont présentes dans 6,4% des NB familiaux <sup>78</sup>. *PHOX2B* régule directement la transcription du gène *ALK* dans le NB ce qui suggère un lien direct entre ces deux voies dans les NB familiaux <sup>79</sup>. Les mutations germinales hétérozygotes qui ont été décrites dans le NB sont R100L, R141G. L'introduction d'une mutation dérivée de patient dans le locus *phox2b* chez la souris récapitule les caractéristiques cliniques de l'CCHC, mais n'a pas induit le développement du NB <sup>80</sup>, suggérant que les mutations de *PHOX2B* seules ne sont pas suffisantes pour induire la tumorigenèse du NB. Ainsi, *PHOX2B* peut être considéré comme un gène de prédisposition au NB <sup>11</sup>.

D'autres gènes, tels que *TP53*, *EZH2*, *SDHB*, *PTPN11*, *HRAS* et *NF1*, peuvent être considérés comme des gènes candidats dans la prédisposition au NB mais ces cas sont très rares <sup>60</sup>.

### ***ATRX***

Une étude d'association pangénomique (*Genome Wide Association Study / GWAS*) de 40 tumeurs de NB et une validation ultérieure du séquençage de 60 tumeurs de NB ont montré que des mutations dans le gène *ATRX* (*alpha thalassemia/mental retardation syndrome X-linked*

*gene*) sont présentes chez environ 10% des NB. Ces mutations sont plus particulièrement fréquentes chez les patients plus âgés <sup>81</sup>. En fonction de l'âge, les mutations du gène *ATRX* sont retrouvées dans 44% des tumeurs de patients adolescents et des jeunes adultes ( $\geq 12$  ans), dans 17% des tumeurs d'enfants (18 mois à  $< 12$  ans) et 0% des tumeurs de nourrissons (0 à  $< 18$  mois) <sup>82</sup>. D'autres études sont nécessaires pour déterminer l'impact pronostique des mutations du gène *ATRX* sur la survie.

#### 4. Épigenétique

L'accumulation d'altérations génétiques et épigénétiques est à l'origine de nombreux cancers <sup>83</sup>. La régulation épigénétique de l'expression des gènes est contrôlée par la méthylation de l'ADN, la modification des histones, et les changements dans la constitution, la conformation et la structure des nucléosomes. Des altérations épigénétiques ont été associées avec certains sous-types de NB tels que les NB présentant des mutations du gène *ATRX* qui code pour un régulateur épigénétique <sup>82,84</sup>.

L'hyperméthylation des îlots CpG dans les promoteurs de gènes induit l'inactivation des gènes. Des techniques de MBD (*Methyl-CpG-binding domain sequencing*) et MSP (*methylation-specific PCR*) ont déterminé une signature de méthylation de 58 promoteurs qui permet de prédire le taux de survie sans complication (EFS/ *Event-Free Survival*) chez les patients atteints de NB <sup>85</sup>. Ceci est cohérent avec d'autres rapports où l'hyperméthylation est associée à divers groupes de risques dans le NB <sup>86,87</sup>. Dans le NB, les gènes les plus souvent inactivés par hyperméthylation du promoteur sont *RASSF1A* (*Ras association domain family 1 isoform A*), un gène suppresseur de tumeur qui interfère avec la voie de signalisation RAS <sup>88</sup>, et *CASP8*, un suppresseur de tumeur important dans la voie de l'apoptose médiée par les récepteurs de la mort cellulaire <sup>89</sup>. D'autres gènes méthylés dans le NB comprennent *CHD5*, *p14ARF*, *p16INK4a*, *CCND2*, *RARB*, *TP73*, *RB1*, *DAPK1*, *HOXA9*, *TMS1*, *THBS1*, *MGMT* et *TIMP-3* <sup>86,90,91</sup>. Beaucoup de ces gènes sont impliqués dans les voies d'apoptose. L'inactivation de ces gènes peut contribuer à la résistance à la chimiothérapie ou la rechute des tumeurs de NB.

Les modifications des histones telles que l'acétylation, la méthylation, l'ubiquitination et la phosphorylation modifient la structure de la chromatine et affectent l'accessibilité des facteurs de transcription à l'ADN. Dans le NB, la majorité des membres de la famille des histones déacétylases (HDAC) sont détectables, et certains d'entre eux sont anormalement surexprimés<sup>92</sup>. Parmi ces HDAC, une expression élevée de HDAC8 est corrélée avec un faible taux de survie chez les patients atteints de NB. Le *Knockdown* de certains membres de la famille HDAC dans les cellules de NB mène à la différenciation cellulaire ou l'apoptose, et les inhibiteurs des HDAC inhibent la croissance tumorale<sup>93-95</sup>. Les membres de la famille HDAC sont donc des candidats-cibles pour la thérapie contre le NB, mais le manque de spécificité des inhibiteurs des HDAC peut induire une grande toxicité de ces molécules.

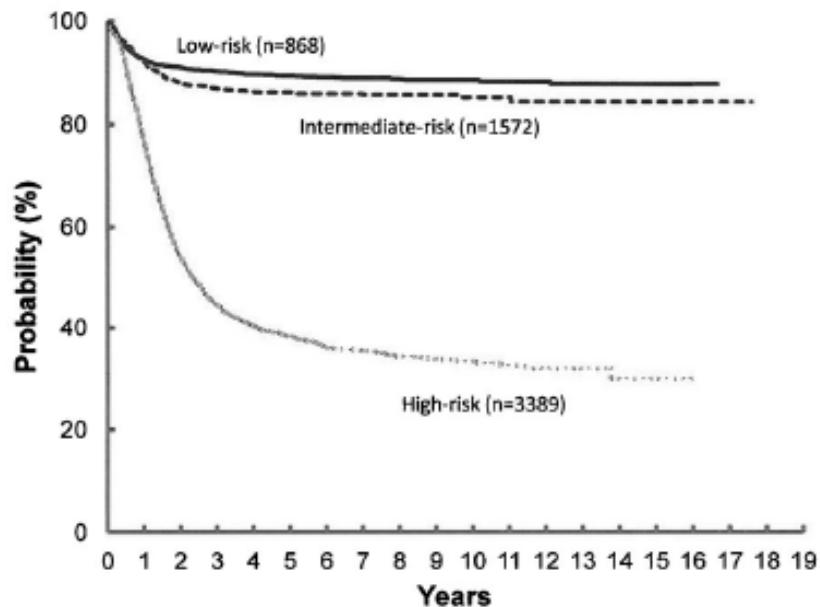
L'expression aberrante d'autres modificateurs épigénétiques affectant la méthylation des histones et le remodelage de la chromatine a également été observée dans le NB: la LSD1 (*lysine-specific demethylase*) et BMI-1 (*the polycomb repressive complex1 (PRC1) subunit BMI-1*) sont surexprimés dans les tumeurs peu différenciées, et la sous-expression de LSD1 ou BMI-1 induit la différenciation cellulaire du NB<sup>96</sup>. CHD5 (*1p36 tumor suppressor gene*), une protéine à chromodomaine qui joue un rôle dans le remodelage des nucléosomes complexes est désactivée à la fois par la méthylation de l'ADN dans son promoteur et dans la perte d'hétérozygotie 1p (LOH) dans certains cas de NB. La restauration de CHD5 inhibe la croissance tumorale<sup>97</sup>. Comme dans d'autres types de cancer, des niveaux élevés de la méthyl transférase EZH2 ont été décrits dans le NB indifférencié. EZH2 est responsable de la méthylation au niveau de H3K27 de gènes suppresseurs de tumeurs dans le NB tels que *CASZ1*, *NGFR* et *CLU*, conduisant à l'inactivation de ces gènes<sup>98</sup>.

Ces études indiquent que les altérations de l'épigénome participent à la physiopathologie du NB. Les enzymes qui régulent l'épigénome sont donc de nouvelles cibles thérapeutiques pour le traitement du NB. Cependant, l'expression ubiquitaire de ces cibles pose un problème de spécificité du traitement et peut être à l'origine d'effets secondaires et de toxicité importants.



## 1.5 Traitements du NB

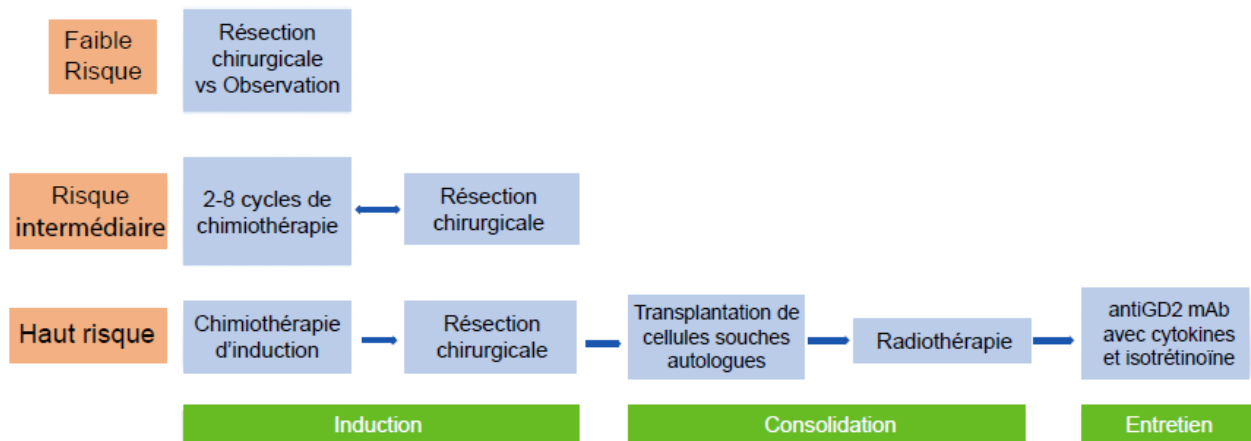
En Amérique du Nord, la plupart des patients sont traités suivant des protocoles conçus par le COG (*the National Cancer Institute–funded cooperative group, the Children’s Oncology Group*). En effet, pour déterminer une stratégie de traitement optimale, le COG adopte la stratification des groupes à risque en combinant le stade INSS / INRGSS avec l’âge au diagnostic, les résultats histologiques ainsi que la biologie et la génétique de la tumeur. Le patient est ensuite placé dans un groupe à risque faible, intermédiaire ou élevé. L’intensité et la durée du traitement sont adaptées à chacun de ces groupes<sup>99</sup>. Pour beaucoup de patients atteints de NB, cette stratification du risque et la détermination du traitement a été couronnée de succès. En effet, les résultats pour les enfants à risques faible et intermédiaire ont été excellents, avec environ 90% de taux de survie sans complication à long terme. Cependant, le taux de survie pour les enfants atteints de NB à haut risque est de moins de 50%<sup>20</sup> (Figure 3). Une récente étude du COG révèle un taux de survie EFS à 4 ans de 54,5% (ANBL0032 – Rapport COG2018)<sup>100</sup>.



**Figure 3 | Courbe de survie des patients atteints de NB selon le groupe de risque**

Les patients avec une maladie à haut risque présentent un mauvais taux de survie sans complication comparé aux patients à risque faible ou intermédiaire. *Illustration reproduite de Park et al. 2013*<sup>101</sup>.

Les objectifs du COG sont de minimiser les complications chirurgicales et de réduire la toxicité de la chimiothérapie, en particulier chez les patients ayant un pronostic favorable (Figure 4). En revanche, le traitement des tumeurs à haut risque a évolué vers l'intensification de la thérapie au cours des deux dernières décennies. Effectivement, les tumeurs les plus localisées avec des caractéristiques biologiques favorables répondent bien à la résection chirurgicale de la tumeur. Les récurrences locales peuvent également être traitées avec une chirurgie, alors que de rares récurrences métastatiques nécessitent une chimiothérapie et dans certains cas la radiothérapie. Cependant, pour les tumeurs cliniquement agressives et à haut risque qui sont relativement résistantes à la chimiothérapie et à la radiothérapie, le traitement consiste en une approche divisée en 3 phases : l'induction, la consolidation et l'entretien. L'induction vise à détruire la masse tumorale ainsi que les foyers métastatiques, s'il y a lieu, en administrant une chimiothérapie à forte dose en alternant différentes associations médicamenteuses. La chirurgie vient également éliminer la masse tumorale. Ensuite, le traitement de consolidation vise à éradiquer la maladie résiduelle en administrant une chimiothérapie à forte dose suivie d'une transplantation de cellules souches hématopoïétiques autologues (TCSHA). La radiothérapie peut également être utilisée afin de traiter la tumeur primaire. Enfin, le traitement d'entretien vise à éliminer la maladie résiduelle et éviter tout risque de rechute. Il comprend l'administration d'une immunothérapie avec l'anticorps monoclonal (mAb) anti-GD2 (*disialoganglioside, tumour-associated surface antigen*) ainsi qu'une thérapie de différenciation avec l'acide rétinoïque (*13-cis-RA*)<sup>18,102</sup> (Figure 4). Une étude randomisée du COG a démontré l'efficacité de l'immunothérapie post-consolidation<sup>103</sup>, menant à l'approbation par la FDA du Dinutuximab (l'anti-GD2) pour les patients à haut risque. Bien que ces résultats soient prometteurs, un suivi plus poussé sera nécessaire pour déterminer si cette approche mènera ultimement à une amélioration de la survie à long terme. Malheureusement, ces stratégies de traitements agressifs confèrent un risque accru de dysfonctionnement des organes et d'autres événements indésirables tardifs liés aux traitements, y compris des cancers secondaires<sup>104</sup>. Ainsi, il est clair que des stratégies plus efficaces avec un indice thérapeutique plus élevé sont désespérément nécessaires.



**Figure 4 | Schémas du traitement du NB selon le groupe de risque**

Les patients à faible risque sont en général traités par résection chirurgicale ou sont seulement suivis en observation quand la tumeur est susceptible de régresser spontanément. Les patients à risque intermédiaire sont traités par chimiothérapie, le nombre de cycles de traitement dépend de leur réponse et de la résection chirurgicale de la tumeur primaire. Les patients à haut risque nécessitent une thérapie multimodale intensive comprenant chimiothérapie, chirurgie, chimiothérapie myéloablative avec TCSHA, radiothérapie dans certains cas et finalement l'immunothérapie anti-GD2 et la thérapie de différenciation. *Illustration adaptée de Tolbert VP et Matthay KK, 2018<sup>18</sup>.*

### 1.5.1 L'induction : la chimiothérapie

La chimiothérapie d'induction comprend typiquement différentes combinaisons d'anthracyclines (Doxorubicin), de composés à base de platine (Cisplatine et Carboplatin), d'agents inactivant les microtubules (Vincristine), d'agents alkylants (cyclophosphamide) et les inhibiteurs de la topoisomérase-II (Étoposide ou le VP-16)<sup>105,106</sup>. Plus récemment, les inhibiteurs de la topoisomérase-I (Topotecan) ont été utilisés<sup>107</sup>. Le but de la chimiothérapie d'induction est de réduire la charge tumorale, d'éliminer les foyers métastatiques et permettre une ablation chirurgicale plus sûre de la tumeur. Les patients avec une réponse complète ou une très bonne réponse partielle à l'induction ont un meilleur pronostic de survie sans complication à long terme<sup>106,108</sup>.

### 1.5.2 La chirurgie

La chirurgie a un rôle important à la fois au moment du diagnostic et pendant le traitement. Au diagnostic, la chirurgie peut permettre une exérèse complète de la tumeur (et

dans ce cas, elle peut être le seul traitement). Dans d'autres cas, lorsque les caractéristiques de la tumeur (site, taille, relation avec les structures environnantes) indiquent que la résection chirurgicale n'est pas possible sans risque, la chirurgie se limite à fournir suffisamment de tissu tumoral pour effectuer le diagnostic histologique et réaliser des études biologiques <sup>4</sup>.

La résection chirurgicale vise à réaliser une résection tumorale macroscopique avec une maladie résiduelle minimale. L'objectif de la chirurgie dans le traitement des NB à risque faible et intermédiaire est la résection complète en minimisant les dommages des structures adjacentes qui sont fréquemment adhérentes à, sinon enfermées par la masse tumorale. Étant une tumeur hautement infiltrante, le NB présente de nombreux défis pour le chirurgien car il n'est généralement pas possible d'obtenir un examen microscopique négatif des marges de résection dans lesquelles une résection globale est souhaitable. Dans ce sens, les efforts de différents groupes internationaux de chirurgiens et radiologues ont permis de créer l'IDRF afin de définir les complications liées à la chirurgie <sup>109</sup>. Si une ou plusieurs de ces caractéristiques ont été définies, une chimiothérapie pré-chirurgicale doit être administrée afin de réduire la taille de la tumeur et permettre sa résection en toute sécurité <sup>109,110</sup>. Puisque le NB a un tropisme élevé pour les vaisseaux lymphatiques et l'infiltration de ganglion lymphatique, la résection chirurgicale de la tumeur doit inclure l'exploration des ganglions lymphatiques loco-régionaux, particulièrement dans les emplacements abdominaux et pelviens <sup>111,112</sup>.

### **1.5.3 La consolidation : chimiothérapie myéloablative et TCSHA**

L'utilisation de la chimiothérapie myéloablative suivie par une TCSHA s'est traduite par une amélioration du taux de survie sans complication chez les patients atteints de NB à haut risque dans trois essais cliniques randomisés <sup>106,113,114</sup>.

Pour la TCSHA, les cellules souches du sang périphérique sont généralement prélevées par aphérèse chez les patients après deux cycles de chimiothérapie, car des études ont montré un rendement satisfaisant sans contamination tumorale significative <sup>115</sup>. Certains groupes, cependant, préfèrent les recueillir après une chimiothérapie d'induction, en partant du principe qu'il y aurait probablement un risque moindre de contamination tumorale avec une rémission maximale de la moelle osseuse, bien que les rendements globaux en cellules CD34 soient plus faibles <sup>115</sup>.

Le régime de conditionnement optimal pour la thérapie myéloablative est encore à l'étude. L'irradiation corporelle totale a été initialement utilisée comme régime de conditionnement mais n'a pas apporté de bénéfice apparent par rapport à la chimiothérapie à doses intensives. De plus, les rayonnements engendrent de sérieux effets secondaires tels que des troubles de croissance, des tumeurs secondaires et l'infertilité <sup>116</sup>. Par conséquent, les normes de soins actuelles se concentrent sur les transplantations unique ou double avec un traitement de conditionnement par la Carboplatine, l'Étoposide et le Melphalan (CEM) ou par le Busulfan et le Melphalan (BuMel) <sup>117-119</sup>.

#### **1.5.4 L'entretien : l'acide rétinoïque et l'immunothérapie**

Les patients présentant un NB à haut risque entrent généralement dans la phase de maintenance du traitement après l'achèvement de la chimiothérapie d'induction, la résection chirurgicale et la chimiothérapie myéloablative avec TCSHA. Alors que de nombreux patients obtiennent une rémission clinique complète avec l'approche multimodale ci-dessus, la rechute reste courante avec un taux de survie sans complication de 44% sur 2 ans <sup>103</sup>. La maladie résiduelle est un facteur important dans la rechute du NB. Au fil des années, plusieurs options de traitement post-consolidation ont été étudiées dans le but d'éradiquer la maladie résiduelle et d'améliorer les taux de survie des patients.

##### **1.5.4.1 Thérapie de différenciation : l'acide 13-cis-rétinoïque**

Les rétinoïdes, dérivés de la vitamine A, induisent une différenciation morphologique du NB <sup>120</sup>. L'acide 13-cis-rétinoïque (Isotrétinoïne) est un dérivé synthétique de l'acide rétinoïque naturel. L'observation selon laquelle les rétinoïdes entraînent la différenciation neuronale *in vitro* a conduit à l'incorporation de l'Isotrétinoïne dans le traitement standard des enfants présentant un NB à haut risque <sup>121</sup>. L'étude COG-3891 a montré que l'Isotrétinoïne administré après la thérapie de consolidation améliorait la survie globale <sup>106</sup>. Ces résultats ont établi les doses non toxiques pour l'utilisation de l'acide rétinoïque dans le traitement d'entretien des NB à haut risque <sup>106,122</sup>. L'ajout du 13-cis-RA est le plus bénéfique pour les patients qui ont survécu sans complication au-delà de 2 ans après la transplantation. Cela suggère que la 13-cis-RA est plus efficace chez les patients présentant une maladie résiduelle minimale par rapport à une charge tumorale plus importante.

## 1.5.4.2 L'immunothérapie

### A. L'immunothérapie anti-GD2

L'immunothérapie a été testée au cours des trois dernières décennies pour traiter les cancers réfractaires à la chimiothérapie ou en rechute. Elle a aussi un grand intérêt pour éradiquer la maladie résiduelle et prévenir les rechutes<sup>3,101</sup>. Les mAb ciblant des antigènes spécifiques sur la surface des cellules cancéreuses et sont de plus en plus utilisés dans le traitement des cancers solides et hématologiques<sup>123</sup>. Les avantages des mAb sont leur longue demi-vie, une faible toxicité et une grande affinité et spécificité. Plusieurs mAb (par exemple le Cetuximab, le Bevacizumab, l'Herceptine et le Rituximab) ont été approuvés par la FDA (*Food and Drug Administration*), et beaucoup d'autres sont en cours de développement<sup>124,125</sup>.

Les mécanismes d'action des mAb peuvent être dépendants ou indépendants du système immunitaire. Les mécanismes à médiation immunitaire comprennent la cytotoxicité dépendante des anticorps, la cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps (ADCC) ; la cytotoxicité dépendante du complément (CDC) ; et la capacité des mAb à modifier le milieu des cytokines ou à améliorer le développement d'une réponse immunitaire anti-tumorale active. Les effets à médiation non immune résultent du blocage d'un signal de survie pour la cellule cancéreuse. Les anticorps peuvent également être utilisés comme vecteurs ou agents cibles lorsqu'ils sont liés à des médicaments, des radio-isotopes ou des toxines. La lyse des cellules tumorales résulte de l'action cytotoxique du médicament, du radio-isotope ou de la toxine qui est dirigé au site de la tumeur par les mAb<sup>124</sup>.

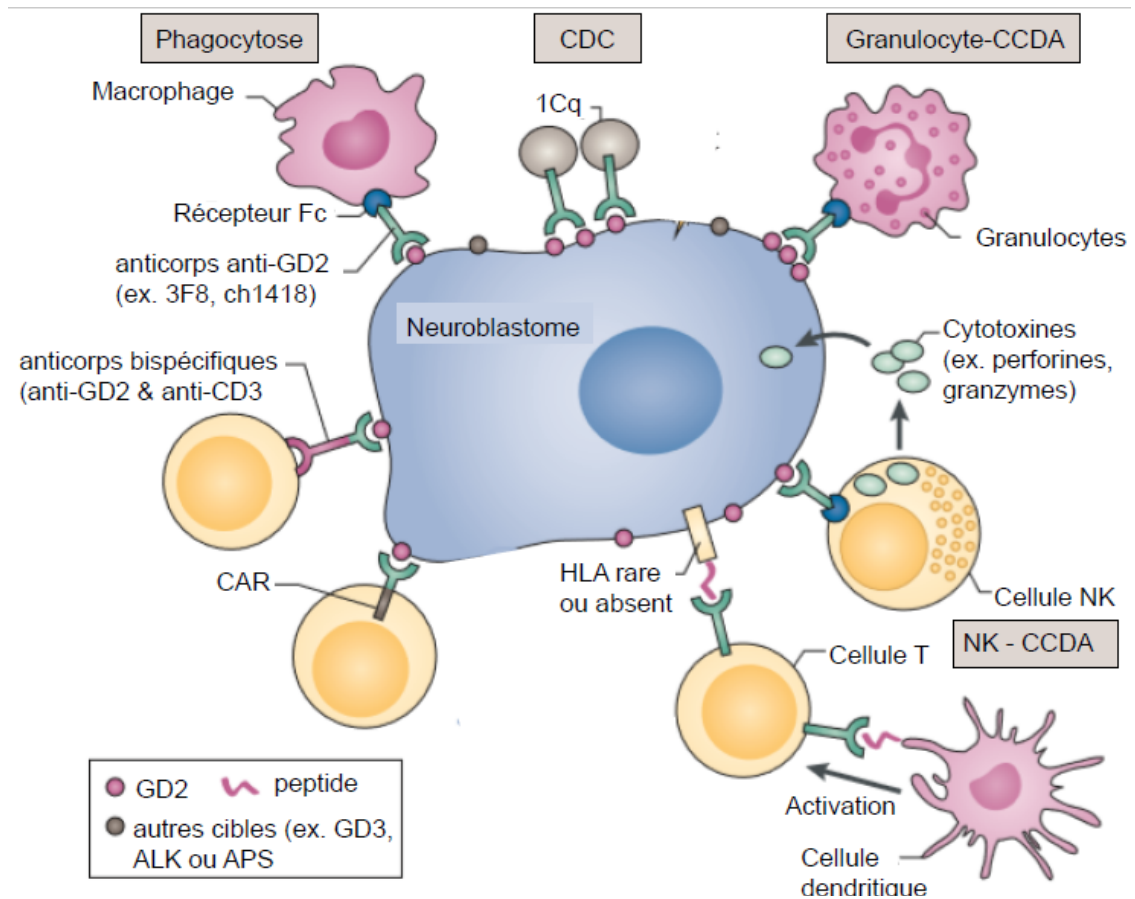
Le disialoganglioside GD2 a été identifié comme étant exprimé par les tumeurs et les sarcomes dérivés du neuroectoderme, dont le NB. Le GD2 est un glycosphingolipide qui est exprimé à la surface cellulaire mais dont le rôle est encore peu connu. Il semble jouer un rôle dans l'attachement des cellules tumorales à la matrice extracellulaire<sup>126,127</sup>. GD2 est biosynthétisé à partir des précurseurs gangliosides GD3/GM3 par la  $\beta$ -1,4-Nacétyl-galactosaminyltransférase (GD2 synthase)<sup>128</sup>. Dans les cellules malignes, GD2 est exprimé dans la plupart des NB, indépendamment du stade, et est très abondant, avec une estimation de 5-10 millions de molécules par cellule<sup>129</sup>. GD2 est également exprimé par les rétinoblastomes, certains mélanomes, cancers du poumon à petites cellules, les tumeurs cérébrales, les

ostéosarcomes, les rhabdomyosarcomes, les sarcomes d'Ewing chez les enfants et les adolescents, ainsi que les liposarcomes, fibrosarcomes et léiomyosarcomes<sup>130,131</sup>. Plus récemment, plusieurs laboratoires de recherche ont signalé la présence de GD2 à la surface sur des cellules souches du cancer du sein<sup>132</sup>, ainsi que sur des cellules souches neuroectodermiques<sup>133</sup> et mésenchymateuses<sup>134</sup>. D'autres antigènes membranaires du NB ont également été ciblés par des mAb tels que les molécules d'adhésion NCAM et L1-CAM, les glycoprotéines B7-H3 et les glycolipides GD3 et GM3<sup>135-137</sup>.

Plusieurs études cliniques ont montré l'efficacité des mAb anti-GD2 dans le traitement du NB à haut risque (3F8, mAb 14G2a IgG2 murin et le mAb chimérique humain-murin ch14.18)<sup>138-140</sup>. Le ch14.18 a été construit en combinant la région variable (Fab) du mAb originale anti-GD2 14.18 IgG3 murin et les régions constantes (Fc) de l'IgG1 humain<sup>141</sup>. Les activités biologiques *in vivo* de l'anti-GD2 ch14.18 ont été démontrées par la capacité du sérum des patients ayant reçu le mAb à induire la CDC<sup>140</sup> et l'ADCC<sup>142,143</sup>. Des études pharmacocinétiques et immunologiques ont permis de montrer que le ch14.18 a une demi-vie plasmatique plus longue<sup>144,145</sup> et qu'il est moins immunogène que le mAb 14G2a murin. Les effets secondaires les plus courants des mAb anti-GD2 sont la douleur, la tachycardie, l'hypertension, l'hypotension, la fièvre et l'urticaire. Beaucoup de ces effets toxiques sont dose-dépendants<sup>140</sup>. La douleur associée à la thérapie anti-GD2 est due à l'expression de l'antigène GD2 sur les nerfs périphériques et est similaire à d'autres syndromes de douleur neuropathique. Cette douleur est en général résistante aux opioïdes. D'autres effets secondaires observés sont l'hyponatrémie, l'hypokaliémie, nausée, vomissement, diarrhée, maladie sérique, et des changements occasionnels dans la réaction des pupilles à la lumière<sup>145,146</sup>.

L'ADCC étant le mécanisme d'action essentiel des mAb anti-GD2, leur efficacité dépend des cellules effectrices telles que les cellules *natural killer* (NK), les granulocytes et les macrophages (Figure 5)<sup>147</sup>. La stimulation de ces effecteurs par des cytokines augmente leurs capacités cytotoxiques. L'interlukine-2 (IL-2) et le facteur de croissance GM-CSF sont administrés en combinaison avec les mAb anti-GD2 pour améliorer la fonction des cellules NK et des granulocytes/macrophages respectivement. Le mAb anti-GD2 déclenche également la CDC. Un essai randomisé publié en 2010 par Yu *et al.*<sup>103</sup> a démontré que la combinaison du

ch14.18 avec le GM-CSF et l'IL-2 et l'acide rétinoïque améliore le taux de survie sans complication de 44 à 66% sur 2 ans.



**Figure 5 | L'immunothérapie du NB**

Les neuroblastes échappent aux cellules T en sous-exprimant les molécules HLA (*Human leucocyte antigens*). De plus, les neuroblastes recrutent des macrophages pro-tumoraux et inhibent l'action des cellules NK. Les cellules suppressives myéloïdes et les lymphocytes T régulatrices vont également inhiber l'activité anti-tumorale des effecteurs immunitaires. Le faible taux des mutations dans le NB par rapport aux cancers de l'adulte, l'immaturité du système immunitaire chez les patients jeunes, la masse tumorale et la chimiothérapie intensive font que le NB est faiblement immunogène. Les antigènes glucidiques comme le GD2, le GD3 et l'acide polysialique (APS), qui sont tous des antigènes classiquement indépendants de l'immunité T, offrent des cibles alternatives pour les thérapies à base d'anticorps. En présence de mAb comme le 3F8 ou le ch14.18 spécifiques au GD2, les neuroblastes deviennent sensibles à l'ADCC (CCDA : Cytotoxicité dépendante des anticorps) médiée par les cellules NK et les granulocytes, la CDC (CDC : Cytotoxicité dépendante du complément) en se liant à C1q ainsi que la cytotoxicité à médiation monocyte-macrophage. Les lymphocytes T polyclonaux peuvent également être modifiés pour cibler spécifiquement les neuroblastes par le biais des récepteurs d'antigène



chimériques (CAR) ou d'anticorps bispécifiques (anti-GD2 x anti-CD3). Les CAR sont des fragments anti-tumoraux à chaîne Fv unique (scFv) génétiquement modifiés avec un domaine transmembranaire ayant des motifs d'activation des lymphocytes T cytotoxiques (CD3 et CD28 / 41BB). *Illustration adaptée de NK Cheung et al, 2013* <sup>3</sup>

Seul ou avec d'autres cytokines ou mAb, le GM-CSF peut améliorer les fonctions des cellules impliquées dans l'activation immunitaire contre les cellules tumorales. Le GM-CSF active directement les monocytes, les macrophages, les granulocytes et les cellules dendritiques qui médient l'ADCC <sup>148</sup> ou indirectement les lymphocytes T par le facteur de nécrose tumorale (TNF), l'interféron (IFN) ainsi que l'IL-1 produits par les monocytes/macrophage/granulocytes et les cellules dendritiques activées <sup>148-151</sup>. Le GM-CSF est bien toléré et permet d'augmenter le nombre de neutrophiles et éosinophiles particulièrement affectés durant la chimiothérapie <sup>152</sup>. La prolifération, la maturation et la fonction des cellules présentatrices d'antigènes (CPA) est également améliorée par le GM-CSF. Cela comprend le *processing* des antigènes et la présentation par les macrophages et les cellules dendritiques qui pourraient favoriser l'induction, ou l'activité anti-tumorale <sup>153,154</sup>.

Grâce à son action pléiotropique, l'IL-2 est la cytokine la plus utilisée en clinique. Son rôle consiste essentiellement à augmenter la prolifération, la survie et la cytotoxicité de plusieurs cellules immunitaires telles que les cellules NK, les lymphocytes T et B <sup>155,156</sup>. Dans l'immunothérapie anti-GD2, l'IL-2 est administrée dans le but d'augmenter l'ADCC en stimulant la cytotoxicité des cellules NK <sup>142</sup>. Ces dernières expriment le récepteur de haute affinité à l'IL-2 qui, une fois stimulé, leur permet d'induire la surexpression de certains récepteurs activateurs, d'augmenter leur potentiel de lyse ainsi que leur production de cytokines inflammatoires <sup>157</sup>. En effet, L'IL-2 serait responsable de l'induction du TNF $\alpha$  et l'IFN $\gamma$  impliqué dans l'augmentation de l'expression des molécules HLA (*Human leucocyte antigens*), généralement sous exprimées dans le NB. Par conséquent, celles-ci deviendraient sensibles à la lyse par les lymphocytes T <sup>158</sup>. À l'inverse, l'IL-2 stimule également l'expansion des cellules T régulatrices qui pourraient en retour réprimer la réponse anti-tumorale. L'IL-2 serait aussi associée à une toxicité importante qui limite parfois son utilisation <sup>159</sup>.

## B. L'immunothérapie cellulaire

En plus de l'immunothérapie par les anticorps monoclonaux, la thérapie cellulaire utilisant le transfert adoptif d'effecteurs immunitaires, telles que les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> et les cellules NK, représente une stratégie très prometteuse dans le traitement du NB (Figure 5).

En effet, les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> et les cellules NK jouent un rôle important dans l'immunité anti-tumorale <sup>160,161</sup>. Les cellules du NB se caractérisent par une faible expression des molécules du CMH de classe I (Complexe majeur d'histocompatibilité de classe I) qui leurs permettent d'échapper à la lyse par les lymphocytes T. Dans ce sens, les lymphocytes T cytotoxiques ont été génétiquement modifiés afin d'exprimer des récepteurs antigéniques chimériques (CAR / *Chimeric Antigen Receptor*) spécifiquement dirigés contre l'antigène tumoral tel que le GD2. Ayant la spécificité d'un anticorps et un potentiel cytotoxique de lymphocytes T, les CAR-T semblent détruire leur cible indépendamment du CMH de classe I, rétablissant ainsi la sensibilité des neuroblastes à ces derniers <sup>162,163</sup>. Les CAR-T de première génération contiennent seulement un endodomaine CD3ζ alors que les CAR-T de nouvelles générations contiennent également des domaines de costimulation tels que CD28, OX40, 4-1BB et CD27. Les études précliniques ont démontré que ces domaines de costimulation augmentent l'expansion, la production de cytokines et la survie des CAR-T <sup>164,165</sup>. À ce jour, Les CAR-T anti-GD2 (NCT00085930, NCT01822652, NCT03373097, NCT02107963) et anti-L1-CAM (NCT02311621) sont les deux types de CAR-T ayant été testés en essai clinique contre le NB. L1-CAM, étant une molécule d'adhésion surexprimée dans le NB. Les résultats de ces études indiquent que les CAR-T induisent une réponse partielle chez les patients et que la faible persistance des CAR-T représente la problématique majeure qui limite leur efficacité contre le NB <sup>166</sup>.

L'immunothérapie basée sur les cellules NK sera détaillée dans le chapitre 3 - section 3.5.

## **1.5.5 Le traitement du NB en rechute et/ou réfractaire**

Les patients atteints de NB réfractaire ou récidivant peuvent rarement être guéris. Néanmoins, les thérapies de sauvetage actuelles peuvent offrir une réponse partielle ou même complète avec une amélioration des symptômes et de la qualité de vie. Deux approches thérapeutiques sont principalement utilisées pour traiter ces patients. La première étant une chimiothérapie cytotoxique et la deuxième étant la radiothérapie.

### **1.5.5.1 La chimiothérapie**

La chimiothérapie administrée chez les patients en rechute du NB est une chimiothérapie qui possède des mécanismes d'action différents de celle administrée en début de traitement. Les plus utilisées dans ce contexte sont le Topotécan, soit le Cyclophosphamide ou le Témzolomide <sup>167</sup> ou l'Irinotécan et le Témzolomide <sup>168,169</sup>.

### **1.5.5.2 La radiothérapie**

Le neuroblastome est une tumeur radiosensible, avec des doses efficaces de l'ordre de 15-32 Gy selon le site tumoral et le volume ainsi que l'âge du patient. La radiothérapie externe a été considérablement améliorée grâce à l'identification des facteurs de risque <sup>170-172</sup>. Le manque d'essais randomisés portant sur la contribution de la radiothérapie entrave toutefois l'évaluation de son impact sur la survie des patients. Dans les protocoles SIOPEN actuels, l'irradiation externe du siège tumoral primaire est couramment utilisée après une chirurgie chez les patients à haut risque (*MYCN* amplifié, stade 4 et stade 3 avec une biologie et/ou une histopathologie défavorable). Cependant, lorsque le champ de rayonnement comprend des organes importants tels que les poumons, les reins, les ovaires et la cavité orbitaire, le réglage du champ de rayonnement est plus difficile. En outre, une attention particulière doit être prise en compte en ce qui concerne l'apparition de tumeurs secondaires et des problèmes de croissance dans les sites inclus dans le champ d'irradiation, en particulier la thyroïde, les os, et les gros vaisseaux sanguins <sup>173-175</sup>. Les nouvelles technologies, telles que les techniques de photons modulées en intensité IMRT (*Intensity-Modulated RadioTherapy*) ou VMAT (*Volumetric Arc Therapy*) et la protonthérapie offrent la possibilité d'optimiser l'irradiation de la tumeur tout en épargnant le

tissu normal environnant, minimisant ainsi le risque d'effets toxiques sur les organes vitaux <sup>176,177</sup>.

La thérapie radio-métabolique avec l'I-131 est une alternative à l'irradiation externe. Les premières études menées dans les années 1970 ont permis d'identifier un certain nombre de dérivés de la guanithidine, notamment la MIBG. En raison de son analogie moléculaire avec la norépinéphrine, la MIBG est absorbée par les cellules neuroendocrines par un mécanisme actif conduisant à une concentration spécifique de la molécule dans les cellules. Ces études ont démontré l'efficacité de l'accumulation de MIBG dans le tissu médullaire surrénalien <sup>178</sup>, ainsi que dans les tumeurs neuroendocrines <sup>179</sup>. Sur cette base, la MIBG radiomarquée à l'iode (I-123 ou I-131) a été introduite pour la première fois en tant qu'agent d'imagerie moléculaire. Par la suite, sur la même base, la mIBG radiomarquée à l'iode a été proposée pour l'utilisation thérapeutique contre des tumeurs neuroendocrines <sup>180</sup>.

Les rayonnements  $\beta$  émis par l'iode<sup>131</sup> induisent l'apoptose des cellules ayant incorporé le MIBG. Chez des patients en rechute, un bon taux de réponse a été observé à la suite d'une thérapie par la MIBG marqué à l'I131 <sup>181</sup>. Des études en cours visent à intégrer la radiothérapie ciblée avec la MIBG marqué à l'I131 dans la phase de consolidation, une approche qui semble réalisable à la lumière des résultats d'une étude de phase 1 où cet agent a montré une activité anti-tumorale prometteuse chez les patients atteints d'une maladie réfractaire primaire <sup>182</sup>. Cependant, plusieurs limites existent pour l'utilisation de cette approche, tels que des problèmes de dosimétrie, d'absorption non homogène de l'I-131 MIBG dans la tumeur en raison de l'hétérogénéité tumorale, et une forte toxicité. Cette approche nécessite par ailleurs des infrastructures particulières pour protéger le patient et le personnel soignant des radiations au cours du traitement.

## **1.6 Problématique du NB en rechute et/ou réfractaires aux traitements**

Malgré les progrès récents, de nombreux patients atteints de NB à haut risque présentent soit une maladie réfractaire, soit une récurrence de la maladie et il n'existe pas de traitement

curatif bien établi pour ces patients. Le taux de survie globale à 5 ans après la première rechute est d'environ 20%. Ce taux de survie dépend du moment de la rechute et du stade initial de la tumeur <sup>183</sup>. Les patients en rechute présentent le plus souvent une maladie métastatique et chimiorésistante dont la biologie est probablement significativement différente de la maladie initiale en raison de mutations et d'autres adaptations induites par une chimiothérapie antérieure. Ces rechutes sont également dues, en partie, à la présence de cellules qui n'expriment pas GD2 ou encore la présence de cellules initiatrices de tumeurs (CITs) <sup>184</sup>.

Un tiers des patients rechutent à la suite du traitement de consolidation et de l'immunothérapie anti-GD2. Même si la majorité de ces patients montrent une forte expression de GD2, de récentes études ont rapporté quelques cas où une perte d'expression du GD2 a été observée à la suite de l'immunothérapie anti-GD2 avec une sélection de clones GD2-négatifs <sup>185-187</sup>. De plus, notre équipe a démontré que les patients ayant une expression hétérogène du GD2 au moment du diagnostic rechutent plus fréquemment à la suite de l'immunothérapie anti-GD2. Ces résultats confirment que l'immunothérapie ciblée sur un seul antigène est à risque d'échappement en raison de la perte de la cible <sup>188</sup>.

Étant tumeur embryonnaire, le NB présente un faible taux de mutations en comparaison aux tumeurs adultes mais il est très hétérogène. La pression de sélection induite par les traitements ou des modificateurs du microenvironnement semble favoriser la prolifération de clones préexistants dans des niches <sup>189</sup>. De telles cellules sont appelées les cellules initiatrices de tumeurs (CIT) et possèdent des propriétés de cellules souches cancéreuses (CSC). En effet, ces cellules sont caractérisées par la multipotence, un phénotype peu différencié et un potentiel d'auto-renouvellement. L'auto-renouvellement se caractérise par une capacité à se diviser de façon asymétrique donnant naissance à une cellule souche et une cellule différenciée. De plus, grâce à leur caractère quiescent, les CIT peuvent survivre à des conditions nutritionnelles défavorables et sont résistants à la chimiothérapie qui cible la division cellulaire. Les CIT sont donc à l'origine des rechutes <sup>190</sup>.

Enfin, l'échappement immunitaire semble être impliqué dans la rechute du NB. Les cellules du NB, comme bien d'autres tumeurs solides, ont la capacité d'induire un microenvironnement immunosuppresseur en sécrétant des cytokines et des facteurs autocrines et paracrines qui recrutent les macrophages associés aux tumeurs (TAM /*Tumor-Associated*

*Macrophage*) et les cellules myéloïdes suppressives (MDSC /*Myeloid-derived suppressor cells*). En effet, les TAM de type 2 (M2) produisent l'IL-4, l'IL-6, l'IL-10, le TGF- $\beta$  ainsi que les MMP (*Matrix metalloproteinases*), le VEGF (*Vascular endothelial growth factor*) et le EGF (*Epithelial growth factor*) lesquels vont promouvoir l'évasion tumorale et l'angiogenèse <sup>191</sup>. Une étude a rapporté une association entre la progression du NB et l'accumulation de MDSC qui produisent l'arginase (ARG-1), le TGF- $\beta$  et les ERO (espèces réactives de l'oxygène) <sup>192</sup>. La présence d'une infiltration tumorale de lymphocytes T (CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup>) et des cellules NK est un facteur de bon pronostic dans le NB. En revanche, la présence d'un haut niveau de cellules immunosuppressives comme les cellules T régulatrices, les TAM et les MDSC, conduit à l'inhibition des effecteurs immunitaires qui deviennent alors inactifs et ne réussissent plus à éradiquer les cellules de NB conduisant à la rechute <sup>193-195</sup>. De plus, le microenvironnement tumoral est également caractérisé par la présence de conditions hypoxiques qui induisent le recrutement des cellules immunosuppressives. L'hypoxie entraîne la production de HIF-1 (*Hypoxia-Inducible Factor*) par les cellules tumorales qui vont induire l'expression de PD-L1 (*Programmed cell death-ligand 1*) <sup>196</sup>. Ce dernier est impliqué dans l'inhibition des effecteurs immunitaires à travers la stimulation de son récepteur PD-1 exprimé sur la surface des cellules NK et les lymphocytes T <sup>197</sup>.

Tel que mentionné précédemment, le NB est caractérisé par une faible expression des molécules HLA qui leur permettent d'échapper à la reconnaissance par les lymphocytes T. La perte d'expression des molécules CMH de classe I sur les neuroblastes implique un moindre *processing* des antigènes tumoraux normalement reconnus par les lymphocytes T et par conséquent, échappent à la lyse médiée par ces derniers <sup>198,199</sup>.

## Hypothèses et objectifs

Le NB à haut risque représente près de la moitié des cas de NB et malgré des traitements intensifs, la survie des patients à long terme est de 55%. Les études menées ces deux dernières décennies ont permis l'établissement d'une stratégie thérapeutique qui consiste en un traitement d'induction intensif par chimiothérapie, un contrôle local par chirurgie et radiothérapie, une phase de consolidation avec une chimiothérapie à dose unique ou en tandem et une greffe autologue, et enfin une immunothérapie visant l'antigène GD2 exprimés par les neuroblastes afin d'éliminer la maladie résiduelle.

Les échecs de traitements sont dus, en partie, à la présence de cellules résistantes à ces thérapies tel que mentionné précédemment : les cellules GD2 négatives et les CIT. Pour éradiquer la maladie, nous proposons, dans le cadre de cette thèse, une série d'approches visant à améliorer l'efficacité des thérapies actuelles et de réduire la toxicité :

1. La réduction de la tumeur par une radiothérapie ciblée combinée à des radio-sensibilisants.
2. Augmenter l'effet de l'immunothérapie anti-GD2 en augmentant l'activité anti-tumorale des cellules natural killer (NK) en utilisant des cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC).

La radiothérapie ciblée utilisant la MIBG couplée à l'iode<sup>131</sup> permet de délivrer spécifiquement de hautes doses de radioactivité directement dans les cellules de NB. L'efficacité de ce traitement peut être augmentée par l'utilisation de médicaments radio-sensibilisants, comme les inhibiteurs de l'autophagie. L'autophagie est un processus cellulaire d'auto-dégradation et de recyclage des composants cellulaires pouvant permettre la survie des cellules tumorales exposées aux agents chimiothérapeutiques ou à la radiation<sup>200</sup>. Ainsi, nous émettons l'hypothèse que la radiothérapie augmente l'autophagie des neuroblastes, ce qui les rend plus résistants à l'apoptose. Par conséquent, l'inhibition de l'autophagie pourrait augmenter la sensibilité des neuroblastes à la radiothérapie ciblée.

Par ailleurs, de nombreuses études cliniques et précliniques ont montré que les lymphocytes du système immunitaire inné, les cellules NK, jouent un rôle important dans le contrôle du NB<sup>201-204</sup>. Nous avons récemment mis en évidence *in vitro* que la stimulation des

cellules NK par des cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC) augmente leurs fonctions cytotoxiques vis-à-vis des neuroblastes <sup>205</sup>. De ce fait, nous faisons l'hypothèse que la stimulation de l'activité anti-tumorale des cellules NK par les pDC permet de renforcer l'immunothérapie anti-GD2 au cours de la phase de consolidation du traitement. Cette immunothérapie vise à prévenir l'échappement thérapeutique des cellules GD2 négatives et à réduire les rechutes.

À la lumière des hypothèses avancées, nos objectifs sont les suivants :

**i.** Déterminer (a) le rôle de l'autophagie dans la résistance du NB à la radiothérapie et (b) l'efficacité des inhibiteurs de l'autophagie dans la sensibilisation des neuroblastes à la radiothérapie.

**ii.** Déterminer (a) les mécanismes impliqués dans la cytotoxicité des cellules NK contre les cellules de NB et (b) valider la capacité des cellules NK des patients atteints de NB à éradiquer les neuroblastes à la suite de leur stimulation par des pDC activées durant l'immunothérapie anti-GD2.



# Chapitre 2 : Autophagie et radiothérapie par MIBG

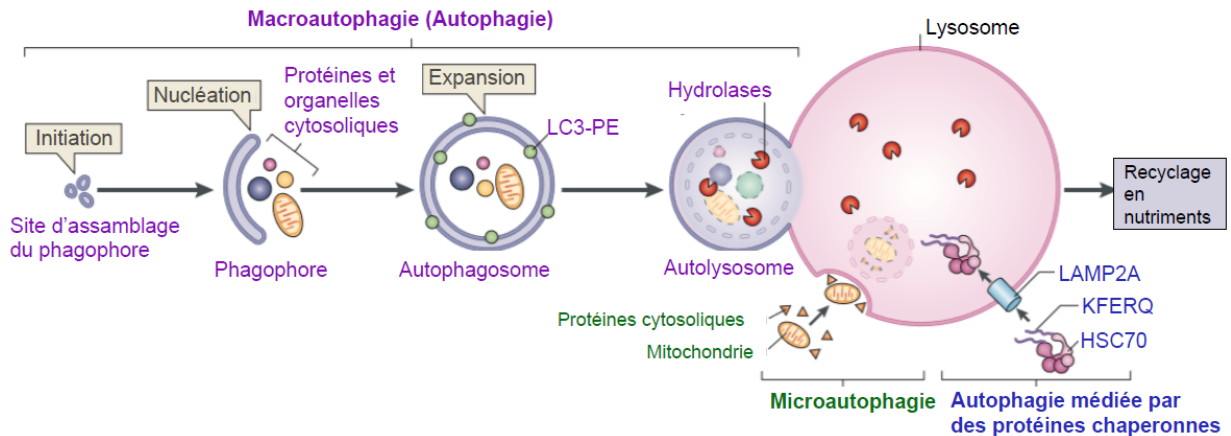
## 2.1 L'autophagie

La physiopathologie du cancer se caractérise par de nombreux changements de la composition génétique et métabolique des cellules. Par conséquent, la connaissance des dysfonctionnements métaboliques des cellules cancéreuses a renforcé la recherche sur les traitements adjuvants basés sur la modulation métabolique. Une des voies clés de cette modulation métabolique est la dégradation et le recyclage des protéines via l'autophagie qui augmente l'efficacité bioénergétique des cellules cancéreuses.

Définis comme un mécanisme catabolique hautement conservé, l'autophagie, est un processus d'auto-ingestion cellulaire. L'autophagie est reconnue depuis longtemps comme une voie de dégradation importante des protéines, en particulier en période de restriction des nutriments ou de stress. Contrairement au système ubiquitine/protéasome qui cible des protéines individuelles à vie courte, l'autophagie fonctionne comme un processus global capable de dégrader des protéines et des organites à vie longue tels que le réticulum endoplasmique, les mitochondries, les peroxysomes, le noyau et les ribosomes<sup>206,207</sup>. Les preuves indiquent que la dégradation autophagique favorise le recyclage et la récupération des nutriments cellulaires, permettant ainsi la survie des cellules pendant la déprivation en nutriments. Même si, dans certains cas, elle peut participer à la mort cellulaire<sup>208,209</sup> et a parfois été considéré comme une modalité distincte de mort cellulaire programmée (PCD), l'autophagie, est surtout un mécanisme essentiel pour le contrôle de la qualité et le maintien de l'homéostasie. En effet, l'autophagie basale est importante pour la dégradation des protéines et des organelles endommagées et dysfonctionnelles. Par conséquent, il n'est pas surprenant qu'une autophagie dysfonctionnelle ou perturbée influence les désordres métaboliques impliquées dans plusieurs pathologies, tel que, le cancer<sup>210</sup>, la neurodégénérescence<sup>211</sup>, le vieillissement<sup>212</sup>, l'inflammation<sup>213</sup>, l'immunité<sup>214</sup> et la stabilité du génome<sup>213</sup>. Aussi, nous savons désormais qu'outre la déprivation en nutriments, l'autophagie est induite par de nombreuses autres perturbations, notamment l'hypoxie et les stress métaboliques, osmotiques et oxydants<sup>215-217</sup>.

De manière générale, l'autophagie fait référence à un ensemble de processus cataboliques étroitement régulés, qui transmettent tous des composants cytoplasmiques au lysosome en vue de leur dégradation, et qui sont généralement classés en trois types : la macro-autophagie, la micro-autophagie et l'autophagie médiée par des protéines chaperonnes (Figure 6). La macro-autophagie (appelé ici autophagie) implique la formation de vésicules à double membrane, appelées autophagosomes, qui englobent les protéines cytoplasmiques et les organites; ces autophagosomes sont acheminés vers les lysosomes, à la suite desquels la cargaison séquestrée est dégradée <sup>218</sup>. La micro-autophagie fait, quant à elle, référence à l'invagination de la membrane lysosomale ou endosomale, entraînant un engorgement direct de substrats qui sont ensuite dégradés par des protéases lysosomales <sup>219</sup>. Enfin, l'autophagie médiée par des protéines chaperonnes se distingue de la macro-autophagie et de la micro-autophagie car la cargaison n'est pas séquestrée dans une vésicule délimitée par une membrane. Au lieu de cela, les protéines ciblées contiennent un motif penta-peptide de type KFERQ qui est reconnu par la protéine de choc thermique HSC70 (*Heat shock cognate 70 kDa protein*) qui favorise la translocation de ces cibles à travers les membranes lysosomales dans la lumière lysosomale via le récepteur LAMP2A <sup>220</sup>.

Bien que l'autophagie fût, au départ, considérée comme un processus non sélectif, il est maintenant bien établi qu'un nombre remarquable de cargaisons peut être dégradé avec une sélectivité élevée. De plus, ces voies d'autophagie sélective ont été liées à divers états pathologiques <sup>221,222</sup>. En effet, l'autophagie sélective dégrade non seulement, des agrégats de protéines intracellulaires, mais aussi des agents pathogènes et des organites endommagés <sup>223</sup>.



**Figure 6 | Les principaux types d'autophagie chez les mammifères**

En réponse à un stimulus tel que la restriction en nutriments, la macro-autophagie (autophagie) débute par la formation du phagophore, aussi appelée processus de nucléation. L'élongation de la membrane implique la séquestration de la cargaison autophagique pour former les autophagosomes. À ce stade, toutes les protéines ATG impliquées dans l'initiation de l'autophagie sont libérées dans le cytoplasme excepté LC3-PE (*Microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3*). La LC3-PE (LC3II) est nécessaire pour l'expansion des membranes autophagiques, leur capacité à reconnaître les cargaisons autophagiques et la fusion d'autophagosomes avec des lysosomes. Les autophagosomes vont ensuite fusionner avec les lysosomes conduisant à la formation de autolysosomes. En micro-autophagie, les substrats sont directement engloutis par la membrane lysosomale. Enfin, dans l'autophagie médiée par les protéines chaperonnes, les substrats portant le motif pentapeptide KFERQ sont reconnus de manière sélective par la protéine de choc thermique 70 kDa (HSC70) et sont transportés vers les lysosomes à travers LAMP2A. Dans les trois processus, la cargaison autophagique est dégradée via des hydrolases lysosomales. *Illustration adaptée de Kaur J et al., 2015* <sup>224</sup>

### 2.1.1 Mécanismes de l'autophagie

L'autophagie est déclenchée par différents stimuli, notamment la privation de nutriments, le stress oxydatif, l'hypoxie, des agrégats de protéines ainsi que des organelles endommagées. La première étape de l'autophagie est caractérisée par la séquestration de portions de cytoplasme en une double vésicule liée à la membrane appelée autophagosome. L'autophagosome se fusionne ensuite avec un lysosome, ce qui entraîne la dégradation de la substance séquestrée <sup>225</sup>. Des études chez la levure ont identifié plus de 30 protéines ATG (*autophagy related genes*). Des protéines orthologues ont par la suite été identifiées <sup>226</sup>. La formation d'autophagosomes comprend trois étapes principales : l'initiation, la nucléation et l'expansion de la membrane d'isolement (Figure 6). Le processus complexe de formation de l'autophagosome commence au

site d'assemblage du phagophore (également connu sous le nom de membrane d'isolement). En cas de stress, la cible de la rapamycine chez les mammifères, mTOR (*mamalian target of rapamycin*) est inactivée, ce qui active par conséquent l'activité de la kinase ATG1. L'activation d'ATG1, à son tour, provoque la phosphorylation d'ATG13 (BECLIN-1) et FIP200 et l'autophosphorylation de protéines ULK (*unc-51-like kinase*). La phosphorylation et la formation du complexe ATG13-ULK-FIP200 recrutent d'autres protéines ATG, ce qui entraîne l'initiation de la formation d'autophagosomes<sup>227,228</sup>. Le complexe PI3K avec les protéines ATG recrute ensuite deux systèmes de conjugaison de type ubiquitine, à savoir ATG12-ATG5-ATG16 et LC3-phosphatidyléthanolamine (LC3-PE), vers la structure pré-autosomique. Ceux-ci sont, à leur tour, impliqués dans l'élongation et l'expansion de la membrane du phagophore. Dans le premier système, ATG7 active ATG12, qui est ensuite transféré à ATG10 et lié à ATG5. Le complexe ATG12-ATG5 se lie ensuite à ATG16, suivi du recrutement de ce complexe sur la membrane du phagophore<sup>227</sup>. Le système de conjugaison ATG5-ATG12 n'est pas lié à l'activation de l'autophagie; par conséquent, lors de la formation de l'autophagosome, le complexe ATG5-ATG12-ATG16 est délogé de la membrane, ce qui en fait un marqueur moins performant pour l'autophagie<sup>229</sup>. Une autre voie d'ubiquitine implique la lipidation de LC3. LC3 est synthétisé en tant que pro-LC3, qui est clivé par ATG4 à l'extrémité c-terminale pour former LC3-I. Le fragment LC3-I est conjugué à PE à l'aide d'ATG7 et d'ATG3 pour former LC3-II. La LC3-II est ensuite recrutée sur les deux membranes des autophagosomes et permet la fusion avec les lysosomes<sup>230</sup>. Après la fusion de l'autophagosome avec la vacuole, la cargaison cytosolique est décomposée par les hydrolases lysosomales acides<sup>231</sup>.

### 2.1.2 Régulation de l'autophagie

Étant donné son implication dans plusieurs processus physiologiques, l'autophagie doit être régulée avec précision pour éviter une activité excessive ou insuffisante. Le maintien et la régulation de l'autophagie dans des conditions normales et pathologiques a fait l'objet de nombreuses études. La privation de glucose ou d'acides aminés induit l'autophagie<sup>232,233</sup>. La protéine mTOR joue un rôle essentiel dans la régulation de l'autophagie. mTOR est une sérine/thréonine kinase dont la fonction est de détecter et d'intégrer de multiples signaux

environnementaux pour inhiber le catabolisme et coordonner la croissance et la prolifération. C'est donc le principal régulateur négatif de l'autophagie <sup>234</sup>. mTOR se situe en aval de la voie anti-apoptotique PI3K/AKT liée aux récepteurs des facteurs de croissance. mTOR s'associe à plusieurs protéines différentes pour former deux complexes distincts: mTORC1 et mTORC2 <sup>234,235</sup>. Lorsque les nutriments cellulaires et les facteurs de croissance sont abondants, mTORC1 est activé et phosphoryle les protéines ATG, entraînant l'inhibition de l'autophagie. À l'inverse, lorsque mTORC1 est inhibé, ce qui se produit pendant les périodes de privation de nutriments, l'autophagie est induite <sup>234,236</sup>. mTORC1 est régulé en partie par la protéine kinase dépendante de l'AMP (AMPK) <sup>237</sup>. La stimulation de l'AMPK par une diminution des taux d'ATP cellulaire ou un stress cellulaire conduit à l'inhibition de mTORC1 qui conduit à l'activation de l'autophagie <sup>238</sup>.

La famille de protéines RAS comprend de petites GTPases qui interviennent dans le contrôle de la croissance et de la survie des cellules. Il a été démontré que la signalisation RAS régule l'autophagie via deux voies cellulaires principales. Premièrement, l'activation de RAS entraîne la stimulation de la PI3K/AKT et active mTORC1; cela conduit à l'inhibition de l'autophagie <sup>239</sup>. Inversement, RAS peut également entraîner une augmentation de l'autophagie via la signalisation de la voie RAF/MEK/ERK <sup>239,240</sup>.

De plus, la voie de signalisation MAPK (*Mitogen-activated protein kinase*) a été liée à la régulation de l'autophagie. La signalisation JNK, qui est activée par MAPK, conduit à la stimulation de facteurs de transcription clés tels que C-JUN, qui régule à son tour l'expression de gènes pro- et anti-apoptotiques tels que BAX et BCL-2 <sup>241</sup>. Il a été démontré que BCL-2 s'associe à Beclin-1 et l'inhibe, ce qui conduit à l'inhibition de l'autophagie <sup>242</sup>.

### **2.1.3 Rôle de l'autophagie dans le cancer**

L'autophagie joue donc différents rôles dans la biologie du cancer en fonction du type de tumeur et du contexte. Certaines données indiquent que l'autophagie joue un rôle suppresseur dans le développement tumoral, tandis que d'autres suggèrent que l'autophagie favorise la croissance tumorale <sup>243</sup>.

Lorsque l'autophagie est réduite ou anormale, les composants cellulaires endommagés ou les substances nocives ne peuvent pas être éliminés, ce qui crée un environnement de stress

oxydatif propice au développement d'un cancer. Dans ce contexte, l'autophagie normale peut être considérée comme un mécanisme de suppression tumorale. Ce concept date de la fin des années 1990 et le début des années 2000, lorsque les premières études ont montré que la délétion monoallélique du gène *BECN1*, qui code pour la protéine BECLIN-1, se produit dans de nombreuses tumeurs du sein, de la prostate et de l'ovaire<sup>244,245</sup>. Les lignées cancéreuses et les modèles murins développés pour évaluer l'impact de la perte de *BECN1* ont montré que cela entraînait une réduction de l'autophagie et une prolifération cellulaire accrue, impliquant *BECN1* en tant que gène suppresseur de tumeur<sup>245,246</sup>.

Des mutations dans d'autres protéines cruciales de l'autophagie ont également été identifiées et appuient l'idée selon laquelle l'autophagie a une fonction de suppression de tumeur. *UVRAG* est une protéine qui interagit avec *BECN1* et agit en tant que régulateur de l'autophagie. Il a été démontré que les mutations du gène *UVRAG* entraînaient une diminution de l'autophagie et une augmentation de la prolifération des cellules tumorales dans les cancers colorectaux<sup>247</sup>. D'autres preuves du rôle suppresseur de tumeur de l'autophagie proviennent de souris *knock-out* pour les gènes *Atg*. Des études ont montré que des souris présentant une délétion d'*Atg5* développaient plusieurs tumeurs du foie<sup>248</sup>. De plus, la suppression sélective d'*Atg7* dans le compartiment hématopoïétique des souris, conduit à l'arrêt de l'autophagie dans les cellules souches et progénitrices hématopoïétiques, caractérisé par l'accumulation de mitochondries anormales, l'augmentation des ERO et les dommages à l'ADN. Les souris ont une cytopénie sévère et une hématopoïèse anormale avec une augmentation de la prolifération des cellules myéloïdes<sup>249</sup>. L'autophagie peut également empêcher la formation de tumeurs par son rôle dans la gestion des ERO et la dégradation des organites. Les mitochondries sont la principale source des ERO intracellulaires et il a été démontré que l'accumulation ou la surproduction des ERO, qui survient lorsque les mitochondries vieillissent ou deviennent défectueuses, favorise la carcinogenèse<sup>250,251</sup>.

L'ensemble de ces données confirme l'idée selon laquelle l'autophagie peut supprimer la croissance tumorale. Cependant, il existe également des données montrant que les cellules tumorales utilisent l'autophagie pour favoriser la croissance et la prolifération cellulaires et, par conséquent dépendent davantage de l'autophagie que les cellules normales. Dans ce contexte, l'inhibition de l'autophagie serait bénéfique pour le traitement du cancer.

Les cellules cancéreuses en prolifération ont un grand besoin de nutriments pour leur métabolisme et de leur production d'énergie. En dégradant et en recyclant les composantes cellulaires, l'autophagie permet de satisfaire les demandes métaboliques des cellules tumorales en prolifération. Le microenvironnement tumoral est caractérisé par un manque de nutriments, d'oxygène et d'énergie. Tous ces éléments sont responsables de l'induction de l'autophagie par les voies mTOR et RAS notamment <sup>239,252,253</sup>. En conséquence, une inhibition de l'autophagie par la chloroquine ou un siARN ciblant BECLIN1 permet de sensibiliser les cellules tumorales à la chimiothérapie <sup>254</sup>. Inversement, l'utilisation de miARN induisant l'autophagie aggrave la progression du cancer et la résistance à la chimiothérapie <sup>255</sup>. Des niveaux élevés d'autophagie ont été observés dans une variété de tumeurs présentant des mutations activatrices de *RAS* <sup>256</sup>. Lorsque l'autophagie est inhibée dans ces tumeurs, dans les lignées cellulaires et chez les modèles murins, la prolifération cellulaire diminue et la tumeur régresse <sup>257</sup>. Il existe également un nombre croissant de publications suggérant que le stress oxydatif mène à la régulation positive de l'autophagie dans les fibroblastes tumoraux stromaux provoquant une destruction mitochondriale (mitophagie) <sup>258</sup>. Lorsque cela se produit, les cellules stromales utilisent la glycolyse aérobie pour produire des substances telles que le lactate et les cétones, qui alimentent à leur tour la croissance et la prolifération des cellules tumorales voisines <sup>259</sup>.

#### **2.1.4 Les inhibiteurs de l'autophagie**

Compte tenu de son double rôle dans la suppression et la progression tumorale, l'inhibition et l'induction de l'autophagie ont été proposées comme stratégies potentielles de traitement des cancers. Des cibles pouvant être modulées grâce à des médicaments ont été identifiées à presque toutes les étapes du processus autophagique, de la formation de l'autophagosome à la dégradation lysosomale jusqu'à la signalisation cellulaire <sup>260</sup>.

Dans tous les cas, les inhibiteurs ou inducteurs de l'autophagie n'ont pas ou peu d'effets anticancéreux lorsqu'ils sont utilisés seuls. Leur combinaison avec d'autres agents chimiothérapeutiques ou la radiothérapie a montré qu'ils peuvent jouer un rôle d'adjuvant ou de sensibilisateurs à la chimiothérapie ou la radiothérapie <sup>261</sup>.

Les inhibiteurs de l'autophagie ciblent souvent les kinases impliquées dans la nucléation et l'extension du phagophore ou empêchent le processus d'acidification endosomal / lysosomal,

empêchant ainsi la fusion des autophagosomes et des lysosomes. Le wortmannin, la 3 Methyl Adenine (3MA) et le LY294002 inhibent l'autophagie en inactivant la PI3K essentielle à la nucléation et à l'extension du phagophore <sup>262</sup>. La Bafilomycine A1 est un inhibiteur lysosomal qui altère l'autophagie en inhibant la fusion lysosomale en autophagosomes, ce qui les rend dysfonctionnels. De plus, ce composé agit en ciblant à la fois la voie apoptotique et la voie autophagique. La Bafilomycine A1 induit la liaison de Beclin-1 à Bcl-2 et une inhibition de l'autophagie se produit <sup>263</sup>. Enfin, Vacuolin-1 est un inhibiteur similaire de l'ATPase, qui active également RAB5A (membre de la famille de l'oncogène RAS), conduisant à une machinerie autophagique dysfonctionnelle ayant des effets anticancéreux <sup>264</sup>.

La Chloroquine (CQ), l'Hydroxychloroquine (HCQ) et d'autres dérivés de la Chloroquine sont largement exploités pour leurs applications thérapeutiques dans le traitement du cancer <sup>265</sup>. La Chloroquine, un médicament approuvé par la FDA, est couramment utilisée dans le traitement du paludisme depuis plus de 60 ans <sup>266</sup>, mais son potentiel en tant que médicament anti-cancéreux a récemment été mis en évidence. CQ et HCQ sont des agents lysosomotropes qui désacidifient efficacement les lysosomes et les autophagosomes par perméabilisation de la membrane lysosomale, entraînant une augmentation du pH lysosomal <sup>267,268</sup>. Cette élévation du pH inhibe les étapes finales de l'autophagie, conduisant à une accumulation de vésicules autophagiques dans le cytoplasme, ce qui empêche la production et le recyclage des nutriments et des métabolites. Ceci entraîne des lésions cellulaires qui rendent les cellules tumorales plus vulnérables à l'action d'un médicament et à l'apoptose <sup>269 270</sup>. Par conséquent, l'exposition des cellules cancéreuses à la CQ peut entraîner une inhibition de la croissance tumorale et l'apoptose <sup>271,272</sup>. La CQ potentialise l'effet anticancéreux lorsqu'elle est utilisée en association avec différents médicaments anticancéreux dans le cancer du sein <sup>273</sup>, le cancer du côlon <sup>274</sup>, le gliome et le glioblastome <sup>275</sup>. Par exemple, à la fois dans le mélanome et dans les gliomes, des modèles précliniques d'inhibition de l'autophagie ont démontré leur capacité à surmonter la résistance aux inhibiteurs de BRAF (Sérine/thréonine kinase B-Raf) <sup>276,277</sup>. Mes travaux de maîtrise viennent également appuyer ces preuves en démontrant le rôle de l'inhibition de l'autophagie dans la sensibilisation des neuroblastes à la Cisplatine, la Vincristine et la Doxorubicine <sup>261</sup>.



Le profil d'innocuité de la CQ est bien connu en raison de décennies d'utilisation dans le cadre du traitement et de la prophylaxie du paludisme. La CQ a également été étudiée en association à des agents chimiothérapeutiques chez des patients cancéreux et a montré des niveaux de toxicité acceptables<sup>200</sup>. Dans notre projet, nous avons préféré utiliser l'HCQ au lieu de la CQ puisqu'elle produit moins d'effets secondaires que la CQ. Plus de 50 essais cliniques en cours évaluent les effets de divers traitements modulateurs de l'autophagie sur les tumeurs solides et hématologiques (NCT01494155, NCT01506973, NCT01828476, NCT01480154, NCT01897116).

Les rayonnements ionisants induisent l'autophagie via l'hypophosphorylation de mTOR<sup>278</sup>, mais PERK (*PKR-related Endoplasmic Reticulum Kinase*) peut également entraîner l'induction de l'autophagie après une irradiation<sup>279</sup>. La survie clonogénique après radiothérapie est réduite par la CQ, dans les lignées cellulaires de cancer du sein radorésistantes<sup>280,281</sup>. Le Tableau IV résume les effets de la modification de l'autophagie sur l'amélioration de la radiosensibilité ou de l'efficacité dans différents types de cancer<sup>282</sup>.

**Tableau IV – Effet de la modulation de l'autophagie sur l'amélioration de la radiosensibilité de différents types de cancers**

| Type de cancer     | Lignée cellulaire   | Type de modulateur de l'autophagie | La voie autophagique impliquée | Étude <i>in vivo</i> |
|--------------------|---------------------|------------------------------------|--------------------------------|----------------------|
| Glioblastome       | T98G+U373MG         | Rapamycine (+)                     | Inhibiteur de mTOR             | -                    |
|                    | SU2                 | NVP-BEZ235 (+)                     | Inhibiteur de PI3K/mTOR        | -                    |
|                    | U373MG              | CQ (-)                             | UPR (PERK)                     | +                    |
| Cancer du poumon   | H460                | RAD001 (+)                         | Inhibiteur de mTOR             | +                    |
|                    | H460                | Rapamycine (+)                     | Inhibiteur de mTOR             | +                    |
|                    | CDDP-Résistant H460 | NVP-BEZ235 (+)                     | Inhibiteur de PI3K/mTOR        | -                    |
| Cancer du sein     | MDA-MB-23+MCF-7     | RAD001 (+)                         | Inhibiteur de mTOR             | -                    |
|                    | MCF-7               | Rapamycine                         | Inhibiteur de mTOR             | -                    |
| Cancer colorectal  | HCT-116             | BCG/CWS (+)                        | MAPK (JNK/ERK)                 | +                    |
|                    | HCT116+HT-29        | CQ (-)                             | UPR (PERK)                     | +                    |
| Cancer du pancréas | MIA PaCa-2+PANC-1   | MG132 (+)                          | MAPK (JNK)                     | +                    |

*BCG/CWS, Mycobacterium bovis bacille Calmett-Guerin cell Wall Skeleton ; CQ, Chloroquine ; MG132, Carbobenzoxy-Leu-Leu-leucinal; NVP-BEZ235, Dactolisibn (imidazoquinoline) ; RAD001, Everolimus ; Tableau adapté de Tam et al. 2017<sup>282</sup>.*

## 2.2 La Radiothérapie par MIBG

### 2.2.1 La MIBG

Le NB est une tumeur radiosensible et la MIBG I131 permet de délivrer une irradiation ciblée avec peu d'effets sur les organes adjacents. L'iode 131 est un isotope radioactif émetteur de rayonnement bêta, en d'autres termes, ce sont des particules chargées négativement d'énergie variable (de 0 à 600 KeV.). Ces particules ont un parcours dans les tissus qui ne dépasse pas 2mm et délivrent leur énergie le long de ce parcours. Au niveau tissulaire, les lésions entraînées par ce radionucléide se font au niveau de la cellule qui le contient mais aussi les cellules voisines (effet *cross fire*). De ce fait, la distribution de la dose est donc très hétérogène. Au niveau cellulaire, on observe une diminution de la capacité des cellules tumorales à proliférer. Cela se traduit par un retard de la division, la formation de radicaux libres ou une mort cellulaire programmée. Au niveau moléculaire, des lésions de l'ADN sont produites directement par ionisation ou par l'interaction avec des radicaux libres <sup>283,284</sup>.

Plusieurs protocoles incorporant la MIBG I131 dans la prise en charge thérapeutique du NB sont actuellement en cours d'évaluation. Certaines études évaluent l'efficacité de l'administration de MIBG I131 associée à la chimiothérapie de consolidation avec réinjection de cellules souches hématopoïétiques chez des patients à haut risque. D'autres approches incluent l'administration de la MIBG I131 au diagnostic avant l'initiation de la chimiothérapie d'induction de façon à réduire le volume tumoral tout en évitant l'apparition de résistance précoce aux médicaments. Enfin, l'association du MIBG avec des médicaments radiosensibilisants ainsi que l'utilisation de radio-nucléotides autres que l'iode 131 sont en développement <sup>283</sup>.

## 2.3 Hypothèses et objectifs

Plusieurs études ont démontré le rôle de l'autophagie dans la progression tumorale et l'intérêt des inhibiteurs de l'autophagie en combinaison avec la chimiothérapie ou la radiothérapie dans divers types de cancers.

En se basant sur les résultats de recherches mentionnées précédemment, nous émettons l'hypothèse que la radiothérapie augmente l'autophagie des neuroblastes, ce qui les rend plus résistants à l'apoptose. Par conséquent, l'inhibition de l'autophagie pourrait augmenter la sensibilité des neuroblastes à la radiothérapie ciblée par MIBG.

Les objectifs de cette partie du projet sont de tester *in vitro* le rôle de l'autophagie dans la résistance du NB à la radiothérapie.

Il sera donc question d'examiner l'effet de l'irradiation sur les cellules du NB et de vérifier si les neuroblastes sont plus sensibles à l'irradiation à la suite de l'inhibition de l'autophagie par l'HCQ.

## 2.4 Matériels et méthodes

### *Culture cellulaire*

Les lignées cellulaires SK-N-AS, SK-N-DZ, SK-N-SH et SK-N-FI sont des cellules adhérentes qui proviennent de métastases de moelle osseuse de patients atteints de NB et ont été obtenues de l'American Type Culture Collection (ATCC). Les cellules IGR-N91 et IGR-NB8 proviennent de l'Institut Gustave Roussy (Villejuif, France) et dérivent aussi de métastases de moelle osseuse. Les lignées NB7-SJ et NB10-SJ proviennent de *St Judes chelidern's research hospital* (Memphis, É.U.).

La lignée SK-N-AS ne possède pas une amplification *MYCN* mais présente une LOH 1p et 11q ainsi qu'un gain 17q. La lignée SK-N-DZ contient une amplification *MYCN*, un gain chromosomique 17q ainsi qu'une LOH 11q. Les cellules SK-N-SH contiennent le gain 17q et la LOH 1p. Les cellules IGR-N91 et IGR-NB8 contiennent toutes deux l'amplification *MYCN*, la LOH 1p et le gain 17q. Les cellules sont maintenues à 37°C dans une atmosphère humidifiée composée de 5% de CO<sub>2</sub> et sont cultivées dans un milieu DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal (SVF) (Wisent Bioproducts, St-Bruno, QC). Les passages cellulaires ont été effectués une fois que les cellules atteignent 80 à 90% de confluence.

### *Traitement des cellules*

Les lignées cellules SK-N-AS, SK-N-DZ, SK-N-SH, IGR-N91, IGR-NB8 ainsi que les lignées NB10-SJ, NB7-SJ et SK-N-FI ont été traitées avec des doses d'HCQ (Millipore Sigma, ON, Canada) allant de 0 à 10 µM et ont été exposées à des doses uniques d'irradiation par rayons-X (Faxitron x-ray) allant de 0 à 50 Gy. Les cellules ont été ensuite analysées à 2, 4, 6, 24 ou 48h post-irradiation selon les conditions.

### *Extraction de protéines et immunobuvardage de type Western*

Les culots cellulaires ont été obtenus après centrifugation et ont été resuspendus dans 500 µl de tampon de lyse (10 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA,

1% Triton X-100, 0.5% P-40 Nonidet, 1 mM orthovanadate de sodium, 1 mM fluorure de sodium) et incubés 30 min à 4 °C. En utilisant le réactif Micro BCATM (Thermo Scientific, Rockford, IL, É.-U), la quantité de protéines contenu dans les lysats cellulaires a été déterminée. Une quantité de 20 µg de protéines par échantillon a été solubilisées dans un tampon de Laemmli, portées à ébullition durant 5 min, séparées par SDS-PAGE et transférées sur une membrane de polyvinylidene difluorure (PVDF). Les liaisons non spécifiques ont été bloquées par une incubation des membranes dans un tampon TBS (20 mM Tris-HCl (pH 7.4), 150 mM NaCl) contenant 3% d'albumine sérique bovine (BSA) durant 1h à température pièce. Les membranes ont été ensuite incubées avec les anticorps primaires anti-LC3B 1/3000 (ab65041, abcam), anti-p62/SQSTM1 (5114S, Cell Signaling) et β-actine 1/5000 (ab8227, abcam) toute la nuit à 4 °C. Une étape de lavage de 15 min des membranes de PVDF dans un tampon TBS (20 mM Tris-HCl (pH 7.4) ,150 mM NaCl) contenant 0.1% de Tween 20 a été effectuée. Les membranes PVDF sont ensuite incubées durant 1h avec des anticorps anti-lapin ou anti-souris conjugués à la peroxydase horseradish dilués dans 3% de BSA et suivi d'une seconde étape de lavage de 15 min dans un tampon TBS (20 mM Tris-HCl (pH 7.4),150 mM NaCl) contenant 0.1% de Tween 20. Des bandes immunoréactives sont visualisées à l'aide d'un système de détection à l'ECL (PerkinElmer, Waltham, MA, É.-U). La quantification des bandes détectées a été réalisée par densitométrie en utilisant *ImageJ 1.48v Software USA*.

### ***Transfection avec le plasmide ptLC3 et microscopie confocale***

Les cellules NB8-IGR ont été plantées à  $4 \times 10^5$ /puit dans des *chamber slides* (Thermo Scientific, Rochester, NY). Après 24h, les cellules ont été transfectés avec le plasmide ptfLC3 (monomeric red fluorescence protein (mRFP)-GFP tandem fluorescent-tagged LC3) en utilisant le X-tremeGENE HP DNA Transfection Reagent (Roche Applied Science, Hague Road, IN) selon les instructions du fabricant. Après 48h le milieu a été changé pour du DMEM 10% SVF qui contient ou non de l'HCQ (10µM) puis maintenue en incubation à 37 °C et 5% CO<sub>2</sub>. À 72h, les cellules ont été fixées avec du paraformaldéhyde à 3% durant 15 min suivie d'une perméabilisation cellulaire avec du 0.1% Triton X-100 pendant 5 min. Une étape de blocage des sites non spécifiques est réalisée dans du PBS 3% BSA durant 30 min, suite à quoi une coloration des noyaux a été effectuée en utilisant le Hoechst 33258 (Invitrogen, Eugene, OR). Les slides

ont été ensuite lavées avec du PBS puis visualisées avec le microscope confocal (the Ultraview Vox Confocal Imaging System, Perkin Elmer).

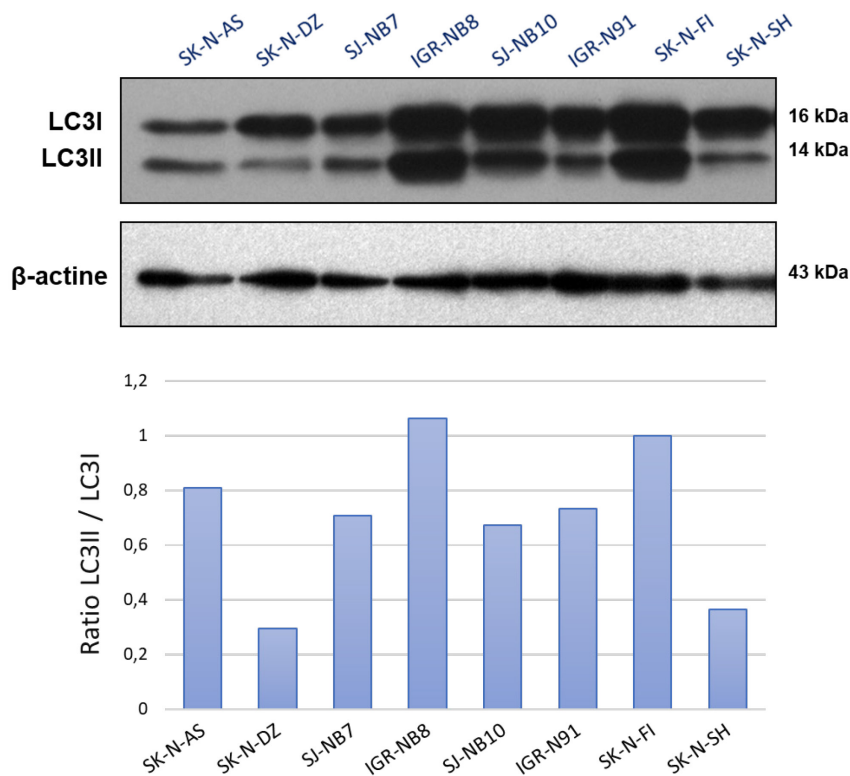
### ***Test clonogénique***

Les cellules ont été plantées dans des plaques de culture de 6 puits à une densité de 200, 400 et 600 cellules par puits. Après 24h, les cellules sont traitées ou non avec de l'HCQ à une concentration de 1 $\mu$ M. Après 48h, le milieu de culture est remplacé par du DMEM 10% SVF. Ensuite, les cellules sont irradiées avec des rayons-X à une dose de 0, 2 et 5 Gy. Les colonies sont colorées à l'aide de 0,01% (p/v) de cristal violet puis comptées 14 jours après l'irradiation. Une colonie est définie par un minimum de 50 cellules. Le calcul de la fraction de survie a été obtenu selon la formule : (le nombre de colonies comptées / le nombre de cellules plantées) / efficacité d'étalement. L'efficacité d'étalement étant (le nombre de colonies comptées de la condition contrôle / nombre de cellules plantées de la condition control) x 100.

## 2.5 Résultats

### 2.5.1 Les cellules du NB ont un niveau basal d'autophagie élevé

Afin de déterminer l'effet de l'irradiation sur la modulation de l'autophagie, nous avons d'abord vérifié le niveau d'autophagie dans les lignées cellulaires de NB. L'une des méthodes les plus utilisées pour mesurer l'autophagie est l'immunobuvardage de type western. En effet, LC3 est un marqueur de choix de l'autophagie qui peut prendre la forme LC3I (bande de 16 kDa) ou LC3II (bande de 14kDa). À l'état basal, LC3I est présent sous la forme soluble diffuse au niveau du cytoplasme. Une fois l'autophagie initiée, LC3I va se convertir en LC3II en se liant spécifiquement aux structures autophagiques (phagophores, autophagosomes et autophagolysosomes)<sup>285</sup>. Une fois le contenu des autophagosomes dégradé par les protéases lysosomales, LC3II est scindé et reprend la forme LC3I diffus dans le cytoplasme. La quantité de LC3II détectée par western blot est, par conséquent, proportionnelle au nombre d'autophagosomes présents dans la cellule. Le niveau d'autophagie est déterminé par le ratio de la densité de la bande LC3II sur LC3I. Nous avons constaté que LC3II est présent dans toutes les lignées de NB et que le ratio LC3II/LC3I est élevé dans la plupart des lignées de NB (**Figure 7**). La densité élevée de la bande LC3I témoigne également d'un recyclage rapide du LC3II. Ce résultat indique que plusieurs lignées cellulaires de NB affichent une activité autophagique élevée.



**Figure 7 | Le niveau d'autophagie dans les cellules du NB**

Les lysats de cellules SK-N-AS, SK-NDZ, SJ-NB7, IGR-NB8, SJ-NB10, IGR-N91, SK-N-FI et SK-N-SH ont été analysés pour l'expression de LC3I et LC3II par immunobuvardage de type Western. La  $\beta$ -actine a été utilisée comme témoin de charge. Les formes LC3I et LC3II ont été quantifiées par densitométrie.

### 2.5.2 L'irradiation n'augmente pas le niveau d'autophagie

En plus de LC3, d'autres substrats spécifiques de l'autophagie, tel que p62 (SQSTM1/Sequestome-1), peuvent être utilisés afin de mesurer l'autophagie. p62 est sélectivement incorporé dans le cargaison autophagique et efficacement dégradé par les protéases lysosomales<sup>286</sup>. Par conséquent, l'expression de p62 est inversement corrélée à l'autophagie.

Plusieurs situations de stress cellulaire sont connues pour induire l'autophagie, incluant les agents chimiothérapeutiques et la radiothérapie. De ce fait, nous avons examiné l'effet de l'irradiation sur le niveau d'autophagie des cellules du NB. Nos expérimentations indiquent que



l'irradiation n'augmente pas l'autophagie dans les cellules du NB. En effet, l'autophagie révélée par le ratio LC3II/LC3I n'est pas augmentée à la suite d'une dose d'irradiation de 5, 10, 20 et 50 Gy dans les lignées IGR-N91 et IGR-NB8. La présence de bandes p62 confirme également ce résultat sachant qu'une perte d'expression de p62 est indicative d'une activation de l'autophagie (**Figure 8. A et B**). Dans la lignée IGR-NB8, le ratio LC3II/LC3I est similaire entre les cellules non-irradiées et les cellules irradiées et ne semble pas être augmenté. Cependant, quoiqu'on observe une diminution de l'expression de la bande p62, cette perte d'expression est également observée dans les cellules contrôles.

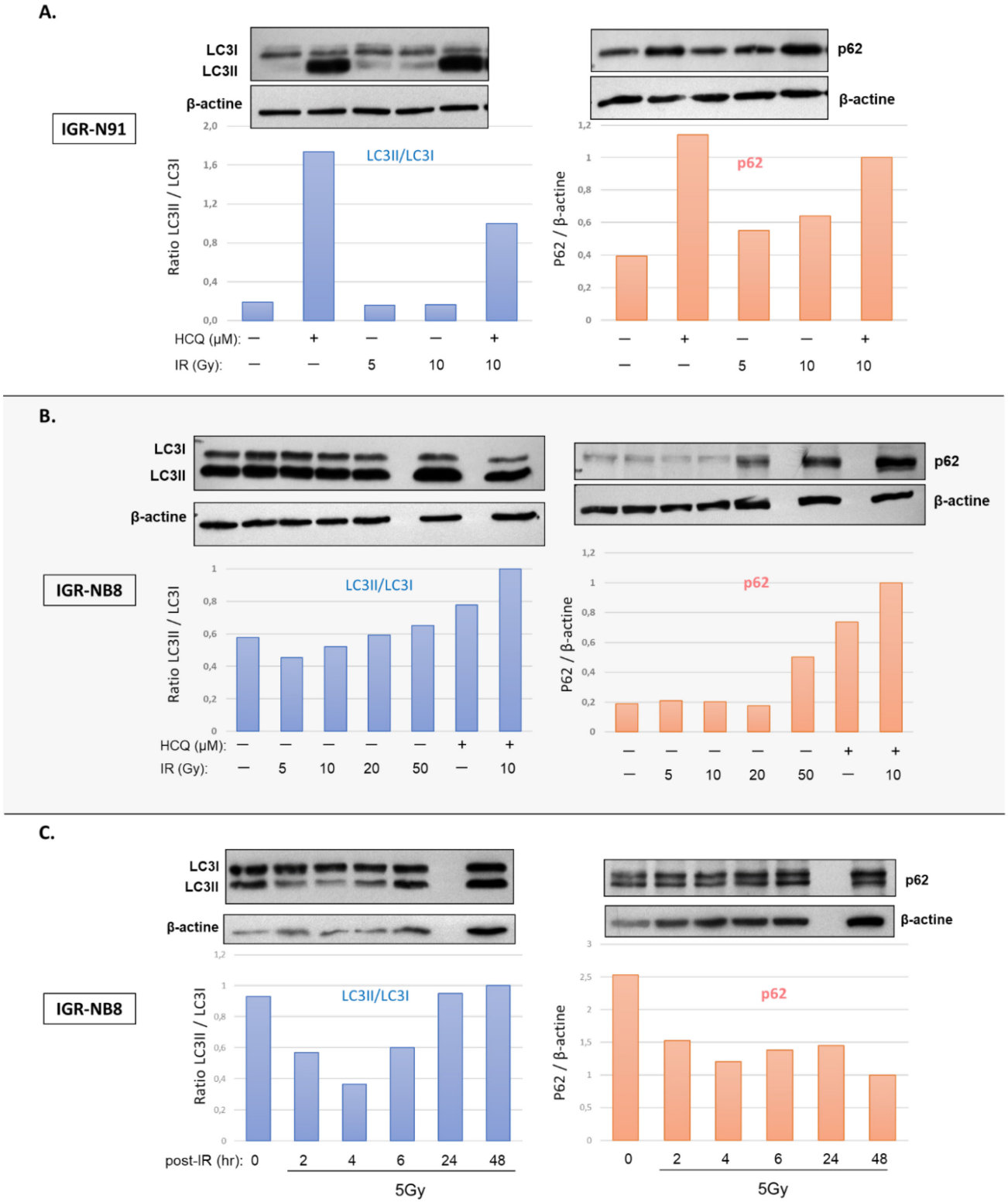
De plus, les cellules ont été traitées avec l'HCQ, un inhibiteur de la phase tardive de l'autophagie. En bloquant la dégradation de la cargaison autophagique grâce à une augmentation du pH lysosomal, une accumulation des autophagosomes dans la cellule se traduit par une augmentation de LC3II visible par western blot. En conséquence, après traitement à l'HCQ, l'augmentation du niveau de LC3II est due à l'inhibition tardive de l'autophagie qui ne permet pas le recyclage de LC3II. Nous avons observé une forte expression de LC3II dans les cellules traitées avec 10 $\mu$ M d'HCQ, ce qui démontre que l'HCQ est un inhibiteur efficace de l'autophagie dans les cellules de NB (**Figure 8A et 8B**).

L'autophagie étant un processus dynamique, nous avons quantifié le niveau d'autophagie sur une cinétique de 48 heures après l'irradiation. Nous n'avons pas observé de différence significative du ratio LC3II/LC3I entre les cellules non-irradiées et les cellules irradiées au cours du temps. En revanche, le niveau d'expression de p62 diminue quand les cellules sont irradiées à une dose fixe de 5Gy. Ces résultats suggèrent que l'irradiation des cellules de NB n'induit pas une augmentation significative de l'autophagie au cours des 48 heures post-irradiation (**Figure 8.C**).

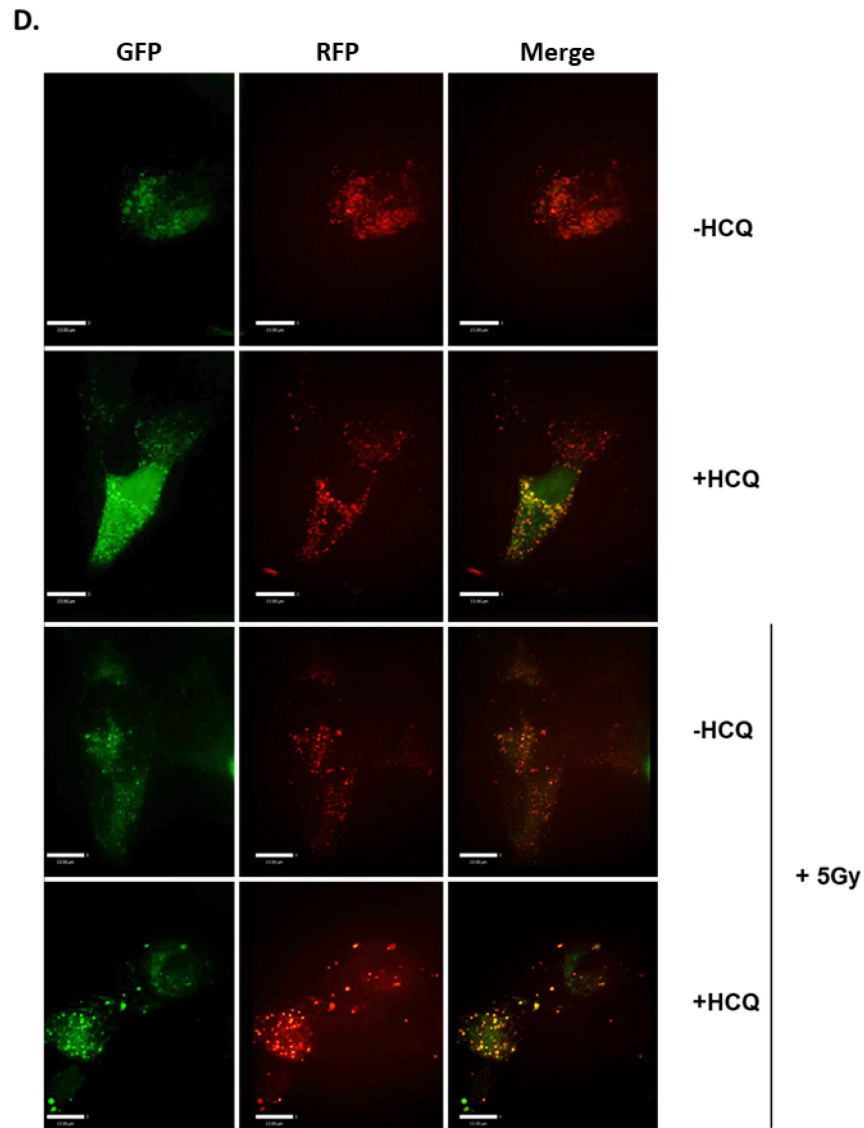
Pour confirmer les données précédentes et visualiser la dynamique des autophagosomes, nous avons procédé à la transfection de la lignée IGR-NB8 avec le plasmide ptfLC3 (LC3-GFP-RFP). Dans les conditions où l'autophagie est activée, le signal GFP est éliminé sous l'effet des protéases lysosomales et on observe seulement le signal RFP (autophagosomes sous forme de points rouges). Au contraire, quand l'autophagie est inhibée par l'HCQ, les signaux GFP et RFP sont visibles se traduisant par des autophagosomes jaunes. En réalité, ce signal jaune est généré par l'union des deux signaux vert et rouge témoignant ainsi du blocage de la fusion entre les

autophagosomes et les lysosomes. Les images obtenues par microscopie confocale confirment les résultats obtenus par immunobuvardage qui montrent que l'HCQ inhibe l'autophagie et que l'irradiation à dose de 5Gy n'augmente pas cette dernière (**Figure 8.D**).

En conclusion, nos résultats montrent une autophagie élevée dans les cellules du NB qui n'augmente pas sous l'effet de l'irradiation.



**Figure 8 | Effet de l'irradiation sur la modulation de l'autophagie**

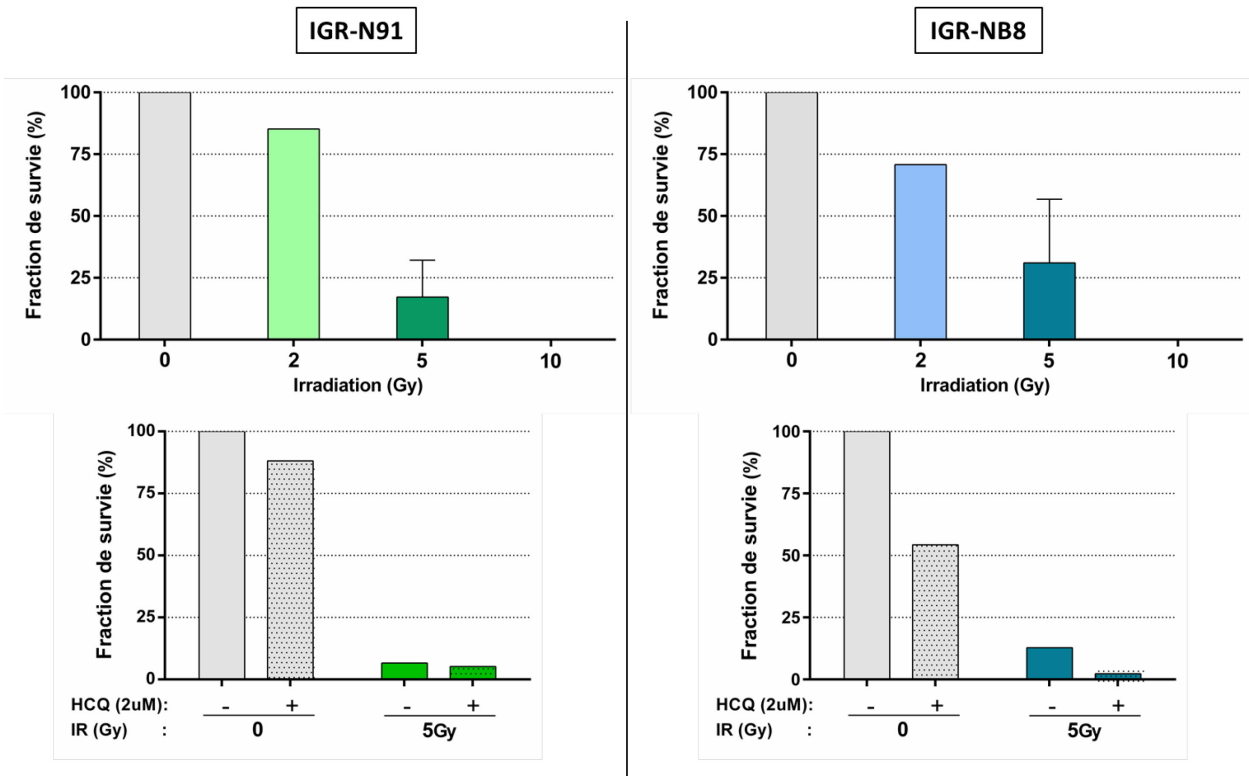


**Figure 8 | Effet de l'irradiation sur la modulation de l'autophagie**

(A.B) Les cellules IGR-N91 et IGR-NB8 ont été traitées, selon les conditions, avec 10  $\mu\text{M}$  d'HCQ seule ou en combinaison avec différentes doses d'irradiations aux rayons-X. Les lysats de cellules ont été ensuite analysés pour l'expression de LC3, p62 et la  $\beta$ -actine par immunobuvardage. Le ratio LC3II/LC3I et p62 ont été quantifiés par densitométrie. (C) Les lysats de cellules IGR-NB8 ont été récoltées à 2, 4, 6, 24 et 48h après exposition à une irradiation aux rayons-X de 5Gy. L'expression de LC3, p62 et la  $\beta$ -actine a été réalisée par immunobuvardage. Le ratio LC3II/LC3I ainsi que p62 a été quantifiée par densitométrie. (D) Une analyse par microscopie confocale a été réalisée sur des cellules IGR-NB8 transfectées avec le vecteur RFP-GFP-LC3 traitées, selon les conditions, avec 10  $\mu\text{M}$  d'HCQ durant 24h et exposées à une dose d'irradiation aux rayons-X de 5 Gy. (Échelle 5  $\mu\text{m}$ ).

### **2.5.3 L'HCQ ne sensibilise pas les neuroblastes à l'irradiation**

Nous avons ensuite examiné l'effet de l'inhibition de l'autophagie par l'HCQ sur la sensibilité des neuroblastes à l'irradiation. Pour ce faire, nous avons effectué des tests clonogéniques sur les lignées IGR-N91 et IGR-NB8. Le test clonogénique est le test le plus communément utilisé pour mesurer la capacité de prolifération (production de colonies) des cellules irradiées. Nos résultats montrent que les lignées IGR-N91 et IGR-NB8 sont hautement sensibles à l'irradiation (Figure 9). En effet, le nombre de colonies détectées après 5 Gy d'irradiation est très fortement diminué et pratiquement aucune colonie ne se forme après 10 Gy d'irradiation. Le blocage de l'autophagie par prétraitement des cellules avec l'HCQ ne diminue pas le nombre de colonies pour la lignée IGR-N91 mais diminue de moitié le nombre de colonies de la lignée IGR-NB8 (Figure 9). Ce résultat suggère un effet toxique de l'HCQ sur certaines lignées de NB. Lorsque les cellules de NB sont traitées à l'HCQ puis irradiées, le nombre de colonies ne diminue pas significativement en comparaison avec les cellules irradiées pour la lignée IGR-N91 mais diminue pour la lignée IGR-NB8 en raison de l'effet toxique de l'HCQ sur ces cellules. Ces résultats indiquent que les cellules de NB sont très sensibles à l'irradiation et que l'inhibition de l'autophagie n'apporte pas un gain significatif pour l'éradication des neuroblastes.



**Figure 9 | L’HCQ ne sensibilise pas les cellules de NB à l’irradiation**

Les lignées cellulaires IGR-N91 et IGR-NB8 ont été mis en culture à raison de 200, 400, 600 ou 1000 cellules par puits, traitées ou non à l’HCQ puis irradiées à une dose de 0, 2, 5 ou 10Gy, respectivement. Les cellules ont été fixées, colorées au Crystal violet puis comptées, 14 jours après l’irradiation. Une colonie est définie par un minimum de 50 cellules. Les tests clonogéniques sont représentés par le % de la fraction de survie.

## 2.6 Discussion

Les résultats préliminaires de cette première partie du projet de recherche a révélé l'inefficacité de l'HCQ à sensibiliser les cellules du NB à l'irradiation. En effet, nous avons montré que le niveau basal d'autophagie est élevé dans les cellules du NB, que l'irradiation n'augmente pas d'avantage le niveau d'autophagie des neuroblastes et que l'inhibition de l'autophagie par l'HCQ ne sensibilise pas les neuroblastes à l'irradiation. Ces données suggèrent que la modulation de l'autophagie en utilisant l'HCQ en combinaison avec la radiothérapie ne semble pas être présentement une approche efficace dans le traitement du NB.

Le rôle de l'autophagie dans le cancer reste à ce jour très controversé, néanmoins, le consensus penche en faveur du fait qu'une absence d'autophagie favorise la tumorigenèse (rôle suppresseur de tumeur) alors qu'une tumeur déjà établie utilise l'autophagie afin de maintenir sa survie (rôle pro-tumorale). En accord avec cette notion, nos résultats ont montré un niveau d'autophagie basal élevé dans plusieurs lignées cellulaires de NB. Cependant, une forte expression de la bande LC3I ou une absence de bande LC3II n'est pas forcément indicative d'une absence d'autophagie. En effet, l'activité ou le flux autophagique est un processus dynamique qui implique un recyclage du LC3. Ce concept, rend l'interprétation des résultats très complexe, d'où le besoin d'utiliser plusieurs méthodes de quantification ou de visualisation des autophagosomes tel que la microscopie électronique ou l'immunofluorescence. Aussi, l'utilisation de plusieurs témoins positifs et négatifs est importante pour permettre une analyse complète et justifiée. En effet, dans nos expérimentations un contrôle avec des cellules neuronales aurait été nécessaire afin de confirmer une augmentation du flux basal de l'autophagie. En examinant la littérature, il a été rapporté que l'autophagie est hautement régulée dans les cellules neuronales afin de préserver l'intégrité structurelle à travers les composantes axonales et dendritiques <sup>287</sup>. Ceci nous pousse à penser, qu'outre leur caractère malin, il est probable que les cellules du NB ont tendance à avoir une autophagie active due à leur origine neuronale.

Par ailleurs, plusieurs études ont également observé l'activation du flux basal de l'autophagie à travers la surexpression de LC3II ainsi que les protéines associées à l'autophagie dans plusieurs cancers incluant le glioblastome, le cancer de la vessie et le carcinome mammaire

<sup>288-292</sup>. Ces constatations ne sont pas surprenantes compte tenu des besoins élevés des cellules cancéreuses en nutriments et en énergie. En effet, ces cellules tumorales et particulièrement les tumeurs solides sont souvent confrontées à un microenvironnement défavorable caractérisé par un accès limité aux nutriments et par la présence de conditions hypoxiques. Les cellules tumorales vont ainsi augmenter l'autophagie afin de soutenir leur prolifération rapide et contrer un microenvironnement défavorable. Nos expérimentations *in vitro* ne reproduisent pas le microenvironnement tumoral, néanmoins, la culture des cellules adhérentes en surface 2D ainsi que les manipulations des cellules peuvent en effet induire un environnement de stress suffisant pour actionner l'autophagie.

L'irradiation, comme bien d'autres agents cytotoxiques qui induisent un stress cellulaire, augmente l'activité autophagique afin de recycler les organelles et protéines endommagées. Plusieurs études, dont mes travaux de maîtrise sur le NB <sup>261</sup>, ont démontré une augmentation de l'autophagie à la suite d'un traitement de chimiothérapie <sup>293</sup>. Cependant, notre étude présente a révélé que l'irradiation des NB à des doses allant de 5 à 20 Gy n'augmentent pas l'activité autophagique dans plusieurs lignées de NB. Le niveau d'autophagie déjà très élevé des NB pourrait expliquer l'absence d'augmentation en réponse à l'irradiation. Les mécanismes impliqués dans l'induction de l'autophagie par l'irradiation ne sont pas encore bien élucidés. Dans la littérature, un grand nombre d'études ont démontré que les agents chimiothérapeutiques induisent l'autophagie, toutefois, il y a eu une tendance à conclure de même pour l'irradiation. Dans notre étude, l'irradiation pourrait effectivement ne pas d'avantage augmenter du fait que le niveau basal d'autophagie soit initialement élevé.

Les images obtenues par microscopie confocale confirment nos résultats obtenus par western blot. Cependant, il est possible que notre analyse des données ait manqué de certains paramètres qu'il fallait prendre en considération. Tel que mentionné plus haut, l'interprétation des résultats par immunobuvardage est particulièrement complexe. Plusieurs recommandations fournis par des experts du domaine de l'autophagie ont été publiés récemment afin d'établir une interprétation plus juste des résultats en mettant l'accent sur l'importance de mesurer le flux autophagique au lieu de l'expression de LC3II <sup>294,295</sup>. Pour cela, l'introduction d'un inhibiteur tardif de l'autophagie est essentielle dans chaque condition de traitement. De plus, de nouvelles



méthodes de quantification du flux autophagique ont fait leur apparition comme la quantification par cytométrie de flux <sup>296</sup>.

Finalement, nos résultats ont montré que les lignées IGR-NB8 et IGR-N91 sont très sensibles à l'irradiation et que le prétraitement avec l'HCQ n'augmente pas la mort cellulaire induite par l'irradiation, même à de faibles doses. Bien que les NB soient radiosensibles, l'objectif de notre étude était de démontrer une augmentation de cette radiosensibilité grâce à un inhibiteur de l'autophagie afin de pouvoir réduire les doses d'irradiation et ainsi diminuer les effets secondaires de cette dernière. D'ailleurs, l'un des points majeurs qui limite l'utilisation de la radiothérapie est la présence d'effets secondaires qui menace d'autres organes. Notre approche visait donc la combinaison de la radiothérapie ciblée par MIBG et l'HCQ qui permettrait : 1) d'augmenter l'efficacité de la MIBG et 2) réduit la dose de cette dernière. Or, notre étude préliminaire n'a pas pu démontrer la faisabilité de cette approche.

À ce stade du projet, nous avons redirigé nos intérêts de recherches pour plusieurs raisons. En effet, les résultats d'un essai clinique de phase I/II sur le glioblastome venait d'être publiés et montraient un effet thérapeutique modeste de l'utilisation de la combinaison de l'HCQ, la radiothérapie et le temozolomide <sup>297</sup>. Bien que l'HCQ soit un puissant inhibiteur de l'autophagie *in vitro*, cet essai clinique a révélé que l'HCQ (600 mg/jour) n'inhibe pas l'autophagie chez les patients. En effet, en quantifiant LC3II dans les PBMC des patients, Rosenfeld *et al.* ont montré que l'autophagie n'est inhibée qu'à des niveaux dépassant la dose maximale tolérée (DMT) <sup>297</sup>. Un deuxième essai clinique de phase I dans le cancer du poumon a montré que la DMT est de 1 000 mg/jour quand elle est combinée à l'erlotinib à 150 mg/jour <sup>298</sup>. Ces données suggèrent que l'HCQ n'est pas un inhibiteur efficace de l'autophagie *in vivo*. De ce fait, l'absence d'un inhibiteur de l'autophagie à usage clinique ainsi que le manque de données précliniques sur l'effet de la modulation de de cette dernière particulièrement sur les cellules saines, place cette approche temporairement en attente de nouvelles avancées.

## 2.7 Conclusions et perspectives

Le rôle de l'autophagie dans la prolifération, la survie et les métastases des cellules cancéreuses fait que la modulation de l'autophagie par des inhibiteurs de l'autophagie reste une cible thérapeutique intéressante. Cependant, l'état actuel des connaissances sur le rôle de l'autophagie dans le cancer ainsi que les résultats des essais cliniques viennent temporairement freiner l'indication d'introduire cette approche en clinique. Plusieurs arguments viennent appuyer cette constatation. Premièrement, l'autophagie est un mécanisme complexe modulé par diverses conditions qui dépendent du contexte tumoral. L'autophagie peut, en effet, être cytoprotective ou, au contraire, associée à l'apoptose. Deuxièmement, l'absence d'un inhibiteur spécifique et efficace de l'autophagie en clinique limite l'utilisation de cette approche. L'utilisation de l'HCQ semblait prometteuse en raison de sa faible toxicité et de son profil pharmacologique établi dans le traitement du paludisme. Cependant, les preuves de son rôle dans l'autophagie aux doses administrées restent à établir. De plus, l'HCQ serait associée à une grande toxicité aux doses qui permettrait d'inhiber l'autophagie. Enfin, le manque d'expérimentations et d'études précliniques ainsi que le manque de méthodes qui permettent de mesurer efficacement l'autophagie *in vivo* font que l'application de cette approche en clinique est prématurée. En conclusion, une meilleure compréhension des conditions qui régissent la modulation de l'autophagie ainsi que le développement de nouveaux inhibiteurs de l'autophagie sont nécessaires avant d'envisager une utilisation thérapeutique de cette approche.

En effet, les progrès réalisés dans les méthodes d'études de l'autophagie nous amènent à reconsidérer notre approche expérimentale. En premier lieu, il serait important de reprendre les techniques d'études de l'autophagie en y apportant les mises au point nécessaires qui permettront une meilleure analyse des résultats. Par exemple, l'analyse par immunobuvardage devrait se baser sur la mesure du flux autophagique au lieu de l'état statique de l'autophagie en accompagnant chaque condition par un traitement avec un inhibiteur tardif de l'autophagie. Aussi, plusieurs lignées de NB devraient être utilisées en y incorporant plusieurs témoins positifs et négatifs. D'autres techniques comme la quantification de LC3 par cytométrie en flux pourrait également confirmer l'analyse par immunobuvardage. Actuellement, il est possible

d'utiliser des kits commerciaux destinés à la recherche pour l'étude de la dynamique de l'autophagie par cytométrie en flux.

Le test de viabilité cellulaire MTT (3-[4,5diméthyl-2-thiazolyl]-2,5-diphényl-2H-tétrazolium bromide) qui repose sur l'activité mitochondriale ne donnent pas une mesure précise de la viabilité cellulaire. Ce test avait été utilisé afin de déterminer les courbes doses réponses de l'HCQ et l'irradiation sur les lignées de NB. Celui-ci devrait être remplacé par un test de viabilité cellulaire tel que l'utilisation de l'iodure de propidium en cytométrie en flux. De plus, en utilisant le test clonogénique seulement deux lignées de NB (IGR-NB8 et IGR-N91) ont présenté la capacité à former des colonies. Par conséquent, ce test devrait être optimisé afin de pouvoir utiliser d'autres lignées de NB qui ne possèdent pas pour l'instant la capacité à former des colonies.

Dans un deuxième temps, le développement d'un nouvel inhibiteur de l'autophagie destiné à la clinique pourrait nous permettre de réaliser des expérimentations chez la souris. Ces études nous permettraient d'étudier l'autophagie *in vivo* et d'obtenir des informations cruciales sur l'effet des inhibiteurs de l'autophagie *in vivo* et sur l'efficacité de notre approche en suivant la progression tumorale du NB.

Enfin, nous avons montré dans notre étude que les lignées de NB sont sensibles à l'irradiation. L'utilisation de lignées cellulaires de NB résistantes à l'irradiation serait certainement nécessaire à la validation de notre hypothèse. Pour ce faire, nous utiliserons une méthode d'irradiation fractionnée aux rayons-X. En effet, des recherches ont montré la possibilité de générer des clones de cellules de NB résistants à l'irradiation en les soumettant à un régime d'irradiation répétitif<sup>299</sup>. Aussi, il serait intéressant d'examiner le rôle de l'inhibition de l'autophagie dans la sensibilisation des cellules initiatrices de tumeurs du NB à l'irradiation. Cette perspective représente un volet intéressant dont le but est de réduire les rechutes chez les patients.

# Chapitre 3 : L'immunothérapie basée sur les cellules NK pour traiter le NB à haut risque

## 3.1 Les cellules NK

### 3.1.1 Les cellules NK

Appartenant au système immunitaire inné, les cellules NK se différencient à partir de précurseurs de la moelle osseuse. Les cellules NK représentent environ 15% des lymphocytes en périphérie<sup>300</sup>. Contrairement aux lymphocytes T et B qui dépendent de la reconnaissance d'un antigène spécifique, les cellules NK sont capables d'une puissante activité cytotoxique sans une sensibilisation préalable. Phénotypiquement, les cellules NK expriment CD56 mais n'expriment pas CD3. De plus, basées sur l'expression de CD56, elles sont classiquement subdivisées en deux sous-populations CD56<sup>dim</sup> et CD56<sup>bright</sup><sup>301</sup>. Le sous-type CD56<sup>dim</sup> représente 80 à 90% des cellules NK du sang périphérique et expriment fortement le récepteur Fcγ III (CD16). Elles sont considérées comme des cellules NK cytotoxiques<sup>302</sup>. Les cellules CD56<sup>bright</sup> CD16<sup>dim</sup> se localisent dans les tissus lymphoïdes et représentent seulement 10% des cellules NK dans le sang périphérique. Ces dernières répondent efficacement à la stimulation par les cytokines et jouent un rôle d'immuno-modulation en produisant diverses cytokines comme l'IFNγ, le TNFα, l'IL-10, l'IL-3 et l'IL-5<sup>300,303</sup>.

### 3.1.2 Les récepteurs des cellules NK

Afin de distinguer les cellules saines des cellules infectées ou transformées, les cellules NK utilisent une batterie de récepteurs activateurs et inhibiteurs ainsi que des molécules d'adhésion et de costimulation exprimées à leur surface (Tableau V). Les récepteurs inhibiteurs détectent l'absence de molécules du soi sur des cellules cibles potentielles. En effet, le concept du « *missing self* » a été établi lors d'expérimentations qui ont démontré que les cellules NK lysent efficacement des lignées de lymphomes qui n'expriment pas les molécules du CMH de

classe I, aussi appelées les molécules HLA <sup>304</sup>. Par conséquent, une cellule saine qui exprime les molécules HLA à sa surface maintient une protection contre la cellule NK qui va rester inactive alors qu'une absence de ces molécules engendre l'activation des cellules NK. Inversement, les récepteurs activateurs reconnaissent des molécules de stress (*DAMP/ Damage-associated molecular patterns*) exprimées sur une cellule transformée ou qui a subi des dommages à l'ADN dues à des agents génotoxiques comme la chimiothérapie ou des irradiations, permettant ainsi une meilleure discrimination des cellules cibles <sup>305</sup>.

Les récepteurs inhibiteurs possèdent une partie cytoplasmique caractérisée par la présence de motifs ITIM (*Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibitory Motifs*) à travers lesquels la signalisation inhibitrice est véhiculée. Une fois que le signal est engagé, la phosphorylation de la tyrosine induit le recrutement des molécules SHP1 ou 2 (*Src homology 2 domain containing phosphatases*) <sup>306</sup>. Les récepteurs activateurs possèdent quant à eux des motifs ITAMs (*Immunoreceptor Tyrosine-based Activating Motifs*) et ne se localisent pas sur la queue cytoplasmique mais plutôt dans des molécules associées tel que (DAP-12) qui permettent une signalisation activatrice de la cellule NK. En effet, une fois que le récepteur est engagé et que le résidu tyrosine est phosphorylé, les molécules Syk (*Src homology 2 domain containing kinases*) ou ZAP70 sont recrutées, conduisant à une cascade de signalisation qui aboutit à la libération des granules cytotoxiques (dégranulation) et la transcription des gènes de cytokines et chemokines <sup>306</sup>.

### 3.1.2.1 Les Récepteurs de la superfamille des Immunoglobulines

Les KIR (*Killer Immunoglobulin-like Receptors*) sont une famille de glycoprotéines transmembranaires qui contient deux ou trois domaines (D) de type immunoglobuline (*Ig-like*) et possède soit une chaîne cytoplasmique longue (L) associée majoritairement à des KIR inhibiteurs ou au contraire à une chaîne cytoplasmique courte (S) associée à des KIR activateurs (Tableau V). Les gènes *KIR* sont hautement polymorphiques et l'expression de certains KIR spécifiques chez un individu semble être aléatoire, formant ainsi un répertoire nommé haplotype KIR, capable de distinguer les différents allotypes HLA-A, -B et -C <sup>307</sup>. La particularité des

récepteurs KIR réside dans le fait qu'il existe des KIR inhibiteurs qui possèdent un motif ITIM ou au contraire des KIR activateurs qui possèdent un motif ITAM.

Comme mentionné précédemment, la reconnaissance des molécules HLA par les KIR inhibent les cellules NK induisant ainsi une tolérance des tissus sains du soi. Cette tolérance est aussi reconnue comme un processus d'éducation de la cellule NK par la présence d'au moins un récepteur KIR spécifique à une molécule HLA du soi (*at least one hypothesis*)<sup>304</sup>. Cependant, cette hypothèse d'éducation des cellules NK peut ne pas être complètement vraie puisque les cellules NK peuvent exprimer certains KIR pour lesquels il n'existe pas de ligand HLA sur la cellule saine. Dans ce cas, au lieu d'attaquer la cellule saine, la cellule NK maintient sa tolérance soit en sous-exprimant ses récepteurs activateurs, soit en réprimant sa signalisation activatrice (cellule NK désarmée) ou encore par l'action inhibitrice d'une cellule immunitaire régulatrice, devenant ainsi hypo-réactive<sup>308,309</sup>. Les cellules du NB expriment de faibles niveaux de molécules HLA. Elles sont donc des cibles de choix pour les cellules NK dont les KIR inhibiteurs ne sont pas engagés<sup>310</sup>. De plus, un *KIR/HLA mismatch* (les cellules NK expriment des KIR spécifiques pour des molécules HLA qui sont absents) augmente l'activation des cellules NK contre la tumeur<sup>311</sup>.

**Tableau V - Les récepteurs des cellules NK**

| Récepteurs           | Ligands               | Type de récepteur |
|----------------------|-----------------------|-------------------|
| <b>KIR</b>           |                       |                   |
| KIR2DL1              | HLA-C2                | Inhib             |
| KIR2DL2/3            | HLA-C1                | Inhib             |
| KIR2DL4              | HLA-G                 | Act               |
| KIR2DL5              | -                     | Inhib             |
| KIR3DL1              | HLA-Bw4               | Inhib             |
| KIR3DL2              | HLA-A3                | Inhib             |
| KIR2DS1              | HLA-C2                | Act               |
| KIR2DS2              | HLA-C1                | Act               |
| KIR2DS3              | -                     | Act               |
| KIR2DS4              | -                     | Act               |
| KIR2DS5              | -                     | Act               |
| KIR3DS1              | HLA-Bw4               | Act               |
| <b>CD94-NKG2</b>     |                       |                   |
|                      | HLA-E                 |                   |
| NKG2A                |                       | Inhib             |
| NKG2C                |                       | Act               |
| NKG2E                |                       | Act               |
| <b>NKG2D</b>         |                       |                   |
|                      | MIC-A/B, ULBP1/2/3/4  | Act               |
| <b>NCR</b>           |                       |                   |
|                      | Hémagglutinine virale | Act               |
| NKp30                | BAT-3, HSPG, B7-H6    | Act               |
| NKp44                | HA virale, MLL5       | Act               |
| NKp46                | HA virale, HSPG       | Act               |
| NKp80                | AICL                  | Act               |
| LILR                 | CMH I, UL18           | Inhib             |
| 2B4                  | CD48                  | Act/inhib         |
| KLRG1                | Cadhérines            | Inhib             |
| <b>Costimulation</b> |                       |                   |
| DNAM-1               | PVR, CD112            | Act               |
| CD96                 | PVR                   | Act/Inhib         |
| TIGIR                | PVR, CD112, CD113     | Inhib             |
| <b>CD16</b>          |                       |                   |
|                      | FcγRIII               | Act               |

Act. Activateur ; *AICL*, Activation-Induced C-type Lectin; CD112, Nectine-2 ; *CMH*, Complexe majeur d'histocompatibilité ; D, domaine; *HA*, Hemagglutinin ; *HLA*, Human leucocyte antigens ; *Inhib*, inhibiteur ; *KIR*, Killer Immunoglobulin-like Receptor; L, Longue chaîne cytoplasmique ; *MICA/B*, Major histocompatibility complex class I-related chain A/B; *MLL5*, Mixed lineage leukemia-5 ; *PVR*, polio virus receptor (*CD155*); S, chaîne cytoplasmique courte; *ULBP*, *UL16-binding proteins*.

### 3.1.2.2 Les Récepteurs de la superfamille des Lectines de type-C

Les récepteurs de la famille des lectines de type-C sont des glycoprotéines transmembranaires de type II et ont en commun avec les récepteurs KIR la capacité de reconnaître les molécules HLA du soi. Cependant, contrairement aux récepteurs KIR, ils sont très peu polymorphiques<sup>312</sup>. Les plus connues sont le complexe hétérodimère CD94/NKG2A/C ou E et vont reconnaître les molécules HLA non classiques, HLA-E<sup>313</sup>. L'hétérodimère CD94/NKG2C et E sont associés à DAP-12 et sont donc des récepteurs activateurs. Le récepteur CD94/NKG2A est quant à lui associé au motif ITIM, ce qui en fait un récepteur inhibiteur. CD94/NKG2A et C reconnaissent le même ligand HLA-E sur la cellule du soi. Des hypothèses stipulent que l'existence de deux récepteurs, l'un inhibiteur et l'autre activateur pour le même ligand, a pour effet une meilleure discrimination entre les cellules saines et les cellules endommagées ou infectées<sup>314</sup>.

Peu similaire aux autres récepteurs NKG2, NKG2D ne forme pas un hétérodimère avec CD94, il est exprimé sous forme d'un homodimère associé aux molécules DAP-10 ou 12. En effet, c'est un récepteur activateur qui induit une production de cytokines ainsi qu'une réponse cytotoxique via DAP-12, induisant seulement une forte réponse cytotoxique via DAP-10<sup>315</sup>. NKG2D reconnaît une multitude de ligands de stress cellulaire dont l'expression résulte de la réponse aux dommages de l'ADN et la voie HSR (*Heat shock response*), souvent activée chez les cellules tumorales. Les ligands de NKG2D incluent MIC-A/-B (*MHC class I-related chain (MIC) family*) et les ULBP1,2, 3 et 4 (*UL16 binding protein*)<sup>316,317</sup>.

### 3.1.2.3 Les récepteurs de la cytotoxicité naturelle (NCR)

Les récepteurs naturels de cytotoxicité (NCR) NKp46, NKp80 et NKp30 sont exclusivement exprimés sur les cellules NK latentes ou activées. Le récepteur NKp44 est quant à lui uniquement exprimé sur les cellules NK activées en réponse à une stimulation à l'IL-2<sup>318</sup>. Ces récepteurs sont des glycoprotéines transmembranaires de type I appartenant à la famille des immunoglobulines qui reconnaissent une panoplie de ligands associés aux virus, parasites, bactéries ainsi que des ligands cellulaires<sup>319</sup>. On leur attribue un rôle majeur dans la cytotoxicité



contre les cellules tumorales, y compris les cellules du NB contre lesquelles les cellules NK induisent une forte lyse impliquant les récepteurs NCR <sup>320</sup>.

#### **3.1.2.4 La famille des molécules d'adhésions (récepteurs de costimulation)**

Seuls, ces récepteurs ne peuvent induire l'activation des cellules NK. Toutefois, leur action n'est pas négligeable puisque ce sont des régulateurs importants de la fonction effectrice des cellules NK. De tels récepteurs incluent les récepteurs DNAM-1 (CD226), CD96 (TACTILE) et TIGIT (*T cell immunoreceptor with immunoglobulin and ITIM domains*) qui lient des ligands de type nectine, *polio virus receptor* (PVR ou CD155) et Nectine-2 (CD112). Étant donné sa présence sur les cellules NK, les lymphocytes T et les monocytes <sup>321</sup>, DNAM-1 est le récepteur de costimulation le plus étudié. Aussi, outre sa fonction stimulatrice, il favorise la migration et l'adhérence avec les cellules cibles <sup>322</sup>. Contrairement aux autres récepteurs activateurs, DNAM-1 ne possède pas de motif ITAM mais subit cependant une phosphorylation de son domaine cytoplasmique dont résulte subséquemment une série de phosphorylations activatrices <sup>323</sup>. Dans le NB, DNAM-1 joue un rôle crucial dans la cytotoxicité des cellules NK. En effet, il a été montré que les neuroblastes dérivés de la moelle osseuse expriment généralement PVR alors que les patients en rechute montraient une faible expression de PVR. Ce résultat suggère une corrélation entre l'expression de PVR et la susceptibilité des neuroblastes aux cellules NK <sup>202</sup>.

Tandis que CD96 et TIGIT contiennent des motifs ITIM et donc considérés comme des inhibiteurs des cellules NK, il a été démontré que dans certains contextes CD96 aurait un double rôle en stimulant les fonctions activatrices des cellules NK <sup>324</sup>.

#### **3.1.2.5 CD16 (récepteur FcγRIII)**

Le récepteur CD16a est l'un des récepteurs d'activation les plus importants des cellules NK puisqu'il permet l'ADCC des cellules cibles à la suite de l'interaction avec la partie Fc d'un anticorps déjà engagé sur la cellule cible. Ceci conduit à la libération des granules cytotoxiques contenant la perforine et les granzymes et la production de l'IFN $\gamma$  <sup>325</sup>. Il contient un motif ITAM

qui permet la transduction du signal activateur <sup>326</sup>. Tel que mentionné précédemment, CD16 permet aux cellules NK de médier l'ADCC dans l'immunothérapie anti-GD2.

### **3.1.3 Le rôle des cellules NK**

Les cellules NK se distinguent par leurs fonctions cytotoxiques et de production de cytokines et chemokines qui leurs permettent de neutraliser les cellules infectées, endommagées ou transformées. En circulation dans le sang périphérique, elles sont en phase latente mais sont rapidement activées par des cytokines proinflammatoires et vont infiltrer les tissus qui contiennent les cellules cibles <sup>327</sup>.

#### **3.1.3.1 Les mécanismes de cytotoxicité**

Une fois que les signaux activateurs outrepassent les signaux inhibiteurs, la cellule NK va induire une cascade d'évènements conduisant à plusieurs voies cytotoxiques.

L'une des plus importantes est la libération des granules cytotoxiques qui consiste au relargage de protéases lytiques. Ce processus prend place à travers la mobilisation des microtubules qui conduit à la libération, dans l'espace de la synapse immunologique (jonction entre la cellule NK et la cellule cible), de la perforine, les granzymes et la granulysine. Ces médiateurs cytotoxiques vont aller s'introduire dans la cellule cible soit par l'action de la perforine, soit par le récepteur MPR (*Mannose 6-Phosphate Receptor*) et induire l'apoptose indirectement ou directement par la cascade des caspases ou par la voie mitochondriale <sup>328</sup>. En laboratoire, cette action est caractérisée par l'expression de la glycoprotéine transmembranaire lysosomiale CD107a à la surface de la cellule NK <sup>329</sup>.

L'autre principale voie de cytotoxicité induite par les cellules NK est l'interaction avec des récepteurs de mort cellulaire appartenant à la superfamille des TNF exprimés sur les cellules cibles. En réponse à une activation, les cellules NK expriment TRAIL (*Tumor-necrosis-factor related apoptosis inducing ligand*) et FASL et par conséquent, les cellules cibles qui expriment les récepteurs de mort cellulaire TRAIL-R1 (DR-4) ou TRAIL-R2 (DR-5) et FAS (CD95) respectivement, sont susceptibles à la lyse induite par les cellules NK <sup>330-332</sup>. Effectivement, il a été démontré que TRAIL est impliqué dans la lyse des cellules tumorales qui expriment les

récepteurs DR-4 ou DR-5 par les cellules NK activées <sup>333</sup>. Cette interaction va induire le recrutement de FADD (*Fas-associated death domain*) qui active la cascade apoptotique <sup>332</sup>. La caspase-8 va ensuite soit interagir avec d'autres procaspases pour induire l'apoptose, soit hydrolyser des protéines pro-apoptotiques comme BID qui va aller endommager la membrane mitochondriale et causer la libération du cytochrome-C <sup>334</sup>. De manière similaire, l'interaction de FASL (CD178) avec son récepteur FAS sur les cellules cibles va induire l'apoptose directement ou indirectement via la cascade apoptotique <sup>329,335</sup>.

### **3.1.3.2 Fonction de production de cytokines**

Tel que mentionné précédemment, les cellules NK CD56<sup>bright</sup> ont des propriétés intrinsèques qui leur permettent de produire des cytokines immunomodulatrices comme l'IFN $\gamma$ , le TNF $\beta$ , L'IL-10, L'IL-13 ainsi que le GM-CSF, CCL-3 et d'autres cytokines qui jouent un rôle important dans la réponse contre l'infection ou contre les cellules tumorales <sup>300</sup>. De plus, les cellules NK interviennent dans la maturation et la régulation des cellules dendritiques ainsi que la modulation de l'immunité adaptative à travers la production d'IFN $\gamma$  qui va promouvoir le caractère cytotoxique des lymphocytes T <sup>336</sup>.

### **3.1.4 La régulation des cellules NK**

Une grande panoplie de cytokines est capable de réguler l'homéostasie des cellules NK. Il n'est donc pas surprenant que plusieurs traitements anti-tumoraux utilisent des cytokines pour améliorer la réponse à l'immunothérapie en augmentant le nombre, l'activation ainsi que la persistance des effecteurs immunitaires. Ceci consiste soit en administrant directement des cytokines, soit en réalisant des transferts adoptifs de cellules NK prétraitées avec, entre autres, des cytokines. L'IL-2, l'IL12, l'IL-15, l'IL-18, l'IL-21 et l'IFN de type I sont des cytokines qui influencent la fonction, la prolifération ainsi que la maturation des cellules NK <sup>337</sup>.

L'IL-2 est l'une des cytokines les plus utilisées en clinique afin d'augmenter le nombre et l'activation des cellules NK <sup>338,339</sup>. Outre une amélioration modeste de la survie, cette cytokine est non seulement mal tolérée due à une grande toxicité, il est aussi de plus en plus admis qu'elle ne produit pas toujours les effets attendus. C'est aussi le cas dans le NB où une

récente étude a permis de démontrer que l'IL-2 n'améliore pas l'efficacité de l'immunothérapie anti-GD2<sup>340</sup>. À cet effet, l'IL-15 a été adoptée comme alternative à l'IL-2 puisqu'elle est plus efficace dans l'expansion des cellules NK et n'induit pas la prolifération des cellules T régulatrices qui peuvent en retour réprimer les fonctions effectrices des cellules NK<sup>341</sup>. Plusieurs essais cliniques témoignent de la tolérance de l'IL-15 et de son effet dans l'amélioration de la survie des patients<sup>342-344</sup>. Par ailleurs, L'IL-12 et l'IL-18 auraient des actions similaires sur les cellules NK. Elles ne possèdent pas une action directe dans l'activation des cellules NK mais induisent plutôt la production de cytokines tel que l'IFN $\gamma$  ainsi que la costimulation de l'activité cytotoxique<sup>345-347</sup>. Avec une toxicité relativement moindre que l'IL-2, l'IL-21 serait quant à elle caractérisée par son rôle dans la prolifération des cellules NK<sup>348</sup>. Plusieurs essais cliniques sont en cours afin d'examiner l'effet de l'IL-21 en combinaison avec d'autres agents thérapeutiques (NCT01629758, NCT01489059).

La famille des interférons de type I (IFN type I) secrétées par les cellules dendritiques sont également de puissants activateurs des fonctions cytotoxiques des cellules NK. Les cellules NK peuvent être stimulées par contact direct avec les cellules dendritiques et/ou par un ensemble de cytokines proinflammatoires secrétées par ces dernières (IL-12, IL-15, IL-18 et IFN type I)<sup>337</sup>. En réponse à une infection virale, plusieurs types de cellules peuvent sécréter les IFN de type I. Cependant, les cellules dendritiques plasmacytoïdes, un sous type de cellules dendritiques, sont spécialisées dans la production d'IFN de type I. En réponse aux IFN de type I, l'activité cytotoxique et la production de cytokines des cellules NK augmentent ainsi que l'expression de TRAIL à leur surface<sup>349-351</sup>.

### **3.1.5 Les cellules NK dans l'immunothérapie du NB**

Comme mentionné dans le chapitre 1 (Section 1.5 Traitements du NB), l'efficacité de l'immunothérapie anti-GD2 repose sur la toxicité médiée par le complément (CMC) ainsi que la cytotoxicité cellulaire médiée par les anticorps (ADCC). Les effecteurs cellulaires de l'ADCC sont les cellules NK et les granulocytes. Les cellules NK sont les lymphocytes du système immunitaire inné et sont capables d'une réponse cytotoxique puissante vis-à-vis des cellules cancéreuses ou infectées, sans une reconnaissance antigène-spécifique de leur cible. L'ADCC

médiée par les cellules NK implique la reconnaissance du fragment Fc de l'anticorps engagé sur la cible par le récepteur CD16a (FcRIIIa). L'engagement du récepteur CD16 induit la libération de granules cytotoxiques et la production de cytokines proinflammatoires comme l'IFN $\gamma$  conduisant à la lyse de la cellule cible <sup>325</sup>.

Les patients atteints de NB à haut risque sont traités par immunothérapie anti-GD2 environ 3 mois après leur transplantation de cellules souches autologues. Ce temps de latence est nécessaire pour une reconstitution hématopoïétique optimale. Il est clairement établi que les cellules NK sont les lymphocytes qui se reconstituent le plus rapidement après la transplantation <sup>352,353</sup>. En conséquence, les cellules NK sont les médiateurs principaux de l'efficacité de l'immunothérapie anti-GD2.

Par ailleurs, d'autres immunothérapies basées sur les cellules NK ont montré une activité anti-tumorale en clinique. Celles-ci incluent la stimulation *in vivo* des cellules NK par l'administration de cytokines telles que l'IL-2 et l'IL-15 ou encore le transfert adoptif des cellules NK autologues ou allogéniques à la suite de leur activation ou expansion <sup>157</sup>. En effet, une augmentation de la survie des patients atteints de NB a été associée à la présence d'un *mismatch KIR/HLA* lors de transferts adoptifs de cellules NK <sup>203,311,354</sup>.

Aussi, les immunocytokines ont pour rôle de potentialiser la réponse immunitaire en combinant l'effet généré par un mAb (ADCC et CDC) et la stimulation des effecteurs immunitaires grâce une cytokine telle que l'IL-2. Hu14.18-IL2 (fusion de l'mAb anti-GD2 avec l'IL-2) a également fait l'objet d'investigations au cours d'un essai clinique pour traiter le NB en rechute. Bien que certains patients aient eu une réponse partielle, ceux qui présentaient une masse tumorale n'ont montré aucune régression de la maladie <sup>355</sup>.

## **3.2 Les cellules dendritiques plasmacytoïdes**

### **3.2.1 Phénotype et fonctions des pDC**

Les pDC sont un sous-type de cellules dendritiques qui détectent les pathogènes et initient les premières phases de la réponse immunitaire innée et adaptative. Les cellules pDC

sont considérées comme des cellules spécialisées dans la production d'IFN de type I (IFN $\alpha$  et  $\beta$ ) en réponse à la stimulation de leurs récepteurs intracellulaires TLR (*Toll like receptor*) par l'ADN ou l'ARN viral. La quantité d'IFN de type I sécrétée est mille fois plus abondante comparée aux autres cellules immunitaires grâce à la présence d'une boucle autocrine qui permet d'augmenter la production d'IFN de type I<sup>356</sup>. Les pDC sont également en mesure de produire plusieurs cytokines et chemokines proinflammatoires comme le TNF $\alpha$ , l'IL-6, CXCL8 (*CXC-chemokine ligand-8*), CXCL10, CCL3 et CCL4. Elles jouent par conséquent un rôle essentiel dans l'initiation et la régulation des réponses immunitaires innées et adaptatives<sup>357</sup>.

Phénotypiquement, les pDC n'expriment pas les marqueurs de lymphocytes T, B et NK, à savoir CD3, CD19, CD14, CD16 et CD11c mais expriment cependant BDCA2 (CD303), HLA-DR et la chaîne alpha du récepteur à l'IL-3, CD123<sup>358,359</sup>. Les pDC ont autrefois été considérées comme des cellules spécialisées dans la production d'IFN de type I, sans capacité à présenter les antigènes. Récemment, des expériences de séquençage unicellulaire ont permis de mieux redéfinir l'identité des pDC et leurs fonctions. Ces recherches ont montré que certaines cellules sont capables de se différencier en CPA et sont incapables de production massive d'IFN de type I<sup>360-362</sup>.

### 3.2.2 Signalisation des récepteurs TLR

Situé dans le compartiment endosomal, le TLR-7 et TLR-9 sont les deux principaux récepteurs qui détectent les séquences d'acides nucléiques virales internalisées dans les pDC. Le TLR-7 reconnaît les séquences ARN virales et endogènes ainsi que les oligoribonucléotides synthétiques (ORN) tandis que le TLR-9 reconnaît les séquences dinucléotides non-méthylées CpG associées à l'ADN viral, l'ADN endogène ainsi que les oligodeoxyribonucléotides synthétiques (CpG-ODN). Une fois que la séquence virale ou endogène est transportée dans le compartiment endosomal, les récepteurs vont induire la production d'IFN de type I médiée par l'activation du facteur de transcription IRF7 (*Interferon regulatory factor 7*) de la voie MYD88-IRF7 (*Myeloid differentiation primary response protein 88*) et/ou la production de cytokines et chemokines proinflammatoires (TNF $\alpha$ , l'IL-6 et l'IL-8) médiée par la voie MYD88-NF- $\kappa$ B (*Nuclear Factor-kappa B*)<sup>357,363</sup>. La présence de récepteurs à l'IFN à la surface des pDC permet une amplification de la sécrétion de l'IFN de type I grâce à une boucle autocrine. En plus de

l'IFN de type I, la stimulation du TLR7 et du TLR9 induit la production de l'IFN de type III<sup>364,365</sup> qui serait impliqué dans l'augmentation de l'activité anti-tumorale des cellules NK<sup>366,367</sup>

### 3.2.3 Les ligands des TLR

Faisant partie des PRR (*pattern recognition receptors*), les récepteurs TLR sont une composante clé de la réponse immunitaire innée qui reconnaissent des motifs moléculaires hautement conservés, exprimés par les pathogènes (PAMP / *Pathogen-associated molecular pattern*), ainsi que les molécules de stress endogènes exprimées par les cellules transformées (DAMP)<sup>368</sup>. Ce sont des glycoprotéines transmembranaires de type I au nombre de 10 récepteurs chez l'humain (TLR1-TLR10) et sont constituées structurellement de trois parties : 1) un domaine LRR (*leucine-rich repeats*) responsable de la reconnaissance des PAMP ou DAMP, 2) un domaine transmembranaire et 3) un récepteur cytoplasmique Toll/IL-1 qui permet la transduction du signal intracellulaire à travers MYD88<sup>369</sup>. Le TLR2 reconnaît les peptidoglycanes et les lipoprotéines alors que le TLR3 est spécifique aux RNA double brin. Le TLR 4 est spécifique au LPS et les acides lipotéichoïques, le TLR5 reconnaît les flagellines bactériennes tandis que le TLR9 est spécifique au CpG (ADN)<sup>370</sup>.

Comme mentionné précédemment, TLR7 et TLR9 sont les seuls TLR exprimés par les pDC. Le TLR9 est également exprimé par les lymphocytes B. Plusieurs agonistes synthétiques des TLR7 (ORN) et TLR9 (CpG-ODN) ont été conçus pour les expérimentations en recherche ainsi que pour des fins thérapeutiques comme immunostimulateur<sup>371</sup>. À l'heure actuelle, il existe un agoniste synthétique du TLR7 nommé Imiquimode, approuvé par la FDA (*US Food and Drug Administration*). Cependant, sa formulation est uniquement destinée à un usage topique couramment utilisé pour traiter plusieurs types de mélanomes<sup>372</sup>. Toutefois, plusieurs agonistes du TLR9 (SD-101, DV281, CMP001, MGN1703, IMO-2055) ont été développés et utilisés par voie systémique comme adjuvant dans le traitement de plusieurs cancers<sup>373</sup> ainsi que pour d'autres maladies infectieuses<sup>374</sup> ou des allergies<sup>375</sup>. Il existe trois classes d'ODN : CpG ODN de classe A induisent une grande production d'IFN de type I et une expression modérée des molécules de costimulation, alors que les CpG ODN de classe B et C induisent une activation des lymphocytes B et une sécrétion modeste à modérée de l'IFN de type I par les pDC.

Cependant, due à sa structure phosphodiester, ces ODN sont facilement dégradés par les nucléases endogènes. Des travaux ont été amorcés afin de modifier la structure des ODN qui leur permettrait d'être résistants aux nucléases et d'avoir ainsi une demi-vie plus longue <sup>373</sup>. Malgré une certaine amélioration des réponses aux traitements utilisant les agonistes des TLR comme adjuvants, plusieurs effets indésirables ont été rapportés au cours des essais cliniques <sup>376</sup>. Par conséquent, d'autres progrès sont nécessaires afin de développer des agonistes des TLR stables et plus tolérables.

Une alternative aux agonistes du TLR serait une production de pDC *in vitro* qui serait destinée à l'usage thérapeutique. Ces pDC seraient activées *ex vivo* avec un agoniste du TLR et ensuite administrées aux patients par transferts adoptifs. En effet, notre laboratoire a développé un procédé unique de différenciation et d'expansion de pDC *in vitro*. Les pDC sont générées à la suite d'une culture de progéniteurs CD34<sup>+</sup> provenant de sang de cordon ombilical traités avec un cocktail de cytokines incluant le *FMS-like tyrosine kinase receptor 3 ligand* (FLT3-L), l'IL-7 et la thrombopoïétine (TPO). Après 14 jours de culture, un nombre de l'ordre de 10<sup>8</sup> de pDC (triées sur HLA-DR<sup>+</sup>CD123<sup>high</sup>) est obtenu <sup>365</sup>. Cette méthode de production de pDC *in vitro* permet surtout de remédier à la faible fréquence des pDC dans le sang périphérique qui empêchait, jusque-là, leur isolement en nombres suffisants pour les transferts adoptifs en clinique. <sup>365</sup>.

### 3.3 L'axe pDC-NK

L'induction des fonctions cytotoxiques des cellules NK dépendent de la reconnaissance des récepteurs activateurs exprimés par la cellule cible et de l'absence des ligands inhibiteurs. Cependant, des signaux supplémentaires permettent d'augmenter la réponse cytotoxique des cellules NK vis-à-vis de cibles tumorales. Les IFN de type I et de type III sécrétés par les pDC activées sont de puissants stimulants des fonctions des cellules NK <sup>366,367,377</sup>. En retour, les cellules NK induisent la maturation des pDC. Les pDC favorisent également la migration des cellules NK aux sites d'infections ou dans les tumeurs grâce à la production de chemokines se liant aux récepteurs CCR5 et CXCR3 <sup>378</sup>. La proximité des cellules NK et des pDC sur les sites de lésions favorise leurs interactions que ce soit par l'action des cytokines ou par contact direct <sup>379,380</sup>.



Le transfert adoptif des cellules dendritiques a été utilisé dans plusieurs stratégies de traitements par les vaccins contre le cancer afin d'induire une réponse T - antigène spécifique<sup>381,382</sup>. Une réponse a été observée chez les cellules NK à la suite de transferts adoptifs des cellules dendritiques myéloïdes<sup>383</sup>. Dans ce sens, notre approche est unique puisqu'elle vise à activer le potentiel anti-tumoral des cellules NK *in vivo* par le transfert adoptif de pDC activées. En effet, les pDC générées *in vitro* par notre laboratoire ont fait l'objet d'une étude plus approfondie où l'on a investigué leur rôle en reproduisant notre approche (pDC-NK) dans le traitement de la leucémie lymphoblastique aiguë (LAL). Effectivement, j'ai également participé à la génération des résultats de cette étude qui a pris la forme d'une publication jointe à la présente thèse dans la section Annexe<sup>365</sup>. Comparées aux pDC activées du sang périphérique, ces pDC induisent une meilleure lyse des cellules de la LAL médiée par les cellules NK et produisent plus d'IFN de type III. Nous avons également montré que les transferts adoptifs des pDC activées étaient capables de guérir les souris humanisées de la LAL<sup>365</sup>.

Nos recherches se basent sur l'importance de cet l'axe pDC-NK et de son potentiel dans la réponse cytotoxique des cellules NK vis-à-vis des cellules du NB lors de l'immunothérapie anti-GD2.

## Résultats

Les résultats de la deuxième partie du projet de recherche (l'immunothérapie basée sur les cellules NK pour traiter le NB à haut risque) sont inclus dans deux articles. Le premier a été publié dans le journal *PlosOne* durant l'année 2016 alors que le deuxième est en processus de soumission au journal *Cancer Immunology, Immunotherapy*.

### **3.4.1 Article 1 | BREAKING THE RESISTANCE OF NEUROBLASTOMA THROUGH ACTIVATION OF NATURAL KILLER CELLS BY PLASMACYTOID DENDRITIC CELLS**

#### **3.4.1.1 Préface**

En raison des fonctions anti-tumorales des cellules NK, plusieurs études ont exploré le rôle des cellules NK dans l'éradication des cellules du NB. Les recherches les plus récentes se sont essentiellement concentrées sur l'effet 1) des cellules NK haploidentiques post TCSH, 2) le transfert adoptif de cellules NK stimulées *ex vivo* ou expansées *in vitro* et 3) la stimulation des cellules NK *in vivo* par l'intermédiaire de cytokines telle que l'IL-2 dans l'immunothérapie anti-GD2.

Connaissant l'importance de l'axe pDC-NK dans la régulation des fonctions effectrices des cellules NK, nous avons émis l'hypothèse que la stimulation des cellules NK par les pDC activées avec un ligand du TLR9 est capable d'induire la lyse des neuroblastes et d'éliminer la maladie résiduelle. Dans cet article nous avons testé le potentiel de lyse des cellules NK activées par les pDC contre plusieurs lignées de NB et nous avons caractérisé le phénotype des cellules NK activées par les pDC. Cette partie du projet qui a été menée par Martine Cordeau, étudiante à la maîtrise. J'ai complété son travail en identifiant les mécanismes impliqués dans la réponse cytotoxique des cellules NK vis-à-vis des neuroblastes.

#### **3.4.1.2 Contribution des auteurs**

A Belounis a effectué et analysé les expérimentations *in vitro* qui avaient pour but d'étudier les mécanismes impliqués dans la cytotoxicité des cellules NK contre les cellules du NB, à savoir les résultats de la figure 4B, 4C ainsi que la figure 5. A Belounis a également participé à la relecture critique de l'article.

M Cordeau, S Herblot et M Duval ont mis en place le projet et la méthodologie de recherche, analysé les résultats et écrit l'article. M Cordeau a effectué les expérimentations, aidée conjointement par P Cordeiro et M Lelaidier. H Sartelet a effectué une analyse et une relecture critique de l'article. S Herblot et M Duval ont validé et supervisé le projet de recherche.

# Breaking the resistance of neuroblastoma through activation of natural killer cells by plasmacytoid dendritic cells

Martine Cordeau<sup>1,2</sup>, Assila Belounis<sup>1,2</sup>, Martin Lelaidier<sup>1,2</sup>, Paulo Cordeiro<sup>1</sup>, Hervé Sartelet<sup>5</sup>, Sabine Herblot<sup>1,3\*</sup> and Michel Duval<sup>1,2,3,4</sup>

<sup>1</sup> Groupe de Recherche En Transplantation et Immunologie du Sang de Cordon (GRETISC), Centre de cancérologie Charles-Bruneau, Centre de recherche du CHU Sainte-Justine, Montreal, Canada

<sup>2</sup> Department of Microbiology and Immunology, University of Montreal, Quebec, Canada

<sup>3</sup> Department of Pediatrics, University of Montreal, Quebec, Canada

<sup>4</sup> Department of Biomedical Sciences, University of Montreal, Quebec, Canada.

<sup>5</sup> Département d'anatomie et cytologie pathologiques CHU de Grenoble 38043 Grenoble Cedex 9, France

\* Corresponding author

**Keywords:** cancer stem cells, GD2, immunotherapy, natural killer cells, neuroblastoma, plasmacytoid dendritic cells, TRAIL

Correspondence address: Sabine Herblot

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

Phone: 514-345-4931, ext: 3910

[sabine.herblot@umontreal.ca](mailto:sabine.herblot@umontreal.ca)

**Cet article a été publié dans *PlosOne*. 2016. 11(10): p. e0164401.**

## ***Abstract***

High-risk neuroblastoma (NB) remains a major therapeutic challenge despite the recent advent of disialoganglioside (GD2)-antibody treatment combined with interleukin (IL)-2 and granulocyte monocyte-colony stimulating factor (GM-CSF). Indeed, more than one third of the patients still die from this disease. Here, we developed a novel approach to improve the current anti-GD2 immunotherapy based on NK cell stimulation using toll-like receptor (TLR)-activated plasmacytoid dendritic cells (pDCs). We demonstrated that this strategy led to the efficient killing of NB cells. When the expression of GD2 was heterogeneous on NB cells, the combination of pDC-mediated NK-cell activation and anti-GD2 treatment significantly increased the cytotoxicity of NK cells against NB cells. Activation by pDCs led to a unique NK-cell phenotype characterized by increased surface expression of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL), with increased expression of CD69 on CD56<sup>dim</sup> cytotoxic cells, and strong interferon- $\gamma$  production. Additionally, NB-cell killing was mediated by the TRAIL death-receptor pathway, as well as by the release of cytolytic granules via the DNAX accessory molecule 1 pathway. NK-cell activation and lytic activity against NB was independent of cell contact, depended upon type I IFN produced by TLR-9-activated pDCs, but was not reproduced by IFN- $\alpha$  stimulation alone. Collectively, these results highlighted the therapeutic potential of activated pDCs for patients with high-risk NB.

## ***Introduction***

Neuroblastoma (NB) is a tumor of the sympathetic nervous system and the most frequent extracranial pediatric solid tumor, occurring mostly in children before 5 years of age [1, 2]. Fifty percent of NB patients >1 year of age present a high-risk metastatic disease with poor prognosis. More than one-third of these patients with high-risk NB progress under treatment or relapse despite aggressive therapeutic regimens [3-7], and most of these children will ultimately die from this disease [8-10].

Natural killer (NK) cells play important roles in tumor immunity and tumor immune surveillance [11]. The antitumor functions of NK cells are tightly regulated by the balance of activating and inhibitory signals [12]. The interaction of NK cell-activating receptors such as DNAX accessory molecule 1 (DNAM-1) and natural killer group 2D (NKG2D), with their respective ligands expressed on tumor cells, poliovirus receptor (PVR) and Nectin-2 for DNAM-1, major histocompatibility complex class I-related chain A/B (MICA/B), and UL16-binding proteins (ULBPs) for NKG2D, triggers the release of cytolytic granules by NK cells, leading to tumor cell death. NK cell lytic functions increase following cytokine stimulation or interaction with activated dendritic cells. These stimulations lead to the expression of ligands for death receptors such as Fas ligand (FAS-L) and tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) by NK cells and then to apoptosis through death-receptor pathways. In contrast, NK-cell inhibitory signals are induced by the interaction of inhibitory killer immunoglobulin-like receptors (KIR) or the heterodimer NK group 2A/CD94 expressed by NK cells with human leukocyte antigen (HLA) class I molecules expressed by target cells.

Clinically available immunotherapy for NB is based on the use of monoclonal antibodies against the surface antigen disialoganglioside (GD2) combined with granulocyte/monocyte-colony

stimulating factor and interleukin (IL)-2 [7]. The efficacy of the anti-GD2 monoclonal antibodies relies not only upon complement activation, but also on antibody-mediated cellular cytotoxicity (ADCC) mediated by GM-CSF and IL-2-activated NK cells [13-19]. However, this approach has limitations. First, the use of IL-2 is associated with severe side effects. Secondly, IL-2 may not be the best cytokine to activate NK cells in patients as it increases proliferation of T regulatory cells, which could reduce NK-cell antitumor activity [20]. Additionally, NK-cell cytotoxicity is negatively regulated by inhibitory receptors recognizing self-HLA molecules on NB cells [21, 22]. These hindrances can explain why one third of the patients relapse after this treatment, underlying the need for alternative approaches to increase NK-cell toxicity against NB.

Tumor relapse and metastasis of NB correlate with the presence of cancer stem cells (CSCs) within the tumor [23-25]. CSCs possess functional characteristics of stem cells such as self-renewal, quiescence, and the ability to spread into multiple metastatic tumors. Therefore, CSCs are usually resistant to chemotherapy that targets actively cycling cells and are responsible for tumor relapse [26-32]. Thus, targeting CSCs is important when designing a novel NK cell-based immunotherapy. Encouragingly, CSCs are sensitive to immunotherapy and, in particular, NK cell-based immunotherapy, due to the expression of NK cell-activating receptor ligands on CSCs [33-36]. Although NB CSC model is complex, CD133 is a surface marker associated with the stem cell-like phenotype [37-41]. In particular, we previously demonstrated that CD133<sup>+</sup> SK-N-DZ NB cells are enriched in CSCs as assessed by gene expression analysis and orthotopic xenotransplantation in immunodeficient mice [23, 42, 43] Although not specific of NB CSCs, CD133 is thus currently the best available surface marker associated with NB stem cell-like phenotype.

Plasmacytoid dendritic cells (pDCs) are a specialized dendritic cell subset that orchestrates both innate- and adaptive-immune responses following infection challenge. In response to toll-like receptor (TLR) stimulation by viral RNA or DNA, pDCs produce high concentrations of type I interferons (IFNs), cytokines and chemokines that are strong activators of NK-cell lytic functions [44-47]. Therefore, pDCs are an attractive therapeutic tool to initiate NK cell-mediated antitumor responses.

In this study, we investigated whether TLR-activated pDCs induced NK-cell cytotoxicity against high-risk NB, including CD133<sup>+</sup> and GD2<sup>-</sup> cells. We explored the combination of activated pDCs and anti-GD2 antibody and determined the mechanisms of NB lysis by pDC-activated NK cells. Together, our results supported the hypothesis that patients with high-risk NB may benefit from NK-cell stimulation by activated pDCs to increase NK-cell lytic functions against NB cells.



## ***Materials and Methods***

### **NB cell lines**

SJNB-7 cell line was obtained from St. Jude Hospital (Memphis, TN, USA), and SK-N-AS and SK-N-DZ cell lines were purchased from American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA). SJNB-7 cells were derived from a primary adrenal gland tumor, while SK-N-AS and SK-N-DZ cell lines were derived from bone-marrow metastases from children with high-risk NB. All cell lines were cultured in Dulbecco's Modified Eagle Medium (Wisent Bioproducts, St-Bruno, Quebec, Canada) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS; Wisent Bioproducts) in a humidified atmosphere (5% CO<sub>2</sub>) at 37°C. Passages were performed when confluence reached 80 to 90%.

### **Isolation of peripheral blood NK cells and pDCs**

NK cells and pDCs were isolated from peripheral blood samples from healthy adult volunteers. Written informed consent was obtained from all participants in accordance with the Declaration of Helsinki after CHU Sainte Justine's Institutional Review Board approval. After peripheral blood mononuclear cell (PBMC) isolation by gradient centrifugation (Ficoll-Paque Plus, GE Healthcare, Pittsburgh, PA, USA), NK cells and pDCs were purified by negative magnetic selection (StemCell Technologies, Vancouver, BC, Canada) according to manufacturer instructions. The purity of the selected populations was assessed by flow cytometry and was always >95%.

### **NK cell stimulation**

Purified NK cells were cultured in RPMI-1640 (Invitrogen, Burlington, ON, Canada) supplemented with 10% FBS at a concentration of  $1 \times 10^6$  cells/mL in 96-well round-bottomed plates for 20 h. NK cells were either unstimulated or stimulated by IL-15 (20 ng/mL; Miltenyi

Biotec Inc., Auburn, CA, USA), IFN- $\alpha$  (1000 IU/mL; Merck, Kirkland, Quebec, Canada), or IL-2 (20 IU/mL; Novartis Pharmaceuticals Canada, Dorval, Quebec, Canada). For NK/pDC co-cultures, purified NK cells and pDCs were mixed at a ratio of 10:1 in the presence of CpG oligodeoxynucleotides (10  $\mu$ g/mL; ODN 2216; InvivoGen, San Diego, CA, USA). For trans-well experiments, NK/pDC co-cultures were performed in 24-well plates using ThinCert inserts (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Germany) with a 0.4- $\mu$ m pore size. For type I IFN-blocking experiments in NK/pDC co-cultures, non-specific binding sites were blocked by adding 2  $\mu$ g of mouse IgG2a, followed by the addition of mouse anti-human type I IFN-receptor chain 2 and anti-human IFN- $\alpha$  antibodies (20  $\mu$ g/mL each; PBL Assay Science, Piscataway, NJ, USA).

### **NK cell-mediated cytotoxicity assays**

NK cell-mediated cytotoxicity assays were performed by flow cytometry as described previously [48]. Briefly, NB cell lines were labeled with carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE) or 3,3'-dihexyloxacarbocyanine iodide<sub>(18)</sub>, and 10,000 labeled cells/well were plated in 96-well flat-bottomed plates and incubated overnight to allow cells to adhere. For ADCC experiments, anti-GD2 ch14.18 chimeric monoclonal antibody (mAb; 1  $\mu$ g/mL; National Cancer Institute, Rockville, MD, USA) was added to NB target cells before the addition of NK cells. For blocking experiments using monoclonal antibodies against TRAIL and DNAM-1, non-specific binding sites on NK cells were blocked using mouse isotype-matched IgG before the addition of anti-human TRAIL and/or DNAM-1 monoclonal antibodies (30  $\mu$ g/mL; BD Biosciences, Mississauga, ON, Canada). Unstimulated and activated NK cells were incubated in triplicate with target NB cells at different effector:target (E:T) ratios (1:1, 2.5:1, 5:1, and

10:1). After a brief centrifugation to ensure contact between effectors and targets, the plates were incubated at 37°C for 3 h. NB cells were then trypsinized and collected, counting beads and propidium iodide (PI; Invitrogen) were added to each sample, and viable NB cells were counted by flow cytometry using the BD Fortessa system (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). SK-N-DZ cells were stained with an anti-CD133-conjugated antibody (Miltenyi Biotec, Auburn, CA, USA). Data analyses were performed using the FlowJo program (Tree Star, Ashland, OR, USA), and the percentages of specific cell lysis were calculated using the following formula:

$$[(\text{Absolute number of CFSE}^+ \text{PI}^- \text{ cells in the control} - \text{Absolute number of CFSE}^+ \text{PI}^- \text{ cells in the sample}) / (\text{Absolute number of CFSE}^+ \text{PI}^- \text{ cells in the control})] \times 100 = \% \text{ of lysis}$$

### **Phenotypic analysis of NB cell lines and activated NK cells**

The phenotypes associated with SJNB-7, SK-N-AS and SK-N-DZ cell lines were assessed by flow cytometry using the following conjugated antibodies: HLA-ABC-phycoerythrin (PE) (BD Biosciences, San Jose, CA, USA), TRAIL-R1 (DR4, CD261)-allophycocyanin (APC), TRAIL-R2 (DR5, CD262)-PE (BioLegend, San Diego, CA, USA), CD95 (Fas/Apo-1)-fluorescein isothiocyanate (FITC) (BD Biosciences, San Jose, CA), CD178 (FAS-L, CD95L)-PE (Caltag, Burlington, ON, Canada), CD155-PE (PVR; BioLegend), Nectin-2-PE (CD112; BioLegend), MICA/B-PE (BioLegend), and ULBP-2-PE (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA). Dead cells were excluded by 7-AAD) staining (BD Pharmingen, Mississauga, ON, Canada).

Following overnight stimulation, NK cells were labeled with the following antibodies: CD69-FITC, CD95 (Fas)-FITC, CD16-FITC (BD Biosciences, San Jose, CA, USA), CD56-FITC, CD336 (NKp44)-PE (BioLegend), CD253 (TRAIL)-PE, CD178 (FAS-L)-PE, CD314

(NKG2D)-PE, CD16-PE/Cy7 (BD Biosciences, San Jose, CA, USA), CD56-APC, CD335 (NKp46)-Brilliant Violet 421, CD337 (NKp30)-Alexa Fluor 647 (BioLegend), CD96-PE/V770 (Miltenyi), DNAM-1-PE (CD226, BD Biosciences, San Jose, CA, USA), and dead cells were excluded using 7-AAD staining. For perforin and granzyme intracellular staining, NK cells were first stained with the CD56-APC antibody, then fixed and permeabilized with Cytoperm/Cytofix (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). Perforin-FITC and granzyme B-PE antibodies (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) were then incubated according to manufacturer instructions. All acquisitions were performed on a Fortessa cytometer (BD Biosciences, San Jose, CA, USA), and data analysis was performed using the FlowJo program (Tree Star).

### **NK cell-degranulation assay**

Degranulation assays were performed as previously described [49]. Briefly, activated NK cells and target cells were mixed at a 1:1 ratio in the presence of the CD107a-PE antibody (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) and incubated for 1 h at 37°C. GolgiStop (6 µg/mL; BD Biosciences, San Jose, CA, USA) was then added, and cells were incubated for an additional 4 h at 37°C. When required, NB target cells were first incubated with ch14.18 anti-GD2 mAb (1 µg/mL) before the co-culture with NK cells. After staining with CD56-APC antibody and addition of 7-AAD, surface expression of CD107a was assessed using a Fortessa cytometer (BD Biosciences), and data analysis was performed using the FlowJo program (Tree Star).

### **Statistical analysis**

One-way analysis-of-variance tests were used for multiple-group comparisons of paired data, and paired *t* tests were used for single-data comparisons. A  $p < 0.05$  (\*) was considered significant with a confidence interval of 99% (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

## ***Results***

### **NK cells stimulated with activated pDCs kill both CD133<sup>+</sup> and GD2<sup>-</sup> NB cells**

NB are heterogeneous tumors with various phenotypes as exemplified by the diversity of GD2 and CD133 expression on NB cell lines derived from patients with high-risk NB (**Fig 1A**). We selected three NB cell lines (SK-N-DZ, SK-N-AS, and SJNB-7) that differed in their expression of GD2 and CD133 surface markers. We tested the ability of unstimulated or pDC-activated NK cells to kill these NB cell lines using *in vitro* cytotoxicity assays. In the absence of NK-cell activation, all three NB cell lines were resistant to NK cell-mediated lysis. Co-culture of NK cells with TLR-9-activated pDCs significantly increased the killing of NB cell lines, including GD2<sup>-</sup> SJNB-7 cells (**Fig 1B**). Within the SK-N-DZ cells, CD133<sup>+</sup> CSCs exhibited similar sensitivity levels as those observed in CD133<sup>-</sup> cells to NK cell-mediated lysis when NK cells were stimulated by activated pDCs (**Fig 1C**). These results demonstrated that, following co-culture with TLR-9 stimulated pDCs, NK cells acquired the capacity to eradicate NB cells, including CSCs and GD2-negative cells.

### **Fig 1: NB resistance to NK cell-mediated killing is overcome by NK-cell stimulation with TLR-9-activated pDCs.**

A – Phenotypic characteristics of selected NB cell lines. CD133 and GD2 expression were assessed by flow cytometry.

B – *In vitro* cytotoxicity assays were performed against SK-N-DZ, SK-N-AS, and SJNB7 NB cell lines. NK cells and pDCs were purified from peripheral blood samples, and NK cells were stimulated with TLR9-stimulated pDCs for 18–24 h prior to the assays. Graphs represent the

mean of specific lysis observed in three to five experiments, with error bars representing the standard error of the mean.

C – To determine the sensitivity of CSCs to NK cell-mediated killing, SK-N-DZ cells were stained with the anti-CD133 mAb after a 3-h incubation with activated NK cells. Specific lysis of CD133<sup>+</sup> and CD133<sup>-</sup> SK-N-DZ cells was determined. Graphs represent the mean of specific lysis observed in three to five experiments, with error bars representing the standard error of the mean.

Statistical analyses were performed using one-way analysis of variance. \*  $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ .

CD, cluster of differentiation; CSC, cancer stem cell; GD2: disialoganglioside; NB, neuroblastoma; NK, natural killer; pDC, plasmacytoid dendritic cell; TLR, toll-like receptor.

### **The additive effect of activated pDCs and anti-GD2/IL-2 on NK cell-mediated killing of NB cells in the presence of heterogeneous expression of GD2**

Using cytotoxic and degranulation assays, we next compared anti-GD2-targeted ADCC mediated by IL-2-stimulated NK cells with the cytotoxicity levels initiated by pDC-activated NK cells. pDC-activated NK cells and anti-GD2-targeted ADCC were equally efficient at killing GD2-expressing SK-N-DZ cells (**Fig 2A**). The combination of anti-GD2 mAb with pDC-mediated activation of NK cells did not increase SK-N-DZ lysis, although there was an additive effect of GD2/IL-2- and pDC-activation on granule release against SK-N-DZ cells as measured by CD107a expression on NK cells (**Fig 2B**). As expected, anti-GD2-mediated ADCC was inefficient at killing GD2-negative SJNB-7 cells, and these cells did not induce granule release

by NK cells. Interestingly, these GD2-negative cells were killed by pDC-stimulated NK cells, thereby inducing cytotoxic granule release by pDC-activated NK cells (**Fig 2A and 2B**).

Finally, we compared anti-GD2-mediated ADCC, pDC activation, and their combination in the killing of SK-N-AS cells, a NB cell line exhibiting heterogeneous expression of GD2 (**Fig 2A**). The efficacy of anti-GD2-mediated ADCC was much lower than that observed on GD2-positive cells, and SK-N-AS cells were sensitive to NK cells stimulated by activated pDCs. Interestingly, we observed increased killing of SK-N-AS cells by the combination of anti-GD2-mediated ADCC and pDC-mediated NK-cell activation (**Fig 2A**). This additive effect of ADCC and pDC-mediated NK-cell activation was associated with an increased release of cytotoxic granules (**Fig 2B**). Therefore, our results demonstrated that activated pDCs and anti-GD2-targeted ADCC exert an additive effect for the killing of a cell line with heterogeneous expression of GD2, leading to NB cell death comparable to that observed in a GD2-positive cell line.

**Fig 2: Additive effects of anti-GD2 mAb, ADCC, and pDC-activated NK-cell cytotoxicity against NB cells.**

A – Cytotoxicity assays were performed against SK-N-DZ, SJNB-7, and SK-N-AS cell lines in the presence or absence of prior incubation of target cells with the anti-GD2 mAb. Effectors were either unstimulated NK cells (NS), NK cells stimulated by overnight incubation with TLR-9-activated pDCs (a-pDC), or NK cells stimulated by low doses of IL-2 alone (IL2/GD2 mAb) or in combination (IL2/GD2 mAb+a-pDC). Graphs present the specific lysis means of three independent experiments, with error bars representing the standard error of the mean.

B – NK cell-degranulation assays were performed against SK-N-DZ, SJNB7, and SK-N-AS cells. Unstimulated NK (NS) and stimulated NK cells (a-pDC, IL2/GD2 mAb, or IL2/GD2

mAb+a-pDC) were incubated with target cells at a 1:1 ratio and stained with the anti-CD107a antibody. Graphs represent the means of CD107a MFIs on NK cells (gated on CD56<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup>) in three independent experiments.

Statistical analyses were performed using one-way analysis of variance. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ .

ADCC, antibody-dependent cellular cytotoxicity; CD, cluster of differentiation; GD2: disialoganglioside; IL, interleukin; mAb, monoclonal antibody; MFI, mean fluorescence intensity; NB, neuroblastoma; NK, natural killer; pDC, plasmacytoid dendritic cell; TLR, toll-like receptor.

### **Activated pDCs induce CD69 and TRAIL expression, as well as IFN- $\gamma$ production in NK cells**

To determine the mechanisms responsible for NK cell-mediated lysis of NB tumors, we assessed the phenotype of NK cells stimulated by either TLR-9-activated pDCs, IFN- $\alpha$ , or IL-15. Here, we used IFN- $\alpha$  concentrations (1000 IU/mL) expected to be produced by activated pDCs ( $4 \times 10^4$  cells) in the corresponding experiments [50]. We observed that the upregulation of the CD69-activation marker was significantly enhanced following NK-cell stimulation with TLR-9-activated pDCs as compared to that observed following IFN- $\alpha$  or IL-15 stimulation (**Fig 3A**). Interestingly, this upregulation of CD69 expression was observed in all CD56<sup>dim</sup>, but not in CD56<sup>bright</sup> NK cells, whereas CD69 expression was upregulated in only a fraction of CD56<sup>dim</sup> (30–70% of cells, depending on the donors) and all CD56<sup>bright</sup> NK cells upon IFN- $\alpha$  and IL-15 stimulation (**Supplemental Fig S1**).



TLR-9-activated pDCs induced a significantly higher expression of TRAIL on NK cells as compared with that observed following stimulation with IFN- $\alpha$  or IL-15 (**Fig 3B**). FAS-L was not expressed on pDC-activated NK cells (**Supplemental Fig S2**), and natural cytotoxicity receptors (NKp44, NKp46, or NKp30), NKGD2, granzyme B and perforin were not upregulated (**Fig 3C** and **Supplemental Fig S2**).

Finally, we observed increased production of IFN- $\gamma$  by NK cells stimulated by TLR-9-activated pDCs, while IFN- $\alpha$  stimulation did not induce IFN- $\gamma$  secretion by NK cells (**Fig 3D**). Collectively, these results indicated that the co-culture of NK cells with TLR-9-activated pDCs induced a unique activated phenotype that cannot be reproduced by IFN- $\alpha$  or IL-15 stimulation alone and is characterized by increased secretion of IFN- $\gamma$ , high levels of CD69 expression on CD56<sup>dim</sup> cells, and high levels of surface expression of TRAIL on both CD56<sup>bright</sup> and CD56<sup>dim</sup> cells.

**Fig 3: TLR9-stimulated pDCs induce a unique NK-cell phenotype and IFN- $\gamma$  production.**

A–C – Phenotype analysis of NK cells following overnight stimulation with IL-15, IFN- $\alpha$ , or co-culture with TLR9-stimulated pDCs. Graphs represent the means of MFIs for (A) CD69, (B) TRAIL, and (C) NKG2D immunostaining, with error bars representing the standard error of the mean from five to eight experiments on NK cells from different donors.

D – IFN- $\gamma$  production was measured by ELISA in the supernatant of NK-cell cultures following overnight stimulation. The means of four to six independent experiments are represented, with error bars representing the standard error of the mean.

Statistical analyses were performed using one-way analysis of variance. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ .

CD, cluster of differentiation; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; IFN, interferon; IL, interleukin; MFI, mean fluorescence intensity; NK, natural killer; NKG2D, natural killer group 2D; pDC, plasmacytoid dendritic cell; TLR, toll-like receptor; TRAIL, tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand.

### **NK-cell activation by TLR-9-activated pDCs is independent of cell contact**

We next explored whether soluble factors secreted by activated pDCs or cellular contact between activated pDCs and NK cells was required for NK-cell activation. Levels of NB cell lysis were similar when NK cells and pDCs were cultured in contact or separately in trans-well experiments (**Fig 4A**). This result indicated that soluble factors secreted by TLR-9-activated pDCs are responsible for NK cell-mediated cytotoxicity against NB.

### **NK-cell lytic activity against NB depends upon IFN- $\alpha$ production by TLR-9-activated pDCs, but is not reproduced by IFN- $\alpha$ stimulation alone**

We then determined the role of type I IFNs in NK-cell stimulation by TLR-9-activated pDCs. We blocked type I IFN signaling using a combination of blocking antibodies against IFN- $\alpha$  and type I IFN receptors. Type I IFN blockade completely abrogated NB cell lysis by pDC-activated NK cells (**Fig 4B**). To investigate whether NB killing by NK cells was entirely due to IFN- $\alpha$  production by pDCs, we stimulated NK cells with the amount of IFN- $\alpha$  expected to be produced by the  $4 \times 10^4$  pDCs used in the control experiments. Under these conditions, we observed that NB cell lysis was lower when NK cells were directly activated by IFN- $\alpha$  (**Fig 4C**). These results indicated that NK-cell lytic activity against NB depends upon type I IFN produced by TLR-9-activated pDCs, but is not reproduced by IFN- $\alpha$  stimulation alone.

**Fig 4: NK-cell activation is independent of contact with pDCs, but depends upon type I IFN production by activated pDCs.**

A – Analysis of NK-cell cytotoxicity following NK-cell activation with TLR9-stimulated pDCs in contact or in trans-wells. Graphs are representative of three independent experiments.

B – Blocking of type I IFN signaling was performed using specific blocking mAbs against IFN- $\alpha$  and type I IFN receptor in NK/pDC co-cultures, followed by cytotoxicity assays performed against SK-N-DZ cells. The graph represents the means of three independent experiments, with error bars representing the standard error of the mean.

C – Analysis of NK-cell cytotoxicity following NK-cell activation with TLR9-stimulated pDCs (a-pDC) or IFN- $\alpha$  (1000 IU/mL). The IFN- $\alpha$  concentration was comparable to that estimated under both conditions. Specific lysis of SK-N-DZ, SK-N-AS, and SJNB-7 cells are presented for an E:T ratio of 5:1.

Statistical analyses were performed using one-way analysis of variance. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ .

E:T, effector against target; IFN, interferon; IL, interleukin; mAb, monoclonal antibody; NK, natural killer; pDC, plasmacytoid dendritic cell; TLR, toll-like receptor.

**The TRAIL and DNAM-1 pathways are involved in NB killing by pDC-activated NK cells**

We investigated the role of NK cell-activating receptors, DNAM-1 and NKG2D, as well as death receptor-mediated apoptosis in NK cell-mediated lysis of NB cells using blocking experiments. We observed that all three NB cell lines expressed high levels of DNAM-1 ligands

(PVR and Nectin-2) (**Fig 5A–C**). Accordingly, blocking the interaction between DNAM-1 and its ligands abrogated NK cell-mediated killing of SK-N-AS and SJNB7 cells (Fig 5A and B) and significantly decreased SK-N-DZ cell lysis (**Fig 5C**).

All three cell lines expressed high levels of both TRAIL receptors, TRAIL-R1 and TRAIL-R2 (**Figure 5**). We observed that blocking TRAIL interaction with TRAIL-R1 and TRAIL-R2 abrogated NK cell-mediated killing of SK-N-AS and SJNB7 cells and significantly decreased SK-N-DZ cell lysis (**Fig 5A-C**). Additionally, NKG2D ligands (MICA/B and ULBP2) were expressed at low levels on SK-N-DZ and SJNB7 cells and were almost absent on SK-N-AS cells. Although NKG2D blockade alone did not decrease SK-N-DZ killing, the complete inhibition of cell lysis required blockage of TRAIL, DNAM-1, and NKG2D. Therefore, our findings suggested that multiple lytic pathways are engaged by pDC-activated NK cells to kill NB tumors, and that the relative role of each pathway depends upon the expression of NK-receptor ligands on target cells.

**Fig 5: The TRAIL and DNAM-1 pathways are involved in NB killing by pDC-activated NK cells.**

Cytotoxicity assays against (A) SK-N-AS, (B) SJNB-7, and (C) SK-N-DZ cells were performed in the presence of DNAM-1-, TRAIL-, or NKG2D-blocking antibodies alone or in combination. Bar histograms represent the mean of three independent experiments, with error bars representing the standard error of the mean. The expression of DNAM-1 ligands (PVR and Nectin-2), TRAIL receptors (TRAIL-R1/R2), and NKG2D ligands (MICA/B and ULBP2) was investigated by flow cytometry, and representative histograms are presented for (A) SK-N-AS, (B) SJNB-7, and (C) SK-N-DZ cells.

Statistical analyses were performed using one-way analysis of variance.  $*p < 0.05$ ,  $**p < 0.01$ ,  $***p < 0.001$ .

DNAM-1, DNAX accessory molecule 1; MICA/B, major histocompatibility complex class I-related chain A/B; NB: neuroblastoma; NK, natural killer; NKG2D, natural killer group 2D; pDC, plasmacytoid dendritic cell; PVR, poliovirus receptor; TRAIL, tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand; ULBP: UL16-binding protein.

## ***Discussion***

Our study revealed that TLR-9-activated pDCs induced NK cell-mediated killing of NB cells. We demonstrated that both CD133<sup>+</sup> CSCs and GD2-negative NB cells are sensitive to pDC-activated NK cell-mediated lysis. We also revealed an additive effect of NK-cell stimulation with activated pDCs and anti-GD2 ADCC for the killing of NB tumors expressing low levels of GD2. NK-cell lytic activity against NB was independent of cell contact, depended upon type I IFN produced by TLR-9-activated pDCs, but was not reproduced by IFN- $\alpha$  stimulation alone. Finally, our results indicated that both cytolytic granule release via NK cell-activating receptors and TRAIL-mediated apoptosis are involved in NB killing by pDC-activated NK cells.

NB may still relapse after multimodal therapy, including aggressive chemotherapy, hematopoietic stem cell transplantation, and anti-GD2 immunotherapy. CSCs are responsible for the long-term maintenance of tumor growth and metastasis due to their self-renewal properties and resistance to chemotherapy [23-32]. Given that immunotherapy is effective on low-cycling cells, CSCs from several cancer types are sensitive to immunotherapy and, in particular to NK cell-based therapy. The sensitivity of CSCs to NK cell-mediated killing is correlated to the expression of stress-induced ligands on CSCs that are recognized by the NKG2D-activator receptor expressed by NK cells [33-36]. Although the concept of CSC has been a matter of debate for NB, CD133 appears to be the best available surface marker associated CSC-like phenotype in NB, CD133<sup>+</sup> NB cells being enriched in cells with a CSC-like phenotype [37-41]. Here, we showed that CD133<sup>+</sup> NB cells are efficiently killed by pDC-activated NK cells. Our results are in line with data in other cancers underscoring the role of the activating receptor NKG2D in CSC killing [34, 35]. Indeed the killing of the SK-N-DZ cell line

(70% CD133<sup>+</sup>) by activated NK cells depended upon NKG2D, while the role of NKG2D was less important to the killing of the CD133<sup>-</sup> NB cell lines, SK-N-AS and SJNB7.

Our results indicated that the combination of anti-GD2 immunotherapy and NK-cell stimulation with activated pDCs has the potential to eradicate NB tumors exhibiting heterogeneous expression of GD2 and to decrease the potential risk of tumor escape by GD2 downregulation. Indeed, GD2<sup>-</sup> NB cells were efficiently killed by pDC-activated NK cells, and we observed an additive cytotoxic effect associated with pDC-mediated NK-cell activation and anti-GD2 ADCC against a NB cell line exhibiting heterogeneous expression of GD2. These results suggest that NK cell stimulation with activated pDCs could improve the survival rates of patients with high-risk NB treated with anti-GD2 immunotherapy.

Our results showed that efficient killing of NB cells by activated NK cells was dependent upon both DNAM-1-dependent release of cytotoxic granules and TRAIL-mediated apoptosis. These results confirmed the important role of DNAM-1 in NB killing by NK cells, exemplified by the prognostic value of DNAM-1-ligand expression on NB tumors [51, 52]. These findings are in agreement with those reported by Sheard *et al* [44], showing that membrane-bound TRAIL plays an important role in NK cell-mediated cytotoxicity against NB cells and complements the release of cytotoxic granules. While DNAM-1 is constitutively expressed on NK cells, the expression of TRAIL is induced by NK-cell stimulation [53, 54]. Importantly, high levels of TRAIL are expressed on NK cells upon stimulation by TLR-activated pDCs. This feature is unique to pDC-mediated NK-cell activation and could not be reproduced by IFN- $\alpha$  or IL-15 stimulation alone. This characteristic allows for the engagement of both the TRAIL-induced

apoptosis pathway and DNAM-1-mediated release of cytotoxic granules by activated NK cells against NB cells.

The phenotype of NK cells activated by pDCs is characterized by two other features. First, the expression of the activation marker CD69 by CD56<sup>dim</sup> cells signals activation of this cytolytic subset [56]. Secondly, pDC-activated NK cells secrete high levels of IFN- $\gamma$  that synergize with TRAIL/death-receptor pathways. Indeed, IFN- $\gamma$  promotes TRAIL-mediated cleavage of caspase-8 in NB cell lines [57, 58]. Furthermore, IFN- $\gamma$  can serve as a link to adaptive immunity, given that 5 days of systemic IFN- $\gamma$  therapy increased T cell trafficking into tumor-biopsy specimens from patients with high-risk NB [59].

Additionally, we showed that the activation of NK cells by pDCs was dependent upon soluble factors secreted by pDCs. From a therapeutic viewpoint, it is, therefore, important to determine whether the effect of activated pDCs on NK cells can be reproduced by a single cytokine, as its administration would be simpler and more affordable than adoptive cell therapy. Because pDCs are specialized cells that produce large amounts of type I IFN in response to stimulation, the best candidate among pDC-secreted cytokines is IFN- $\alpha$  [60]. Accordingly, we found that type I IFN blockade completely abrogated NK-cell activation and cytotoxicity against NB, indicating that type I IFNs are required for pDC-induced NK-cell activation. However, NK-cell activation and cytotoxicity against NB were not reproduced by IFN- $\alpha$  stimulation alone, even at a dosage corresponding to that secreted by the number of pDCs used in these experiments. Therefore, we hypothesized that pDC-induced NK-cell stimulation is due to a combination of type I IFNs or that several other pro-inflammatory cytokines are involved. The dependency on type I IFNs may also be explained by the blockade of the IFN- $\alpha$  autocrine positive feedback loop needed for



pDC activation [61]. Thus, it is unlikely that the administration of a single cytokine could reproduce the effect of activated pDCs on NK cell-mediated NB killing. Experiments are currently underway to test this hypothesis.

Our results contrast with those published by Perez-Martinez *et al.* showing that blood dendritic cells, including pDCs, suppressed NK cell functions and increased the risk of leukemia relapse after hematopoietic stem cell transplantation [55]. This discrepancy could be explained by several experimental differences between our study and that of Perez-Martinez *et al.* Indeed, we used the physiological NK:pDC ratio of 10:1 in our experiments, while a ratio of 2:1 was used in Perez-Martinez' study. Moreover, we used negative selections for both pDC and NK cell purification to avoid alteration of their properties. Since our results are in good agreement with the pDC-induced NK cell activation previously described [44], we are confident that NK-cell stimulation by activated pDCs constitutes a unique therapeutic strategy to fight NB cells.

pDC activation can be induced *in vivo* by the administration of clinical-grade TLR-ligands [62]. However, the efficacy of this approach depends upon the number and function of pDCs in patients. We showed that, following cord-blood or allogeneic bone-marrow transplantation, pDC numbers or functions are altered for several months [50]. Whether aggressive chemotherapy, followed by autologous hematopoietic stem cell transplantation, affects pDC function and numbers in patients with high-risk NB remains to be determined. Alternatively, activated pDCs may be adoptively transferred to induce NK-cell responses. We recently developed a unique method of human pDC expansion from CD34<sup>+</sup> hematopoietic stem cell progenitors [47, 50]. These *in vitro* differentiated pDCs are as efficient as peripheral blood pDCs at inducing NK-cell antitumor activity *in vitro*. We further demonstrated that adoptive transfers of *in vitro* differentiated and activated pDCs control the development of acute lymphoblastic

leukemia in humanized mice, proving the feasibility of this therapeutic approach [47]. Experiments are underway to determine whether similar therapeutic efficacy can be obtained against NB.

Our novel approach of NK-cell stimulation by activated pDCs led to the efficient killing of both CSCs and GD2<sup>-</sup> NB cells and increased the efficacy of anti-GD2-mediated ADCC for NB tumors exhibiting heterogeneous expression of GD2. These results pave the way for novel immunotherapeutic strategies combining anti-GD2 mAb with pDC-mediated activation of NK cells in patients with high-risk NB to reduce the risk of relapse.

## ***Acknowledgements***

This work was supported by the Fondation Centre de Cancérologie Charles-Bruneau, the FRQS (Fond de recherche du Québec en Santé), the Fondation CHU Sainte-Justine - Fondation des Étoiles. The authors thank Dr. Pierre Teira for critical reading of this manuscript and helpful comments and Lubomir Alexandrov for his help with statistical analyses. We would like to thank Editage ([www.editage.com](http://www.editage.com)) for English language editing.

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

## ***Abbreviations***

ADCC: antibody-dependent cellular cytotoxicity; CD: cluster of differentiation; CFSE: carboxyfluorescein succinimidyl ester; CSC: cancer stem cell; DNAM-1: DNAX accessory molecule 1; E:T: effector against target; FAS-L: Fas ligand; FBS: fetal bovine serum; GD2: disialoganglioside; HLA: human leukocyte antigen; IFN: interferon; IL: interleukin; KIR: killer immunoglobulin-like receptor; MICA/B: major histocompatibility complex class I-related chain A/B; NB: neuroblastoma; NK: natural killer; NKG2D: natural killer group 2D; PBMC: peripheral blood mononuclear cell; pDC: plasmacytoid dendritic cell; PE: phycoerythrin; PI: propidium iodide; PVR: poliovirus receptor; TLR: toll-like receptor; TRAIL: tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand; ULBP: UL16-binding protein.

## ***References***

1. Brodeur GM, Pritchard J, Berthold F, Carlsen NL, Castel V, Castelberry RP, et al. Revisions of the international criteria for neuroblastoma diagnosis, staging, and response to treatment. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 1993;11(8):1466-77. Epub 1993/08/01. PubMed PMID: 8336186.
2. Maris JM, Hogarty MD, Bagatell R, Cohn SL. Neuroblastoma. *Lancet*. 2007;369(9579):2106-20. Epub 2007/06/26. doi: 10.1016/S0140-6736(07)60983-0. PubMed PMID: 17586306.
3. Maris JM. Recent advances in neuroblastoma. *The New England journal of medicine*. 2010;362(23):2202-11. Epub 2010/06/19. doi: 10.1056/NEJMra0804577. PubMed PMID: 20558371; PubMed Central PMCID: PMC3306838.
4. Ladenstein R, Philip T, Lasset C, Hartmann O, Garaventa A, Pinkerton R, et al. Multivariate analysis of risk factors in stage 4 neuroblastoma patients over the age of one year treated with megatherapy and stem-cell transplantation: a report from the European Bone Marrow Transplantation Solid Tumor Registry. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 1998;16(3):953-65. Epub 1998/03/21. PubMed PMID: 9508178.
5. Brodeur GM. Neuroblastoma: biological insights into a clinical enigma. *Nature reviews Cancer*. 2003;3(3):203-16. Epub 2003/03/04. doi: 10.1038/nrc1014. PubMed PMID: 12612655.
6. Wagner LM, Danks MK. New therapeutic targets for the treatment of high-risk neuroblastoma. *Journal of cellular biochemistry*. 2009;107(1):46-57. Epub 2009/03/12. doi: 10.1002/jcb.22094. PubMed PMID: 19277986.
7. Yu AL, Gilman AL, Ozkaynak MF, London WB, Kreissman SG, Chen HX, et al. Anti-GD2 antibody with GM-CSF, interleukin-2, and isotretinoin for neuroblastoma. *The New England journal of medicine*. 2010;363(14):1324-34. Epub 2010/10/01. doi: 10.1056/NEJMoa0911123. PubMed PMID: 20879881; PubMed Central PMCID: PMC3086629.
8. Institute NC. Neuroblastoma treatment. For Health Professionals (PDQ). Bethesda, MD: National Cancer Institute. 2015.
9. Schrey D, Vaidya SJ, Levine D, Pearson AD, Moreno L. Additional Therapies to Improve Metastatic Response to Induction Therapy in Children With High-risk Neuroblastoma. *J Pediatr Hematol Oncol*. 2015;37(3):e150-3. doi: 10.1097/MPH.0000000000000308. PubMed PMID: 26201036.
10. Pinto NR, Applebaum MA, Volchenboum SL, Matthay KK, London WB, Ambros PF, et al. Advances in Risk Classification and Treatment Strategies for Neuroblastoma. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*.

2015;33(27):3008-17. doi: 10.1200/JCO.2014.59.4648. PubMed PMID: 26304901; PubMed Central PMCID: PMC4567703.

11. Iannello A, Thompson TW, Ardolino M, Marcus A, Raulet DH. Immunosurveillance and immunotherapy of tumors by innate immune cells. *Curr Opin Immunol.* 2016;38:52-8. doi: 10.1016/j.coi.2015.11.001. PubMed PMID: 26686774; PubMed Central PMCID: PMC4715905.

12. Long EO, Kim HS, Liu D, Peterson ME, Rajagopalan S. Controlling natural killer cell responses: integration of signals for activation and inhibition. *Annual review of immunology.* 2013;31:227-58. doi: 10.1146/annurev-immunol-020711-075005. PubMed PMID: 23516982; PubMed Central PMCID: PMC3868343.

13. Barker E, Mueller BM, Handgretinger R, Herter M, Yu AL, Reisfeld RA. Effect of a chimeric anti-ganglioside GD2 antibody on cell-mediated lysis of human neuroblastoma cells. *Cancer research.* 1991;51(1):144-9. PubMed PMID: 1988079.

14. Zeng Y, Fest S, Kunert R, Katinger H, Pistoia V, Michon J, et al. Anti-neuroblastoma effect of ch14.18 antibody produced in CHO cells is mediated by NK-cells in mice. *Molecular immunology.* 2005;42(11):1311-9. doi: 10.1016/j.molimm.2004.12.018. PubMed PMID: 15950727.

15. Lode HN, Xiang R, Dreier T, Varki NM, Gillies SD, Reisfeld RA. Natural killer cell-mediated eradication of neuroblastoma metastases to bone marrow by targeted interleukin-2 therapy. *Blood.* 1998;91(5):1706-15. PubMed PMID: 9473237.

16. Neal ZC, Yang JC, Rakhmilevich AL, Buhtoiarov IN, Lum HE, Imboden M, et al. Enhanced activity of hu14.18-IL2 immunocytokine against murine NXS2 neuroblastoma when combined with interleukin 2 therapy. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research.* 2004;10(14):4839-47. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-03-0799. PubMed PMID: 15269160.

17. Alvarado CS, Findley HW, Chan WC, Hnath RS, Abdel-Mageed A, Pais RC, et al. Natural killer cells in children with malignant solid tumors. Effect of recombinant interferon-alpha and interleukin-2 on natural killer cell function against tumor cell lines. *Cancer.* 1989;63(1):83-9. Epub 1989/01/01. PubMed PMID: 2783377.

18. Cho D, Shook DR, Shimasaki N, Chang YH, Fujisaki H, Campana D. Cytotoxicity of activated natural killer cells against pediatric solid tumors. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research.* 2010;16(15):3901-9. Epub 2010/06/15. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-10-0735. PubMed PMID: 20542985; PubMed Central PMCID: PMC3168562.

19. Castriconi R, Dondero A, Cilli M, Ognio E, Pezzolo A, De Giovanni B, et al. Human NK cell infusions prolong survival of metastatic human neuroblastoma-bearing NOD/scid mice. *Cancer immunology, immunotherapy : CII.* 2007;56(11):1733-42. Epub 2007/04/12. doi: 10.1007/s00262-007-0317-0. PubMed PMID: 17426969.

20. Bayer AL, Chirinos J, Cabello C, Yang J, Matsutani T, Malek TR, et al. Expansion of a restricted residual host T reg-cell repertoire is dependent on IL-2 following experimental autologous hematopoietic stem transplantation. *European journal of immunology*. 2011;41(12):3467-78. doi: 10.1002/eji.201141611. PubMed PMID: 21928285; PubMed Central PMCID: PMC3516388.
21. Delgado DC, Hank JA, Kolesar J, Lorentzen D, Gan J, Seo S, et al. Genotypes of NK cell KIR receptors, their ligands, and Fcγ receptors in the response of neuroblastoma patients to Hu14.18-IL2 immunotherapy. *Cancer research*. 2010;70(23):9554-61. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-2211. PubMed PMID: 20935224; PubMed Central PMCID: PMC2999644.
22. Forlenza CJ, Boudreau JE, Zheng J, Le Luque JB, Chamberlain E, Heller G, et al. KIR3DL1 Allelic Polymorphism and HLA-B Epitopes Modulate Response to Anti-GD2 Monoclonal Antibody in Patients With Neuroblastoma. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2016. doi: 10.1200/JCO.2015.64.9558. PubMed PMID: 27069083.
23. Sartelet H, Imbriglio T, Nyalendo C, Haddad E, Annabi B, Duval M, et al. CD133 expression is associated with poor outcome in neuroblastoma via chemoresistance mediated by the AKT pathway. *Histopathology*. **2012**;60(7):1144-55. Epub 2012/03/08. doi: 10.1111/j.1365-2559.2012.04191.x. PubMed PMID: 22394107.
24. Tong QS, Zheng LD, Tang ST, Ruan QL, Liu Y, Li SW, et al. Expression and clinical significance of stem cell marker CD133 in human neuroblastoma. *World journal of pediatrics : WJP*. 2008;4(1):58-62. Epub 2008/04/12. doi: 10.1007/s12519-008-0012-z. PubMed PMID: 18402255.
25. Hansford LM, McKee AE, Zhang L, George RE, Gerstle JT, Thorner PS, et al. Neuroblastoma cells isolated from bone marrow metastases contain a naturally enriched tumor-initiating cell. *Cancer research*. 2007;67(23):11234-43. Epub 2007/12/07. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-0718. PubMed PMID: 18056449.
26. Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature*. 2001;414(6859):105-11. Epub 2001/11/02. doi: 10.1038/35102167. PubMed PMID: 11689955.
27. Tan BT, Park CY, Ailles LE, Weissman IL. The cancer stem cell hypothesis: a work in progress. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. 2006;86(12):1203-7. Epub 2006/11/01. doi: 10.1038/labinvest.3700488. PubMed PMID: 17075578.
28. Hirschmann-Jax C, Foster AE, Wulf GG, Nuchtern JG, Jax TW, Gobel U, et al. A distinct "side population" of cells with high drug efflux capacity in human tumor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(39):14228-33. Epub 2004/09/24. doi: 10.1073/pnas.0400067101

0400067101 [pii]. PubMed PMID: 15381773; PubMed Central PMCID: PMC521140.

29. Mahller YY, Williams JP, Baird WH, Mitton B, Grossheim J, Saeki Y, et al. Neuroblastoma cell lines contain pluripotent tumor initiating cells that are susceptible to a targeted oncolytic virus. *PLoS One*. 2009;4(1):e4235. PubMed PMID: 19156211.

30. Zhang L, Smith KM, Chong AL, Stempak D, Yeger H, Marrano P, et al. In vivo antitumor and antimetastatic activity of sunitinib in preclinical neuroblastoma mouse model. *Neoplasia*. 2009;11(5):426-35. Epub 2009/05/05. PubMed PMID: 19412427; PubMed Central PMCID: PMC2671855.

31. Khalil MA, Hrabeta J, Cipro S, Stiborova M, Vicha A, Eckschlager T. Neuroblastoma stem cells - mechanisms of chemoresistance and histone deacetylase inhibitors. *Neoplasia*. 2012;59(6):737-46. Epub 2012/08/07. doi: 10.4149/neo\_2012\_093. PubMed PMID: 22862175.

32. Liu G, Yuan X, Zeng Z, Tunici P, Ng H, Abdulkadir IR, et al. Analysis of gene expression and chemoresistance of CD133+ cancer stem cells in glioblastoma. *Molecular cancer*. 2006;5:67. Epub 2006/12/05. doi: 10.1186/1476-4598-5-67. PubMed PMID: 17140455; PubMed Central PMCID: PMC1697823.

33. Castriconi R, Dondero A, Negri F, Bellora F, Nozza P, Carnemolla B, et al. Both CD133+ and CD133- medulloblastoma cell lines express ligands for triggering NK receptors and are susceptible to NK-mediated cytotoxicity. *European journal of immunology*. 2007;37(11):3190-6. doi: 10.1002/eji.200737546. PubMed PMID: 17918205.

34. Rong XX, Wei F, Lin XL, Qin YJ, Chen L, Wang HY, et al. Recognition and killing of cancer stem-like cell population in hepatocellular carcinoma cells by cytokine-induced killer cells via NKG2d-ligands recognition. *Oncoimmunology*. 2016;5(3):e1086060. doi: 10.1080/2162402X.2015.1086060. PubMed PMID: 27141341; PubMed Central PMCID: PMC4839362.

35. Wei F, Rong XX, Xie RY, Jia LT, Wang HY, Qin YJ, et al. Cytokine-induced killer cells efficiently kill stem-like cancer cells of nasopharyngeal carcinoma via the NKG2D-ligands recognition. *Oncotarget*. 2015;6(33):35023-39. doi: 10.18632/oncotarget.5280. PubMed PMID: 26418951; PubMed Central PMCID: PMC4741506.

36. Grossenbacher SK, Canter RJ, Murphy WJ. Natural killer cell immunotherapy to target stem-like tumor cells. *Journal for immunotherapy of cancer*. 2016;4:19. doi: 10.1186/s40425-016-0124-2. PubMed PMID: 27096096; PubMed Central PMCID: PMC4835831.

37. Coulon A, Flahaut M, Muhlethaler-Mottet A, Meier R, Liberman J, Balmas-Bourlout K, et al. Functional sphere profiling reveals the complexity of neuroblastoma tumor-initiating cell model. *Neoplasia*. 2011;13(10):991-1004. Epub 2011/10/27. PubMed PMID: 22028624; PubMed Central PMCID: PMC3201575.

38. Xing LL, Sha YL, Wu YM, Hu JM, Zhang M, Lv F. Preliminary analysis of stem cell-like cells in human neuroblastoma. *World journal of pediatrics : WJP*. 2015;11(1):54-60. doi: 10.1007/s12519-014-0529-2. PubMed PMID: 25431041.
39. Ross RA, Walton JD, Han D, Guo HF, Cheung NK. A distinct gene expression signature characterizes human neuroblastoma cancer stem cells. *Stem Cell Res*. 2015;15(2):419-26. doi: 10.1016/j.scr.2015.08.008. PubMed PMID: 26342562; PubMed Central PMCID: PMC4601571.
40. Kamijo T. Role of stemness-related molecules in neuroblastoma. *Pediatric research*. 2012;71(4 Pt 2):511-5. doi: 10.1038/pr.2011.54. PubMed PMID: 22430387.
41. Garner EF, Beierle EA. Cancer Stem Cells and Their Interaction with the Tumor Microenvironment in Neuroblastoma. *Cancers*. 2015;8(1). doi: 10.3390/cancers8010005. PubMed PMID: 26729169; PubMed Central PMCID: PMC4728452.
42. Cournoyer S, Nyalendo C, Addioui A, Belounis A, Beaunoyer M, Aumont A, et al. Genotype analysis of tumor-initiating cells expressing CD133 in neuroblastoma. *Genes, chromosomes & cancer*. 2012;51(8):792-804. Epub 2012/04/20. doi: 10.1002/gcc.21964. PubMed PMID: 22514116.
43. Sartelet H, Durrieu L, Fontaine F, Nyalendo C, Haddad E. Description of a new xenograft model of metastatic neuroblastoma using NOD/SCID/Il2rg null (NSG) mice. *In Vivo*. 2012;26(1):19-29. Epub 2012/01/03. PubMed PMID: 22210712.
44. Gerosa F, Gobbi A, Zorzi P, Burg S, Briere F, Carra G, et al. The reciprocal interaction of NK cells with plasmacytoid or myeloid dendritic cells profoundly affects innate resistance functions. *J Immunol*. 2005;174(2):727-34. Epub 2005/01/07. PubMed PMID: 15634892.
45. Lande R, Gilliet M. Plasmacytoid dendritic cells: key players in the initiation and regulation of immune responses. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2010;1183:89-103. Epub 2010/02/12. doi: 10.1111/j.1749-6632.2009.05152.x. PubMed PMID: 20146710.
46. Lou Y, Liu C, Kim GJ, Liu YJ, Hwu P, Wang G. Plasmacytoid dendritic cells synergize with myeloid dendritic cells in the induction of antigen-specific antitumor immune responses. *J Immunol*. 2007;178(3):1534-41. Epub 2007/01/24. PubMed PMID: 17237402.
47. Lelaidier M, Diaz-Rodriguez Y, Cordeau M, Cordeiro P, Haddad E, Herblot S, et al. TRAIL-mediated killing of acute lymphoblastic leukemia by plasmacytoid dendritic cell-activated natural killer cells. *Oncotarget*. 2015;6(30):29440-55. doi: 10.18632/oncotarget.4984. PubMed PMID: 26320191.
48. Terzic T, Cordeau M, Herblot S, Teira P, Cournoyer S, Beaunoyer M, et al. Expression of Disialoganglioside GD2 in neuroblastic tumors: a prognostic value for patients undergoing anti-GD2 immunotherapy. *In preparation*. 2014.



49. Alter G, Malenfant JM, Altfeld M. CD107a as a functional marker for the identification of natural killer cell activity. *Journal of immunological methods*. 2004;294(1-2):15-22. Epub 2004/12/18. doi: 10.1016/j.jim.2004.08.008. PubMed PMID: 15604012.
50. Charrier E, Cordeiro P, Brito RM, Harnois M, Mezziani S, Herblot S, et al. Impaired Interferon-Alpha Production by Plasmacytoid Dendritic Cells after Cord Blood Transplantation in Children: Implication for Post-transplantation Toll-Like Receptor Ligand-Based Immunotherapy. *Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation*. 2014. doi: 10.1016/j.bbmt.2014.06.007. PubMed PMID: 25128615.
51. Castriconi R, Dondero A, Corrias MV, Lanino E, Pende D, Moretta L, et al. Natural killer cell-mediated killing of freshly isolated neuroblastoma cells: critical role of DNAX accessory molecule-1-poliovirus receptor interaction. *Cancer research*. 2004;64(24):9180-4. Epub 2004/12/18. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-04-2682. PubMed PMID: 15604290.
52. Bottino C, Dondero A, Bellora F, Moretta L, Locatelli F, Pistoia V, et al. Natural killer cells and neuroblastoma: tumor recognition, escape mechanisms, and possible novel immunotherapeutic approaches. *Front Immunol*. 2014;5:56. doi: 10.3389/fimmu.2014.00056. PubMed PMID: 24575100; PubMed Central PMCID: PMC3921882.
53. Zamai L, Ahmad M, Bennett IM, Azzoni L, Alnemri ES, Perussia B. Natural killer (NK) cell-mediated cytotoxicity: differential use of TRAIL and Fas ligand by immature and mature primary human NK cells. *The Journal of experimental medicine*. 1998;188(12):2375-80. PubMed PMID: 9858524; PubMed Central PMCID: PMC2212426.
54. Sato K, Hida S, Takayanagi H, Yokochi T, Kayagaki N, Takeda K, et al. Antiviral response by natural killer cells through TRAIL gene induction by IFN-alpha/beta. *European journal of immunology*. 2001;31(11):3138-46. doi: 10.1002/1521-4141(200111)31:11<3138::AID-IMMU3138>3.0.CO;2-B. PubMed PMID: 11745330.
55. Perez-Martinez A, Iyengar R, Gan K, Chotsampancharoen T, Rooney B, Holladay M, et al. Blood dendritic cells suppress NK cell function and increase the risk of leukemia relapse after hematopoietic cell transplantation. *Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation*. 2011;17(5):598-607. doi: 10.1016/j.bbmt.2010.10.019. PubMed PMID: 20977942; PubMed Central PMCID: PMC3047596.
56. Pisegna S, Zingoni A, Pirozzi G, Cinque B, Cifone MG, Morrone S, et al. Src-dependent Syk activation controls CD69-mediated signaling and function on human NK cells. *J Immunol*. 2002;169(1):68-74. PubMed PMID: 12077230.
57. Johnsen JI, Pettersen I, Ponthan F, Sveinbjornsson B, Flaegstad T, Kogner P. Synergistic induction of apoptosis in neuroblastoma cells using a combination of cytostatic drugs with interferon-gamma and TRAIL. *International journal of oncology*. 2004;25(6):1849-57. PubMed PMID: 15547726.

58. Sheard MA, Asgharzadeh S, Liu Y, Lin TY, Wu HW, Ji L, et al. Membrane-bound TRAIL supplements natural killer cell cytotoxicity against neuroblastoma cells. *J Immunother.* 2013;36(5):319-29. Epub 2013/05/31. doi: 10.1097/CJI.0b013e31829b4493. PubMed PMID: 23719242.
59. Reid GS, Shan X, Coughlin CM, Lassoued W, Pawel BR, Wexler LH, et al. Interferon-gamma-dependent infiltration of human T cells into neuroblastoma tumors in vivo. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research.* 2009;15(21):6602-8. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-09-0829. PubMed PMID: 19825945; PubMed Central PMCID: PMC2783677.
60. Colonna M, Trinchieri G, Liu YJ. Plasmacytoid dendritic cells in immunity. *Nature immunology.* 2004;5(12):1219-26. Epub 2004/11/19. doi: ni1141 [pii] 10.1038/ni1141. PubMed PMID: 15549123.
61. Tailor P, Tamura T, Kong HJ, Kubota T, Kubota M, Borghi P, et al. The feedback phase of type I interferon induction in dendritic cells requires interferon regulatory factor 8. *Immunity.* 2007;27(2):228-39. doi: 10.1016/j.immuni.2007.06.009. PubMed PMID: 17702615; PubMed Central PMCID: PMC2768351.
62. Aranda F, Vacchelli E, Obrist F, Eggermont A, Galon J, Sautes-Fridman C, et al. Trial Watch: Toll-like receptor agonists in oncological indications. *Oncoimmunology.* 2014;3:e29179. doi: 10.4161/onci.29179. PubMed PMID: 25083332; PubMed Central PMCID: PMC4091055.

### ***Legends of supplemental figures***

**Supplemental Fig 1: Flow cytometry analysis of NK cell phenotype following overnight stimulation.** Representative dot plot analysis of immunostaining with anti-CD56, anti-CD69, anti-TRAIL antibodies (gated on CD3<sup>+</sup> cells).

**Supplemental Fig 2: NK cell phenotype was analyzed by flow cytometry following overnight stimulation with IL-15, IFN- $\alpha$  or activated pDCs.** Box plots represent the distribution of the median fluorescence intensity (MFI) of the indicated markers (NKp30, NKp46, NKp44, Fas-L, Perforin and Granzyme B). Statistical analyses were performed using one-way analysis of variance. \*  $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ .

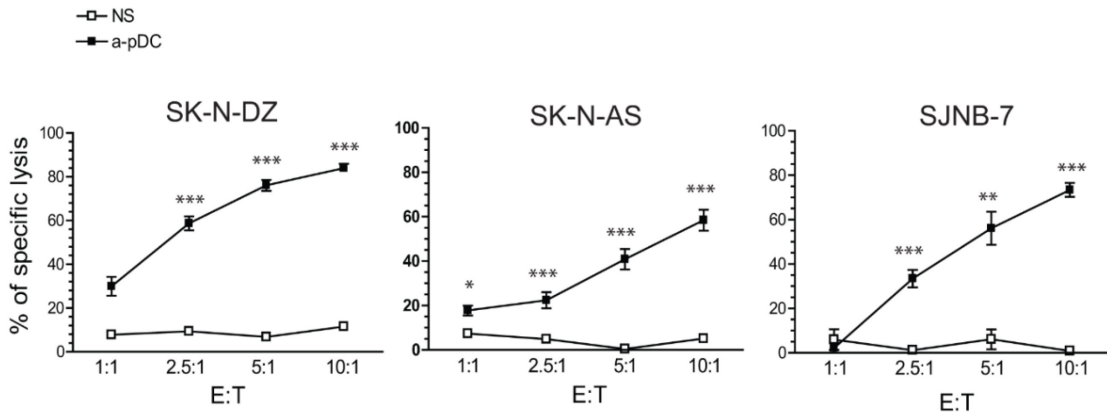
# Figures

## Figure 1.1

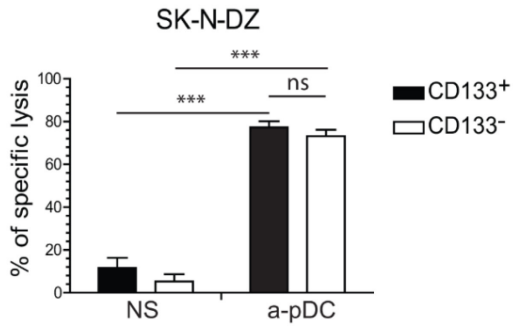
A

|         | CD133 | GD2 | N-Myc<br>ampl. |
|---------|-------|-----|----------------|
| SK-N-DZ | 70%   | 98% | +              |
| SK-N-AS | 0%    | 30% | -              |
| SJNB-7  | 0%    | 0%  | +              |
| SK-N-SH | 0%    | 7%  | -              |
| IMR-32  | 0%    | 95% | +              |
| IGR-N91 | 0%    | 85% | +              |

B



C



**Figure 1.2**

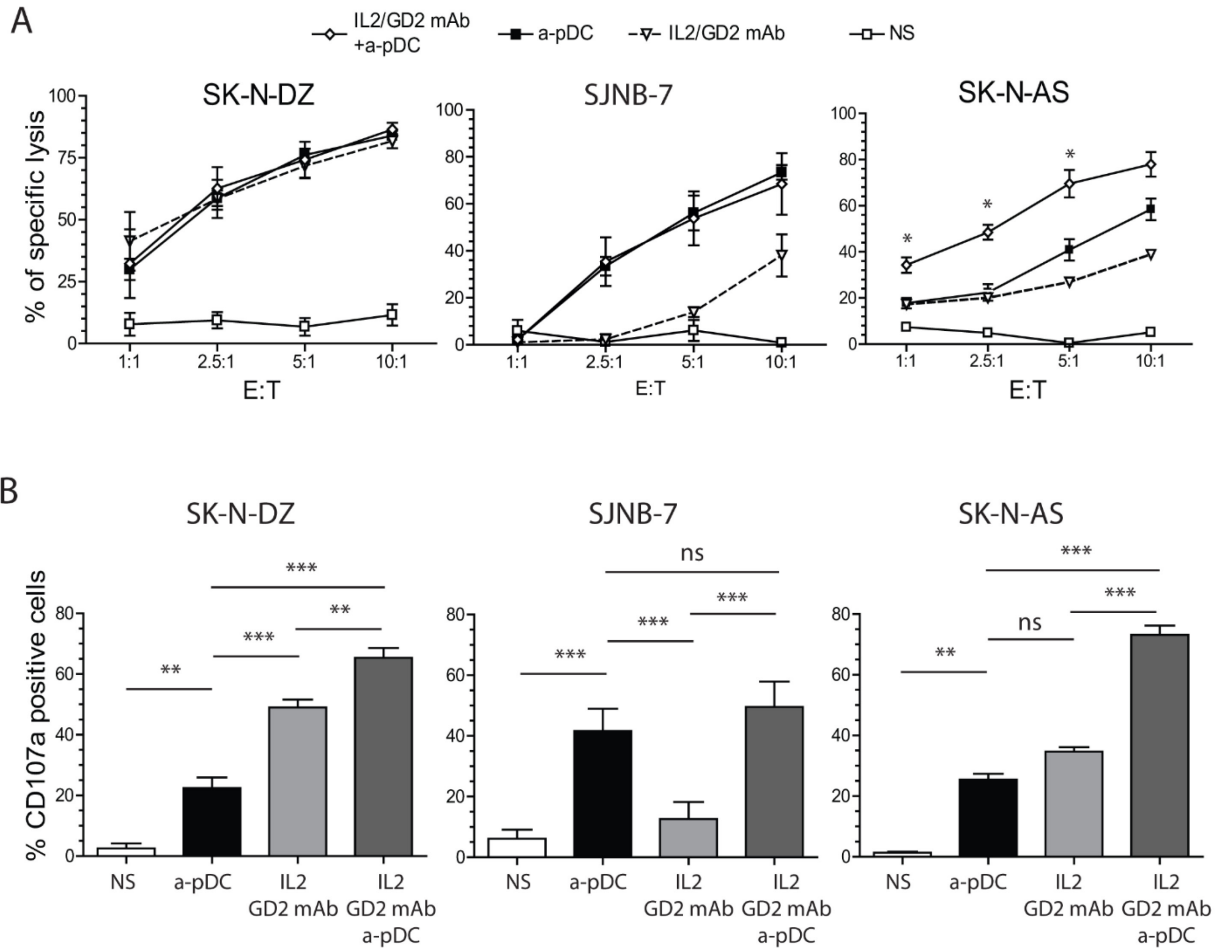


Figure 1.3

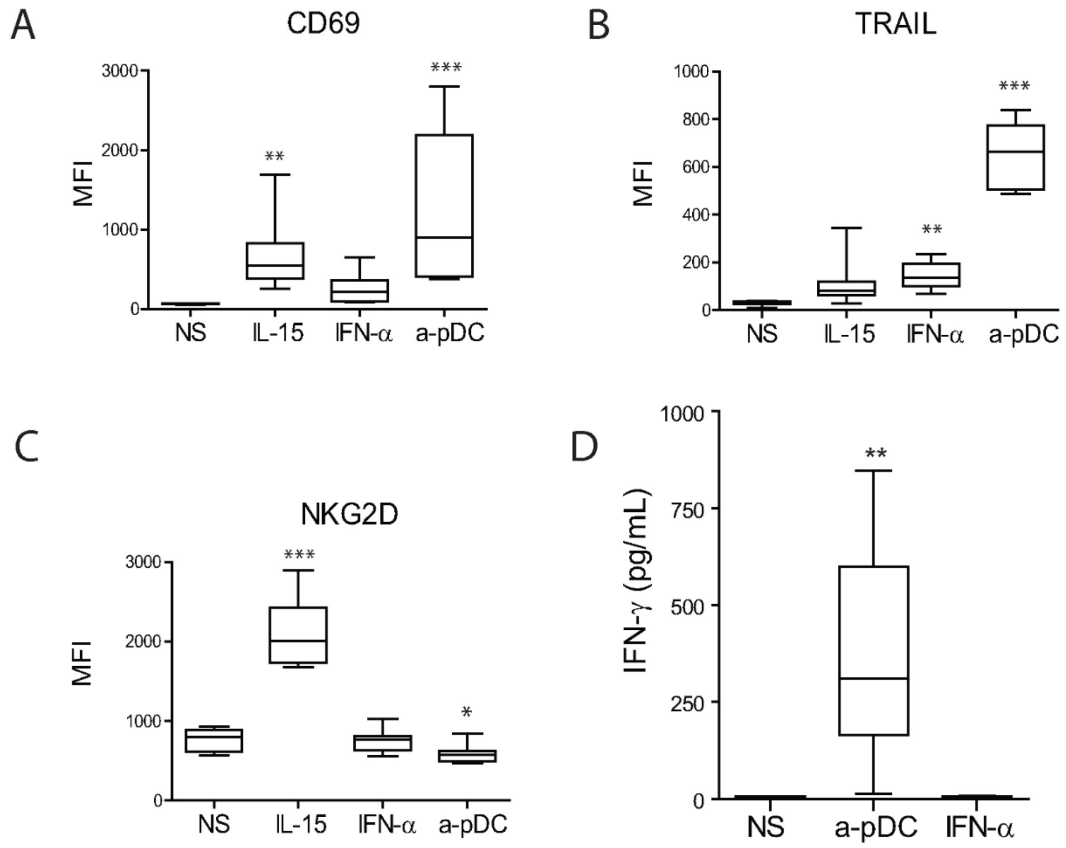
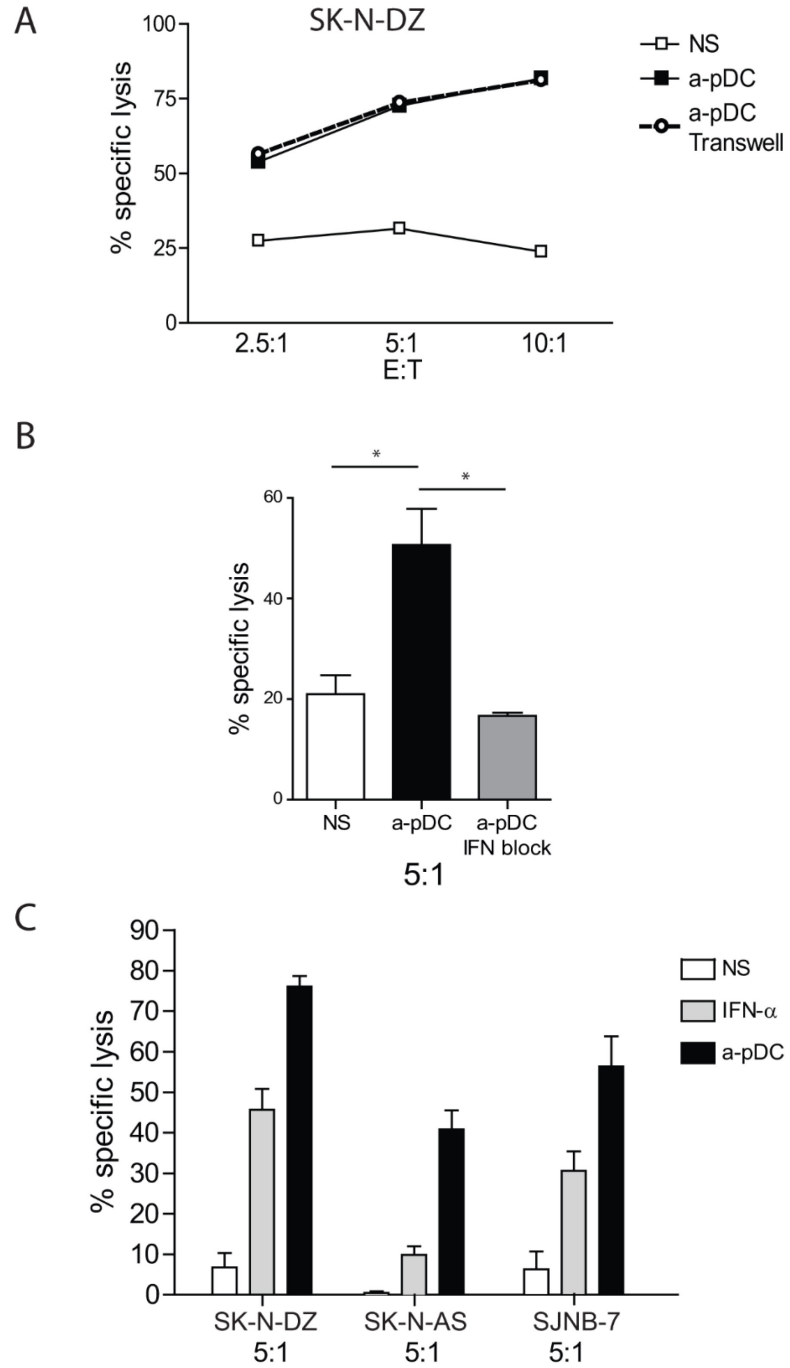


Figure 1.4



**Figure 1.5**

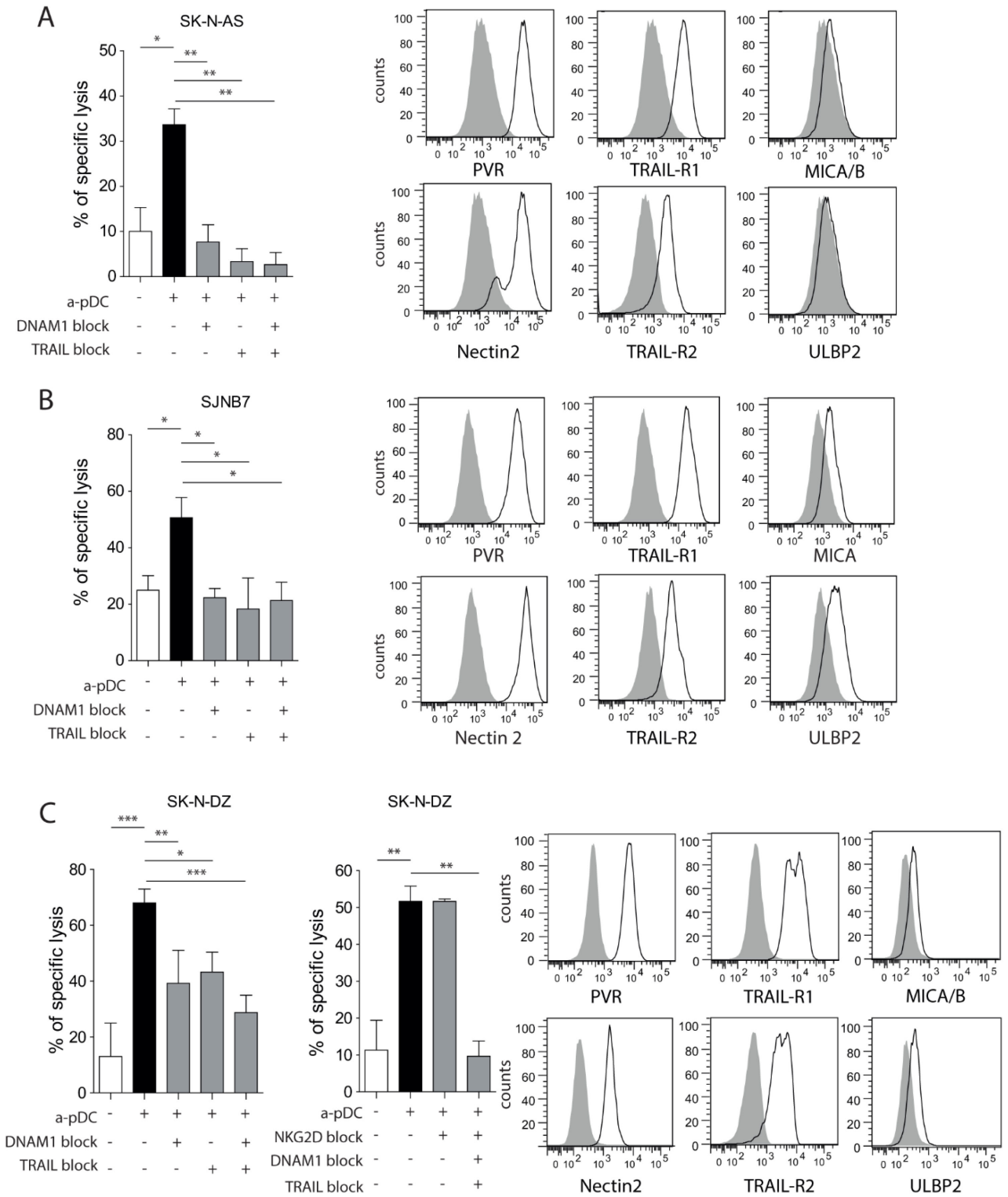




Figure 1S.1

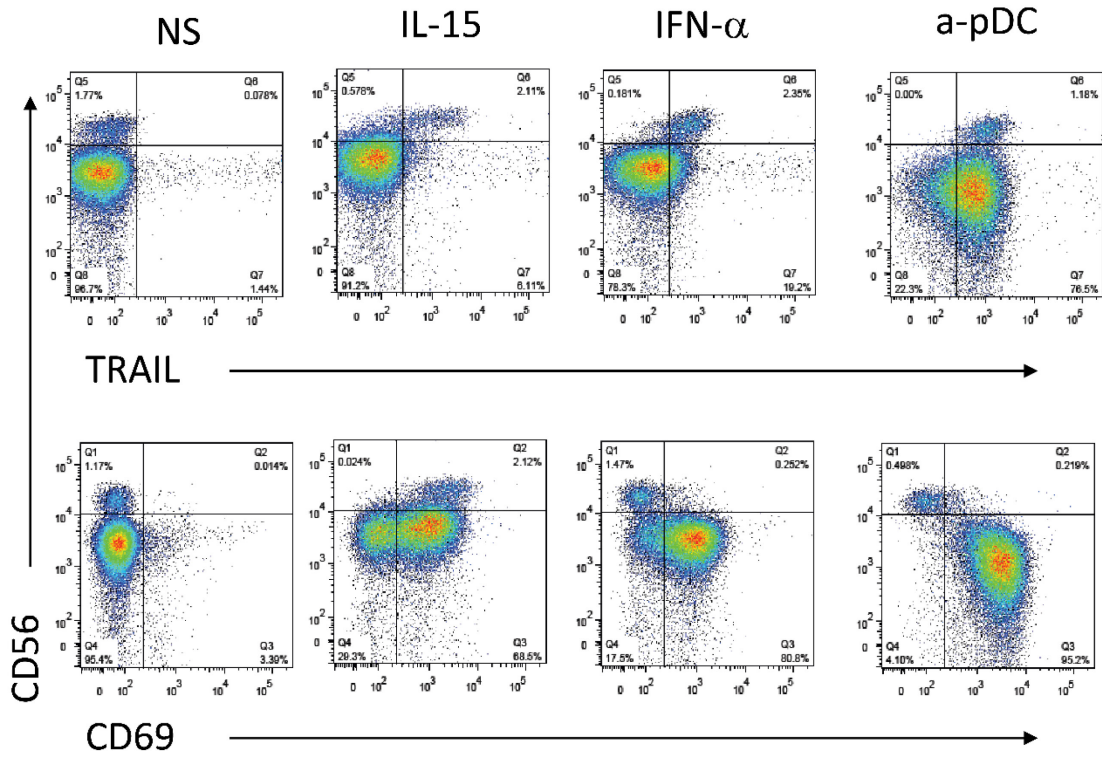
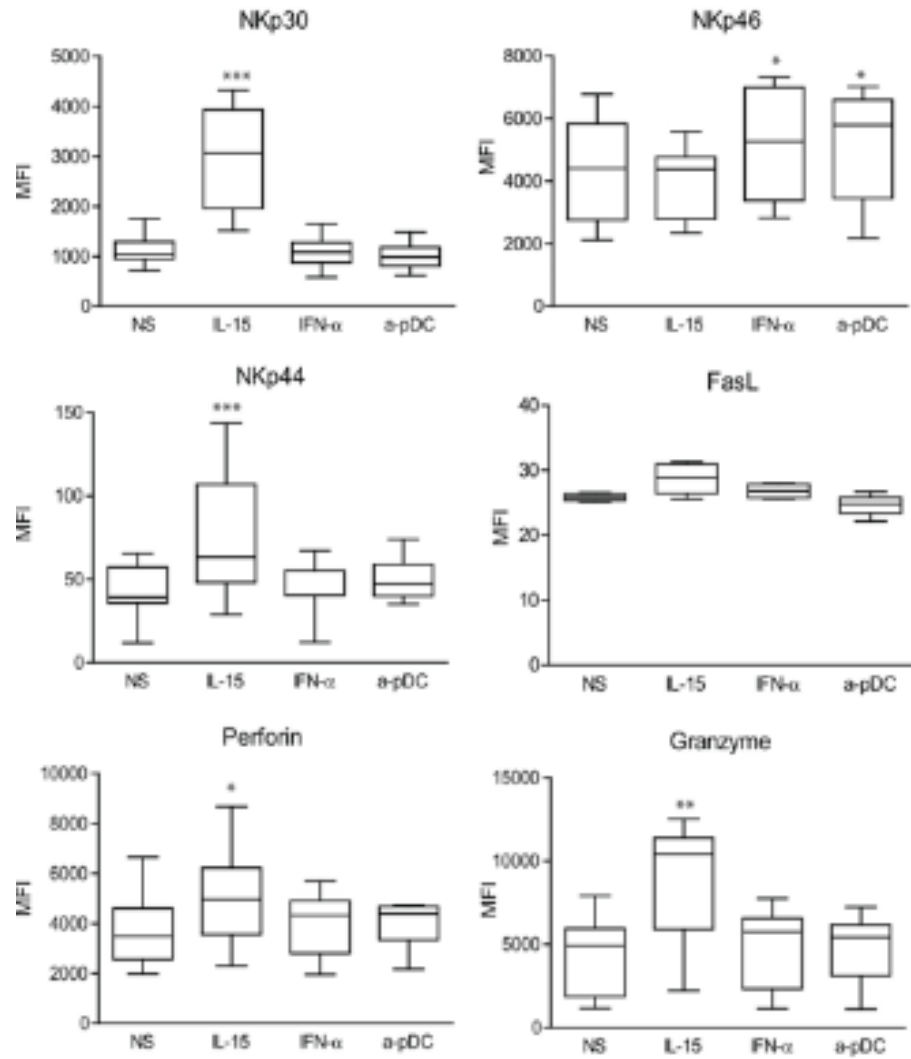


Figure 1S.2



### 3.4.1.3 Reprint permission

*PLOS applies the Creative Commons Attribution (CC BY) license to works we publish. Under this license, authors retain ownership of the copyright for their content, but they allow anyone to download, reuse, reprint, modify, distribute and/or copy the content as long as the original authors and source are cited.*

**Tiré de: <https://www.plos.org/license>**

### **3.4.2 Article 2 | STIMULATION OF PATIENT'S NATURAL KILLER CELLS BY ACTIVATED PLASMACYTOID DENDRITIC CELLS INCREASES EFFICACY OF IMMUNOTHERAPY AGAINST NEUROBLASTOMA**

#### **3.4.2.1 Préface**

Les résultats obtenus dans le premier article montrent que l'efficacité de l'immunothérapie anti-GD2 est augmentée lorsque les cellules NK sont stimulées par les pDC activées. En effet, la stimulation par les pDC induit un phénotype unique des cellules NK caractérisé par une forte expression de CD69 et de TRAIL. Ces résultats nous permettent d'envisager une nouvelle approche thérapeutique pour stimuler les fonctions anti-tumorales des cellules NK. Cette approche consiste à combiner l'administration de mAb anti-GD2 avec des transferts adoptifs de pDC activées. La possibilité d'obtenir de grandes quantités de pDC à usage thérapeutique à partir de précurseurs du sang de cordon rend cette approche réalisable

365.

Dans le but de confirmer la pertinence clinique de cette approche, nous avons reproduit les résultats obtenus avec des cellules NK provenant de patients atteints de NB prélevées au cours de l'immunothérapie anti-GD2. Afin de tester la fonctionnalité de l'axe pDC-NK chez les patients, nous avons examiné la reconstitution qualitative et quantitative des cellules NK et des pDC post-TCSHA et durant l'immunothérapie. Nous avons également étudié la réponse des cellules NK à une stimulation par des pDC activées. Enfin, nous avons testé la cytotoxicité des cellules NK du patient vis-à-vis des cellules de NB dérivées de sa propre tumeur.

#### **3.4.2.2 Contribution des auteurs**

A Belounis, S Herblot et M Duval ont mis au point le concept et la méthodologie de recherche ainsi que la validation des résultats et l'écriture de l'article. A Belounis a effectué les expérimentations, aidée conjointement par M Ayoub, S Herblot et P Cordeiro. W Lemieux a dérivé la lignée primaire SJ-N-TQ42. P Teira et E Haddad ont participé à l'analyse critique des résultats ainsi que la relecture de l'article. S Herblot et M Duval ont supervisé le projet de recherche.

# **Stimulation of patient's Natural Killer cells by activated plasmacytoid dendritic cells increases efficacy of immunotherapy against neuroblastoma**

Assila Belounis<sup>1,2</sup>, Marina Ayoub<sup>1</sup>, Paulo Cordeiro<sup>1</sup>, William Lemieux<sup>1,2</sup>, Pierre Teira<sup>1,3</sup>, Elie Haddad<sup>1,2</sup>, Sabine Herblot<sup>1,3\*</sup>, Michel Duval<sup>1,2,3,4</sup>

<sup>1</sup> Centre de cancérologie Charles-Bruneau, Centre de recherche du CHU Sainte-Justine, Montreal, Canada,

<sup>2</sup> Department of Microbiology and Immunology, University of Montreal, Quebec, Canada,

<sup>3</sup> Department of Pediatrics, University of Montreal, Quebec, Canada,

<sup>4</sup> Department of Biomedical Sciences, University of Montreal, Quebec, Canada,

\* Corresponding author

[sabine.herblot@umontreal.ca](mailto:sabine.herblot@umontreal.ca)

**Cet article a été accepté pour publication le 10 avril 2020 dans la revue *Cancer Immunology, Immunotherapy***

## ***Abstract***

Targeted immunotherapy has improved the outcome of patients with high-risk neuroblastoma (NB). However, immune escape of tumor cells still occurs and about 40% of NB patients relapse and die from their disease. We previously showed that Natural Killer (NK) cell stimulation by Toll-like receptor (TLR)-activated plasmacytoid dendritic cells (pDC) increases the efficacy of dinutuximab-based immunotherapy against NB cell lines via the TRAIL death-receptor pathway. With the aim to translate our findings into a novel adoptive therapy of TLR-activated pDC, we investigated the pDC/NK cell axis in NB patients undergoing dinutuximab-based immunotherapy. We show that pDC counts were low at the beginning of immunotherapy but reached normal levels over time. Blood NK cell counts were normal in all patients, although a high proportion of CD56<sup>bright</sup> CD16<sup>low/-</sup> cells was observed. The stimulation of patient's blood cells with a TLR9 ligand led to IFN- $\alpha$  production by pDC, and TRAIL expression on NK cell surface. Patient's NK cells expressed high levels of CD69 and TRAIL after stimulation with activated pDC. Both CD56<sup>bright</sup> CD16<sup>low/-</sup> and CD56<sup>dim</sup> CD16<sup>+</sup> NK cells degranulated against autologous target cells in the presence of dinutuximab. Importantly, pDC-induced NK cell activation increased the dinutuximab mediated autologous killing of patient-derived NB cells. Altogether, our study demonstrates that TLR-activated pDC strongly increase the cytotoxic functions of NK cells in high-risk NB patients undergoing immunotherapy. These results, therefore, support pDC adoptive immunotherapy as a novel approach to decrease the risk of relapse in patients with high-risk NB.

**Keywords:** Neuroblastoma, immunotherapy, anti-GD2 antibody, dinutuximab, natural killer cells, plasmacytoid dendritic cells.

## ***Background***

Neuroblastoma (NB) is a pediatric embryonal malignancy of the sympathetic nervous system occurring mostly in children under 5-year old [1]. Despite aggressive multimodal treatments, patients older than 18 months with a stage IV metastatic NB still have a poor survival rate and about 40% of them relapse and die from their disease [2, 3]. The current therapy comprises an induction treatment with multi-agent chemotherapy and surgery, a consolidation with high-dose chemotherapy followed by bone marrow rescue with autologous hematopoietic stem cell transplantation (aHSCT), radiotherapy of the primary tumor and finally differentiating therapy with isotretinoin (cisRA) [2, 4]. The addition of anti-GD2 (dinutuximab) immunotherapy significantly increased the survival of high-risk NB patients and dinutuximab-based immunotherapy has become a standard of care in high-risk NB patients, albeit with limited efficacy and considerable toxicity [3, 5]. To maximize the efficacy of anti-GD2 targeted immunotherapy, NB patients receive a concomitant immune stimulation with IL-2 and GM-CSF that increases antibody-mediated cellular cytotoxicity (ADCC) mediated by NK cells and granulocytes respectively [3, 6]. However, IL-2 treatment is associated with considerable toxicity including pain, flu-like syndrome, fever and capillary leak syndrome [7]. A recent randomized Phase III clinical trial by Ladenstein *et al.* further underscored that IL-2 treatment is associated to greater toxicity than dinutuximab alone and indicated that IL-2 may not be required for patients who had responded to induction and consolidation treatments [8]. Moreover, IL-2 could also induce apoptosis of NK cells due to over-activation and may induce T regulatory cell proliferation that might dampen the NK cell cytotoxic activity [9]. Treatment failure and relapse after anti-GD2 immunotherapy have also been attributed to low or heterogeneous expression of the targeted antigen [10, 11], as well as genetically driven patient-

to-patient differences in immune responses such as the presence of a self-KIR/HLA mismatch or the expression of FcγRIII variants [12-16]. Collectively, these results highlight the need for less toxic and more efficient strategies than IL-2 for NK cell stimulation along with dinutuximab therapy.

NK cells, the lymphocytes of the innate immune system, play a major role in tumor immunosurveillance and immune killing of infected or transformed cells without prior sensitization [17]. NK cells are subdivided in CD56<sup>dim</sup> CD16<sup>+</sup> and CD56<sup>bright</sup> CD16<sup>low/-</sup> populations with distinct phenotypic and functional features [18]. The majority of circulating blood NK cells are CD56<sup>dim</sup> CD16<sup>+</sup> and they are considered as effector cells with high cytotoxic potential, while CD56<sup>bright</sup> CD16<sup>low/-</sup> subset represents less than 10% of blood NK cells and deems to be mainly involved in cytokine production and immune regulation [19]. However, the cytolytic functions of CD56<sup>bright</sup> CD16<sup>low/-</sup> cells can be increased upon cytokine stimulation [19, 20]. The effector functions of NK cells are orchestrated by the balance between activating and inhibitory signals triggered by receptors at the surface cell [21, 22]. Activating signals include the recognition of tumor associated stress-induced molecules expressed on tumor cells by NK cell activating receptors such as DNAM-1, NKG2D and Natural killer cell receptors (NCR). Inhibitory signals are triggered by the interaction of NK cell inhibitory receptors such as killer immunoglobulin-like receptors (KIR) with human leukocyte antigen (HLA) class I molecules expressed on tumor cells. When the balance between activating and inhibitory signals leans toward cytotoxicity, NK cells release cytotoxic granules and kill target cells via the perforin/granzyme lytic pathway. In addition, the expression of ligands for death receptors such as the TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand (TRAIL) or FAS-ligand on activated NK cells



induces the apoptosis of target cells expressing the corresponding death receptors (TRAIL-R1, TRAIL-R2 or FAS).

Plasmacytoid dendritic cells (pDC) are type I Interferon (IFN) producing cells that sense viral RNA and DNA via their Toll-like receptors (TLR)-7 and 9 [23]. TLR-activated pDC are the natural activators of NK cell lytic functions. We showed that they induce a unique NK cell activated phenotype characterized by the high expression of TRAIL that could not be reproduced by cytokine stimulation alone [24-26]. Importantly, we revealed an additive effect of NK cell stimulation with pDC and anti-GD2 mediated ADCC for the killing of NB tumor cell lines expressing low or intermediate levels of GD2 [24]. Furthermore, we demonstrated that TRAIL-mediated apoptosis played a major role in the killing of NB cell lines by pDC-activated NK cells [24]. These findings uncovered the therapeutic potential of activated pDC for the treatment of high-risk NB patients.

Since deficient NK cell reconstitution or impaired NK cell lytic function during immunotherapy could impact the efficacy of both anti-GD2 and pDC therapies [27, 28], we aimed to verify the functionality of the pDC/NK cell axis in patients receiving anti-GD2 immunotherapy. We performed a longitudinal study of blood pDC and NK cell counts and we evaluated their function. We found that despite the high proportion of CD56<sup>bright</sup> CD16<sup>low/-</sup> subset, patient's NK cells expressed high level of TRAIL upon stimulation with activated pDC and were cytotoxic against patient-derived NB cells. In addition, NK cell stimulation with activated pDC strongly increased the efficacy of NK cell-mediated killing of autologous patient-derived NB cells.

## ***Methods***

### **Study design and patients**

Five consecutive high-risk NB patients treated and followed up at CHU Sainte-Justine were enrolled for this study between 2017 and 2019. One patient was excluded from the analysis because of early relapse and subsequent chemotherapy regimen. Patient characteristics are summarized in [Table 1](#). Research protocol was approved by the Institutional Review Board (IRB) of the CHU Sainte-Justine (Montreal, Canada) (#2016-976) and informed written consent was obtained from patient's guardians. Immunotherapy was initiated around day 100 after aHSCT and comprised five courses of dinutuximab (United Therapeutics, Silver Spring, MD), a therapeutic anti-GD2 antibody, in combination with alternating GM-CSF and IL-2 (COG protocol as described in [3]). A schematic diagram of the anti-GD2 immunotherapy timeline is shown in [Supplemental Fig. S1](#). P001 refused to receive IL-2 because of anticipated side effects received treatment with GM-CSF for all 5 courses. Patients were also treated with five cycles of cisRA as differentiating agent concomitant to immunotherapy. Patients' blood specimens were sampled at twelve time points before and along the anti-GD2 immunotherapy (days 0, 3, 6, 27, 56, 59, 62, 87, 90, 97, 112, 115, and 118). Blood samples from healthy volunteers were obtained after informed consent in accordance with the Declaration of Helsinki and CHU Sainte-Justine IRB approval and used as controls for each experiment.

### **Cell line**

SJ-N-TQ42 is a primary cell line established from NB bone-marrow metastases of patient P004 at the diagnosis. Briefly, bone marrow mononuclear cells were isolated by gradient centrifugation using Ficoll-Paque Plus (GE Healthcare Bio-Science AB, Uppsala, Sweden) and

cultured in Ham's F-12 medium supplemented with 20% heat-inactivated FBS for 7 days in a 5% CO<sub>2</sub> humidified atmosphere at 37°C. Cells were then cultured in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Wisent Bioproducts, St-Bruno, QC, Canada) supplemented with 10% heat-inactivated FBS. Passages were performed when confluence reached 80 to 90%.

### ***in vitro* pDC expansion and differentiation from purified CB CD34**

Human pDCs were generated from purified cord blood (CB) CD34<sup>+</sup> progenitors as previously described [29]. Briefly, CB units were obtained from the CHU Sainte-Justine Research Center cord blood bank with IRB approval. Mononuclear cells were isolated by gradient centrifugation using Ficoll-Paque Plus (GE Healthcare Bio-Science AB, Uppsala, Sweden), and CD34<sup>+</sup> cells were positively selected using magnetic beads (Miltenyi Biotec, San Diego, CA, USA). Purified cells were seeded at in serum-free expansion medium (StemSpan™ SFEM, StemCell Technologies, Vancouver, BC, Canada), complemented with recombinant human stem cell factor SCF (10 ng/mL), thrombopoietin (TPO) (50 ng/mL), FMS-like tyrosine kinase receptor 3 ligand (FLT3-L) (100 ng/mL) (all from R&D System, Minneapolis, MN, USA; or Miltenyi Biotec) and StemRegenin (SR1) (1 μM, Selleckchem, Houston, TX, USA). Every 2-3 days, culture medium was refreshed and after 7 days of culture, culture medium was replaced by StemSpan medium supplemented with human IL-7 (10 ng/mL, Miltenyi Biotec), TPO, FLT3-L, and SR1. Cultures were maintained for 14 days at 37 °C in a humidified incubator with 5% CO<sub>2</sub>. *In vitro* differentiated pDC were then purified by flow cytometry after staining with the following antibodies: phycoerythrin-indotricarbocyanine (PE/Cy7)-anti-human HLA-DR and allophycocyanin (APC)-anti-human CD123, BD Biosciences, San Jose, CA, USA). Dead cells were excluded using Sytox Blue dye. Cell sorting was performed on an Aria cell sorter (BD Biosciences). Sorted pDC (HLA-DR<sup>+</sup>/CD123<sup>high</sup> Sytox<sup>neg</sup>) were then resuspended in

RPMI1640 medium (Wisent) supplemented with 10% of heat-inactivated serum and used for NK cell stimulation experiments.

### **NK cell isolation and stimulation**

Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated by density gradient centrifugation using Ficoll-Paque Plus. Fresh PBMC were used to isolate NK cells by negative selection using magnetic beads (EasySep® enrichment kit, StemCell Technologies) according to manufacturer instructions. The purity of selected cells was assessed by flow cytometry and was each time above 95%. Purified NK cells were then plated in a 96-well round-bottom plate ( $2 \times 10^6$  cells/mL) in RPMI 1640 supplemented with 10% inactivated-FBS and IL-2 (20 IU/mL; Novartis Pharmaceuticals Canada, Dorval, Quebec, Canada). Low amount of IL-2 was added in all culture conditions because NK cells were isolated from patients receiving IL-2 (course 2 or/and 4). *In vitro* differentiated pDC were added in a pDC:NK ratio of 1:10. pDC were stimulated by adding a TLR9 ligand (CpG-A ODN2216, 10 µg/mL, InvivoGen, San Diego, CA, USA). Unstimulated and pDC-stimulated NK cells were incubated for 20h at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub> atmosphere.

### **Phenotype analysis using flow cytometry**

The phenotype and absolute counts of NK cells and pDC were assessed on whole blood samples after red blood cell lysis using flow cytometry. For NK cells, we used the following conjugated antibodies: APC-anti-human CD56, fluorescein isothiocyanate (FITC)-anti-human CD3, and PE/Cy7-anti-human CD16 (NK population was defined as CD56<sup>+</sup>/CD3<sup>-</sup>). For pDC, we used FITC-anti-human Lineage (CD3/14/16/19/20/56), PE-anti-human CD11c, PE/Cy7-anti-human HLA-DR, APC-anti-human CD123 and PE-anti human BDCA2 antibodies (pDC were defined

as Lin<sup>neg</sup>/CD11c<sup>neg</sup>/HLA-DR<sup>+</sup>/CD123<sup>high</sup> or Lin<sup>neg</sup> BDCA2<sup>+</sup>). Counting beads were added to each sample to allow for pDC and NK cell counting in whole blood samples.

NK cell activation was measured after overnight stimulation of whole blood samples or purified NK cells with TLR9L (CpG-A ODN2216) or CB derived TLR9L-activated pDC, respectively. Cells were harvested, washed, and then stained with conjugated antibodies: APC-anti-human CD56, PE/Cy7- or FITC-anti-human CD3, FITC- or APC-fire750-anti-human CD69, and PE-anti-human TRAIL.

The phenotype of SJ-N-TQ42 cells was assessed by flow cytometry using the following conjugated antibodies: PE-anti-human GD2, APC-anti-human CD133, PE-anti-human HLA-ABC, PE-anti-human MICA/B, PE-anti-human ULBP1, APC-anti-human ULBP2, PE-anti-human CD155 (PVR), PE-anti-human CD112 (Nectin-2), APC-anti-human TRAIL-R1 (DR4, CD261), PE-anti-human TRAIL-R2 (DR5, CD262), and PE-anti-human FAS.

In all experiments, dead cells were excluded using 7-AAD staining. All acquisitions were performed on a BD FACS Canto<sup>TM</sup> II (BD Biosciences, San Jose, CA, USA), and data analysis was performed using the FlowJo software (Tree Star, Ashland, OR, USA). All conjugated antibodies were purchased from BD Biosciences or Biolegend (San Diego, CA, USA).

### **NK cell cytotoxic assay**

NK cell-mediated cytotoxicity assays were performed by flow cytometry as previously described [24]. Briefly, target SJ-N-TQ42 cells were labelled with 3,3'-dihexyloxycarbocyanine iodide<sub>(18)</sub> (DiOC<sub>18</sub>), 10<sup>4</sup> cells per well were plated in 96-well flat bottomed plates and incubated overnight to allow adherence. For ADCC experiments, anti-GD2 ch14.18 mAb (1 µg/mL; dinutuximab, United Therapeutics, MD, USA) was added or not to NB target cells prior to the addition of NK cells.

Unstimulated and activated NK cells were incubated in triplicate with target NB cells at different effector:target (E:T) ratios (2:1 and 5:1). After a brief centrifugation to ensure contact between effectors and targets, plates were incubated at 37°C for 4h. NB cells were then trypsinized and collected. Dead cells were stained with propidium iodide (PI; Invitrogen), and viable NB cells were counted by flow cytometry using the BD™ High Throughput Sampler (HTS) Fortessa system (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). Data analyses were performed using the FlowJo software (Tree Star), and the percentages of specific cell lysis were calculated using the following formula:  $[(\# \text{absolute live cells} - \# \text{experimental live cells}) / (\# \text{absolute live cells})] \times 100$ .

### **NK cell-degranulation Assay**

Degranulation assays were performed as previously reported [30]. Briefly, activated NK cells and target cells were co-cultured at a 1:1 ratio at 37°C for 1h. GolgiStop (6 µg/mL; BD Biosciences, San Jose, CA, USA) was then added, and cells were incubated for an additional 4h at 37°C. When necessary, NB target cells were incubated with anti-GD2 ch14.18 mAb (1 µg/mL) before the co-culture with NK cells. After staining with APC-anti-human CD56 antibody and PE/Cy7-anti-human CD3, surface expression of CD107a was assessed using a Canto II cytometer (BD Biosciences), and data analysis was performed using the FlowJo software (Tree Star).

### **IFN- $\alpha$ quantification using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)**

Following overnight stimulation of 1 mL of whole blood samples with TLR9L (CpG-A ODN2216), supernatants were collected and stored at -80 °C. IFN- $\alpha$  quantification was

performed by ELISA following the manufacturer's protocol (PBL InterferonSource, Piscataway, NJ, USA).

### **Statistics**

One-way analysis-of-variance tests were used for multiple-group comparisons of paired data, and paired *t*-tests were used for single-data comparisons (Mann-Whitney test or Wilcoxon matched-pairs test GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

## ***Results***

### **NK cell counts and phenotype at the time of anti-GD2 immunotherapy**

We and others described that post-transplant NK cell reconstitution occurs within 3-4 weeks and NK cell counts reach normal levels by one month after allogeneic transplantation in patients with leukemia [31]. However, NK cell reconstitution following autologous HSCT in NB patients is less documented, and there is no data available about NK cell counts during immunotherapy [28]. We therefore performed a quantitative and phenotypic analysis of blood NK cells before and along the course of anti-GD2 immunotherapy in NB patients from our clinic. Five patients were enrolled between October 2017 and March 2019. One enrolled patient was subsequently excluded because of early relapse and subsequent chemotherapy and one patient refused to receive IL-2 because of expected side effects (**Table 1**). Absolute NK cell counts were measured on whole blood specimens sampled along the 5 courses of dinutuximab therapy (**Supplemental Fig. S1**). We observed that NK cell counts were similar to those measured in healthy controls (mean 78 cells/ $\mu$ L at the beginning of immunotherapy) and that they tended to increase during IL-2 treatment for 2 patients out of 3 that received IL-2 (**Fig. 1A**). We assessed the phenotype of NK cells using CD56 and CD16 staining and we observed a higher proportion of CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>low/-</sup> NK cells in patients throughout immunotherapy as compared with healthy controls (mean 38%  $\pm$  15.1 SD versus 6.1%  $\pm$  2.6 SD of total NK cells respectively) (**Fig. 1B and 1C**). Collectively, these results indicated that blood NK cells counts were normal in patients receiving dinutuximab immunotherapy after aHSCT. However, the high proportion of CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>low/-</sup> cells raised the question of their capacity to mediate efficient anti-GD2-dependent ADCC since they are expected to be mainly cytokine-producing



cells and CD16 is the receptor for the Fc fragment of immunoglobulins and therefore a main controller of NK cell-mediated ADCC [18, 19].

### **Normal pDC counts and function during dinutuximab immunotherapy**

We assessed the numbers and the function of blood pDC before and along immunotherapy courses. pDC counts were low before and at the beginning of immunotherapy (courses 1 and 2) but reached normal levels during courses 3, 4, and 5 (**Fig. 2A**). Whole blood cells from patients and healthy volunteers were stimulated overnight with a TLR9 ligand (ODN CpG2216) and IFN- $\alpha$  production was measured in the supernatant by ELISA. IFN- $\alpha$  production was induced by TLR9 stimulation for all patients and controls (**Fig. 2B**). We verified that pDC were the main IFN- $\alpha$  producing cells among whole blood cells in response to TLR9 stimulation. Using IFN- $\alpha$  intracellular staining and flow cytometry analysis, we observed that about 90% of IFN- $\alpha$  positive cells were pDC and that about 7 % of pDC produced IFN- $\alpha$  (**Supplemental Fig. S2**). Finally, we measured the NK cell response to TLR9-stimulated pDC, using TRAIL expression as a marker of pDC-induced NK cell activation [24]. We observed a significant increase of TRAIL surface expression on NK cells upon TLR9 stimulation as compared with unstimulated samples in all patients (**Fig. 2C**). Collectively, these results demonstrate that the pDC/NK cell axis is present and functional in high-risk NB patients at the time of dinutuximab immunotherapy.

### ***In vitro* differentiated pDC induced strong patient's NK cell activation**

We have demonstrated that *in vitro* differentiated pDC from CB-derived progenitors are strong inducers of NK cell activation and lytic functions [25]. We used these *in vitro* differentiated pDC to test whether NK cells isolated from high-risk NB patients undergoing anti-GD2

immunotherapy can be activated to the same extent as NK cells from healthy volunteers. We purified NK cells from patients and healthy controls using magnetic depletion and co-cultured them overnight with or without *in vitro* differentiated pDC and a TLR9 ligand (ODN CpG2216). We chose CD69 and TRAIL surface expressions as NK cell activation markers since we have previously showed that Natural Cytotoxic Receptors, DNAM-1 and NKG2D activating receptors were not upregulated by NK cells following activated pDC stimulation [24]. The surface expression of CD69 and TRAIL was increased on pDC-stimulated NK cells from all patients, to the same extent as on NK cells from healthy volunteers (**Fig. 3A-B**).

Since a high proportion of patient's NK cells were CD56<sup>bright</sup> CD16<sup>low/-</sup>, casting a doubt on their capacity to induce target lysis, we examined the expression of TRAIL on CD56<sup>bright</sup> and CD56<sup>dim</sup> NK cell subsets after culture with or without pDC (**Fig. 3C**). In the absence of stimulation, patient CD56<sup>bright</sup> CD16<sup>low/-</sup> NK cells displayed higher levels of TRAIL when compared with CD56<sup>dim</sup> CD16<sup>+</sup> NK subset (MFI mean 427 ± 124 vs 123 ± 25 respectively, n=8) or control CD56<sup>bright</sup> CD16<sup>low/-</sup> NK cells (MFI mean 427 ± 124 vs 182 ± 84, n=8). After co-culture with activated pDC, TRAIL expression on CD56<sup>bright</sup> CD16<sup>low/-</sup> NK subset was strongly upregulated in patients and controls (MFI mean 3336 ± 705 and 2114 ± 685 respectively, n=8). TRAIL surface expression also increased on CD56<sup>dim</sup> CD16<sup>+</sup> NK subset of both patients and controls after co-culture with activated pDC (MFI mean 123 ± 25 vs 1432 ± 800 for patients and 94 ± 30 vs 1091 ± 682 for controls, n=8).

As opposed to TRAIL expression, CD69 expression did not increase on CD56<sup>bright</sup> CD16<sup>low/-</sup> NK cells from healthy controls in agreement with our previously published results [24]. However, we observed an increase of CD69 expression on CD56<sup>bright</sup> CD16<sup>low/-</sup> NK cells from NB patients following stimulation with activated pDC (**Supplemental Fig. S3**). The proportion

of CD69<sup>+</sup> CD56<sup>bright</sup> cells was though variable among NB patients and sample time. We constitutively observed an increased expression of CD69 on CD56<sup>dim</sup> CD16<sup>+</sup> NK cells from NB patients and healthy controls.

These results indicate that despite the high proportion of CD56<sup>bright</sup> CD16<sup>low/-</sup> subset, patients' NK cells behave like healthy volunteers' NK cells in response to TLR9-activated pDC for the up-regulation of TRAIL. The high expression of TRAIL on both CD56<sup>dim</sup> CD16<sup>+</sup> and CD56<sup>bright</sup> CD16<sup>low/-</sup> NK populations upon pDC-stimulation suggests that both NK cell subsets are cytotoxic against TRAIL receptor expressing tumor cells.

### **Activated pDC increased NK cell lytic function against patient's NB cells**

We isolated primary neuroblasts from bone marrow metastases of patient P004. Bone marrow mononuclear cells were cultured and adherent cells were passaged until the establishment of a pure NB cell line named SJ-N-TQ42. The phenotype of these cells was determined by flow cytometry. SJ-N-TQ42 cells expressed GD2 with a large spectrum of intensity at the surface (**Fig. 4A**). They were negative for CD133. They expressed low levels of NKG2D ligands (MICA/B, ULBP1 and ULBP2), and high levels of DNAM1 ligands (PVR and Nectin-2), death receptors (TRAIL-R1 and -R2, FAS) and HLA-ABC (**Supplemental Fig. S4**).

The availability of SJ-N-TQ42 cells gave us the opportunity to test the cytotoxic activity of P004's NK cells against his own tumor. Isolated NK cells were co-cultured overnight with or without TLR9-activated pDC. *In vitro* cytotoxic assays were performed against SJ-N-TQ42 in the presence or in the absence of anti-GD2 mAb with unstimulated or pDC-activated NK cells. In the absence of anti-GD2 mAb, SJ-N-TQ42 cells were resistant to NK cell mediated lysis (< 5% specific lysis at E:T ratio 2:1 or 5:1, **Fig. 4B**). Both incubation with anti-GD2 mAb and pDC-induced NK cell stimulation increased patient NB sensitivity to NK cell mediated lysis

(34 % and 64% specific lysis at E:T ratio 5:1, respectively). The association of anti-GD2 mAb and pDC-induced NK cell stimulation further increased NK cell killing up to 69% at a E:T ratio 5:1 (**Fig. 4B**). These results indicate that pDC stimulation of NK cells overcome the resistance of patient's tumor cells to NK cell-mediated lysis. Importantly, we confirm the additive effect of dinutuximab and NK cell stimulation with activated pDC using NK cells from a NB patient against his own tumor cells.

Although we showed that patients' CD56<sup>bright</sup> CD16<sup>low/-</sup> NK cells expressed high levels of TRAIL upon stimulation by activated pDC, concern may remain about their ability to kill NB target using other pathways. Since pDC-stimulated NK cells do not express high levels of FAS ligand [24], we did not explore this pathway despite the high expression of FAS on SJ-N-TQ42 cells. We nonetheless explored the cytotoxic granule release against their own tumor cells in the presence or in the absence of anti-GD2. NK cells were isolated from patient P004 and cultured with or without activated pDC as above. As assessed by CD107a surface expression on CD56<sup>dim</sup> CD16<sup>+</sup> NK cells, cytotoxic granule release was low in the presence of target cells, and increased after incubation with dinutuximab, but not after NK cell stimulation with activated pDC (**Fig. 4C**). In contrast, cytotoxic granule release by CD56<sup>bright</sup> CD16<sup>low/-</sup> NK cells was spontaneously higher in the presence of target cells, and further increased both after incubation with dinutuximab and after NK cell stimulation with activated pDC (**Fig. 4C**). Cytotoxic granule release was even higher when incubation with dinutuximab was associated with NK cell stimulation with activated pDC.

## ***Discussion***

The present study reveals that the pDC/NK cell axis is functional after aHSCT in high-risk NB patients opening the way for a novel therapeutic approach to reinforce dinutuximab-based immunotherapy. We show that blood pDC counts were low at the beginning of immunotherapy but reached normal levels within 4 to 5 months. NB patients had normal blood NK cell counts from the beginning of the immunotherapy courses, although a high proportion of CD56<sup>bright</sup> CD16<sup>low/-</sup> was observed in all patients. Patient's NK cells responded to pDC stimulation by CD69 and TRAIL up-regulation. Importantly, pDC-induced NK cell activation increased the autologous killing of patient-derived NB cells.

Several strategies are currently explored to enhance the efficacy of anti-NB consolidation immunotherapy, each of them having its own limitations. These strategies include the adoptive transfers of haplo-identical NK cells after aHSCT and the development of T or NK cells expressing anti-GD2 specific chimeric antigen receptors (CAR). Recent Phase I clinical trials showed the feasibility and relative safety of haplo-identical NK cell infusions at the time of immunotherapy [6, 32, 33]. However, some limitations still need to be addressed, such as the limited amount of transferred NK cells and their low persistence. A dose of  $5 \times 10^6$  / kg was feasible in only 67% of the cases due to NK cell lost during selection and activation. Furthermore, no circulating NK cells could be detected 7 and 14 days after infusion in the majority of patients [6]. NK cell expansion prior to transfer has been proposed to address the dosage limitation but exhaustion and post-transfer apoptosis may limit the efficacy of this approach [34]. CAR-T cell therapy is being extensively developed, in particular for hematological cancers. However, for NB patients, the low persistence of anti-GD2 CAR-T cells due to rapid exhaustion has been shown to be the major limitation of this approach [35]. Indeed,

the self-aggregation of anti-GD2 CAR at the surface of transduced T cells and the subsequently signaling in the absence of antigen induces cell exhaustion and limits their survival after their infusion in the patient [36]. In addition, the side effects of anti-GD2 CAR might be even worse than anti-GD2 mAb, notably for neurological pain induced by the recognition of GD2 on peripheral nerves. Finally, data suggest that NB can escape anti-GD2 therapy by downregulating GD2 cell surface expression [10, 11]. CAR immunotherapy therefore requires the identification of novel NB-specific target antigens that are not expressed on normal nervous tissues and for which corresponding CAR does not induce immune effectors exhaustion.

As an alternative immunotherapeutic approach, we investigated the stimulation of patients' own immune system to increase the efficacy of anti-GD2 immunotherapy using the natural activators of NK cells, i.e. pDC. This approach takes advantage of the continuous production of NK cells from hematopoietic stem cells and, therefore, limits the risk of cell exhaustion usually observed with *ex vivo* expanded immune effectors. Indeed, we have shown that TLR-activated pDC enhance NK cell lytic functions against NK cell resistant tumors such as leukemia and NB cells lines [24-26]. In particular, we demonstrated the additive effect of pDC-induced NK cell activation and anti-GD2 mediated ADCC against NB cell lines expressing low or heterogeneous levels of GD2 [24]. We further showed that NB killing by pDC-stimulated NK cells involved several cytolytic pathways including TRAIL-mediated apoptosis, DNAM1-induced cytotoxic granule release, and ADCC in the presence of anti-GD2 mAb [24]. The involvement of at least three complementary cytolytic pathways is an important asset to prevent the immune escape of target cells and contrasts with the single-target CAR-T cell approach. Indeed, our recent study of GD2 expression of NB patients' specimens revealed that anti-GD2 immunotherapy failure is more frequent in patients with heterogeneous GD2 expression on NB cells [10], in line with

our findings that NB cells expressing low levels of GD2 are resistant to dinutuximab induced ADCC [10, 24]. Using high-risk NB patient's blood samples, we showed here that NK cell stimulation with activated pDC increases NK cell cytotoxicity against autologous NB cells, further paving the way to the use of this approach to enhance dinutuximab efficacy in patients. In the present study we assessed the blood cell counts and the function of NK cells in NB patients undergoing anti-GD2 immunotherapy. We show that, despite recent aHSCT, patients' NK cell counts were in the same range than that observed in controls and that patients' NK cells respond to TLR-activated pDC. Nassin *et al.* have reported a low NK cell counts at the beginning of immunotherapy in a series of 34 patients when compared to values in young children but nevertheless in the range of what is observed in older children and adults [28]. In that series, NK cell counts at the start of immunotherapy depends on the pre aHSCT conditioning regimen, and only two patients had received the current standard conditioning regimen (busulfan-melphalan) [3, 8]. NK cell counts were nonetheless not explored during the courses of immunotherapy. The authors observed a higher-than-normal proportion of CD56<sup>bright</sup> CD16<sup>low/-</sup> cells at the beginning of immunotherapy, reminiscent of what we observed in the present study and of what we and others observed after allogeneic HSCT [31, 37, 38]. We further observed that this high proportion of CD56<sup>bright</sup> CD16<sup>low/-</sup> persisted along the courses of immunotherapy. Several hypotheses could be proposed to explain the higher proportion of CD56<sup>bright</sup> CD16<sup>low/-</sup> NK cells in NB patients. First, the high proportion of CD56<sup>bright</sup> could result from a selective proliferative advantage of this subset over CD56<sup>dim</sup> in NB patients. Indeed, Bari *et al.* have recently described a CD56<sup>bright</sup> CD16<sup>low</sup> TRAIL<sup>high</sup> CX3CR1<sup>neg</sup> NK cell subset with high proliferative capacity [39]. Second, chemokine receptor expression on NK cells could be modulated by NB tumors resulting in the retention of CD56<sup>dim</sup> CD16<sup>+</sup> NK cells in the bone

marrow. Indeed, NB tumors produce high amounts of TGF- $\beta$ 1 that has shown to decrease the expression of CX3CR1 while increasing the expression of CXCR3 and CXCR4 on NK cells preventing the release of NK cells in the blood circulation [40]. Further investigations are nonetheless required to verify these hypotheses in NB patients.

When compared to those of healthy individuals, these CD56<sup>bright</sup> CD16<sup>low/-</sup> displayed a higher expression of TRAIL, both at baseline and after stimulation with activated pDC and higher expression of CD69 activation marker. When exposed to autologous NB cells, these CD56<sup>bright</sup> CD16<sup>low/-</sup> cells were degranulating at levels at least equal to those of CD56<sup>dim</sup> CD16<sup>+</sup> cells. These results indicates that CD56<sup>bright</sup> CD16<sup>low/-</sup> NK cells exhibit potent cytotoxic activity against tumor cells after stimulation. Interestingly, similar results were observed by others upon NK cell stimulation with IL-15 [20]. However, our previous published data have shown that TRAIL expression on both CD56<sup>bright</sup> and CD56<sup>dim</sup> NK cells was only induced upon stimulation with activated pDC and IFN- $\alpha$  to a lesser extend but not with IL-15 that induces TRAIL expression only on CD56<sup>bright</sup> NK cell subset [24]. These results indicate that activated pDC-based immunotherapy should be more efficient than mono-cytokine stimulation. Taken together, the high proportion of CD56<sup>bright</sup> CD16<sup>low/-</sup> at the time of immunotherapy does not indicate a lack of cytotoxic potential of patients' NK cells although NK cells require adequate stimulation.

Two main approaches could be used to stimulate patients' NK cells through the pDC/NK cell axis during dinutuximab immunotherapy: by activating patient's own pDC through the administration of TLR ligands, or by adoptive transfers of third-party activated pDC. No TLR9 or TLR7 ligand is currently available for clinical use by systemic route [41]. Furthermore, we show here that although pDC counts were normal after a few weeks of immunotherapy, they



were low at the first immunotherapy course. This may be due to the recent aHSCT, as we and others have demonstrated that pDC reconstitution is delayed after allogeneic HSCT [29, 37]. To circumvent these limitations, we have developed a pDC expansion procedure from cord blood progenitors that allows us to get sufficient amount of activated pDC for clinical use [25]. These *in vitro* differentiated pDC induce a strong *in vitro* and *in vivo* NK cell activation characterized by a high expression of TRAIL on NK cells. We have shown that adoptive transfers of such activated pDC were able to cure mice from acute lymphoblastic leukemia [25, 26]. As opposed to other DC-based immunotherapies, our data demonstrate that third-party *in vitro* differentiated activated pDC does not induce T cell activation and proliferation, and are not killed by allogeneic T cells or NK cells (manuscript in preparation). We show here that NK cells from NB patients are responsive to these activated pDC and exhibit enhanced killing activity against patient's NB cells *in vitro*. These results encourage us to propose the combination of adoptive transfers of activated pDC with dinutuximab immunotherapy for patients with high-risk NB. Future experiments will allow us to determine whether pDC-induced NK cell stimulation could replace IL-2 administration and allow for the reduction of dinutuximab dosage to minimize its toxic side effects, including pain, fever and allergic reactions.

### ***Conclusion***

Our data pave the way to harness the pDC/NK axis in order to increase the efficacy of dinutuximab-based immunotherapy in high-risk NB patients. As these patients experience considerable side effects, due to the concomitant use of IL-2 to activate NK cells and the off-target toxicity of dinutuximab, there is also a need for reducing toxicity. Further studies will delineate the role of this novel approach in the treatment of high-risk NB patients.

## ***List of Abbreviations***

ADCC: Antibody-dependent cellular cytotoxicity  
aHSCT: Autologous hematopoietic stem cell transplantation  
a-pDCs: TLR9 activated pDCs  
CB-pDCs: Cord blood derived pDCs  
CD: Cluster of differentiation  
Ch14.18: Chimeric human-murine monoclonal antibody (anti-GD2)  
cisRA: 13-cis-retinoic acid (isotretinoin)  
CMC: Complement mediated cytotoxicity  
COG: Children Oncology Group  
DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium  
ELISA: Enzyme-linked immunosorbent assay  
E:T: Effector against target  
FBS: Fetal bovine serum  
GD2: Disialoganglioside  
GM-CSF: Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor  
HLA: Human leukocyte antigen  
IFN: Interferon  
IL: Interleukin  
IU: International unit  
KIR: Killer immunoglobulin-like receptor  
MFI: Mean fluorescence intensity  
MICA/B: Major histocompatibility complex class I-related chain A/B  
MRD: Minimal residual disease  
NB: Neuroblastoma  
NK: Natural killer  
ODN: Oligonucleotide  
PBMC: Peripheral blood mononuclear cells  
pDCs: Plasmacytoid dendritic cells  
PVR: Poliovirus receptor  
RPMI: Roswell Park Memorial Institute medium

TLR: Toll-like receptor

TLR9L: Toll-like receptor 9 ligand

TRAIL: TNF-related apoptosis-inducing ligand

ULBP: UL16-binding protein

## ***Declarations***

### **Ethic approval and consent to participate**

Our study was approved by the Institutional Review Board (IRB) of the CHU Sainte-Justine (Montreal, Quebec, Canada) (#2016-976) and informed written consent was obtained from patient's guardians and healthy volunteers in accordance with the Declaration of Helsinki.

### **Consent for publication**

We confirm that the manuscript has been read and approved by all named authors and that there are no other persons who satisfied the criteria for authorship but are not listed. We further confirm that the order of authors listed in the manuscript has been approved by all of us.

### **Availability of data and materials**

All data generated and materials used in this study are presented in this manuscript or in its supplemental material.

### **Competing interests**

The authors declare that they have no competing interests.

### **Funding**

The Canadian Institutes of Health Research (Grant #142373) and The Foundation Charles-Bruneau supported this work. AB was supported by the Fonds de recherche du Québec en Santé, the Fondation CHU Sainte-Justine—Fondation des Étoiles and University of Montreal.

### **Authors' contributions**

AB conceived the study, performed the experiments, analysed the results and wrote the manuscript. MA, PC and SH helped with the experiments and the technical challenges.

WL isolated the patient-derived NB cells SJ-N-TQ42. PT and EH discussed the results and commented the manuscript. SH and MD designed the study, supervised the project and wrote the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

### **Acknowledgements**

The authors thank Dr. Hervé Sartelet for helpful comments during the study. The authors also thank Mathieu Roussy, Yves-Line Delva and Marie Saint-Jacques for blood sampling, Ines Boufaied for cell sorting, Marjolaine Blanchet and Thomas Sontag for the management of patient's samples, and all participating volunteers and patients for their valuable help.

## References

1. Maris JM (2010) Recent advances in neuroblastoma. *N Engl J Med.* 362: 2202-11. doi: 10.1056/NEJMra0804577
2. Smith V, Foster J (2018) High-Risk Neuroblastoma Treatment Review. *Children (Basel).* 5. doi: 10.3390/children5090114
3. Yu AL, Gilman AL, Ozkaynak MF, London WB, Kreissman SG, Chen HX, Smith M, Anderson B, Villablanca JG, Matthay KK, Shimada H, Grupp SA, Seeger R, Reynolds CP, Buxton A, Reisfeld RA, Gillies SD, Cohn SL, Maris JM, Sondel PM, Children's Oncology G (2010) Anti-GD2 antibody with GM-CSF, interleukin-2, and isotretinoin for neuroblastoma. *N Engl J Med.* 363: 1324-34. doi: 10.1056/NEJMoa0911123
4. Maris JM, Hogarty MD, Bagatell R, Cohn SL (2007) Neuroblastoma. *Lancet.* 369: 2106-20. doi: 10.1016/S0140-6736(07)60983-0
5. Cheung NK, Dyer MA (2013) Neuroblastoma: developmental biology, cancer genomics and immunotherapy. *Nat Rev Cancer.* 13: 397-411. doi: 10.1038/nrc3526
6. Kushner BH, Cheung IY, Modak S, Basu EM, Roberts SS, Cheung NK (2018) Humanized 3F8 Anti-GD2 Monoclonal Antibody Dosing With Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor in Patients With Resistant Neuroblastoma: A Phase 1 Clinical Trial. *JAMA Oncol.* 4: 1729-35. doi: 10.1001/jamaoncol.2018.4005
7. Ozkaynak MF, Gilman AL, London WB, Naranjo A, Diccianni MB, Tenney SC, Smith M, Messer KS, Seeger R, Reynolds CP, Smith LM, Shulkin BL, Parisi M, Maris JM, Park JR, Sondel PM, Yu AL (2018) A Comprehensive Safety Trial of Chimeric Antibody 14.18 With GM-CSF, IL-2, and Isotretinoin in High-Risk Neuroblastoma Patients Following Myeloablative Therapy: Children's Oncology Group Study ANBL0931. *Front Immunol.* 9: 1355. doi: 10.3389/fimmu.2018.01355
8. Yanik GA, Parisi MT, Naranjo A, Nadel H, Gelfand MJ, Park JR, Ladenstein RL, Poetschger U, Boubaker A, Valteau-Couanet D, Lambert B, Castellani MR, Bar-Sever Z, Oudoux A, Kaminska A, Kreissman SG, Shulkin BL, Matthay KK (2018) Validation of Postinduction Curie Scores in High-Risk Neuroblastoma: A Children's Oncology Group and SIOPEN Group Report on SIOPEN/HR-NBL1. *J Nucl Med.* 59: 502-8. doi: 10.2967/jnumed.117.195883
9. Bayer AL, Chirinos J, Cabello C, Yang J, Matsutani T, Malek TR, Levy RB (2011) Expansion of a restricted residual host T reg-cell repertoire is dependent on IL-2 following experimental autologous hematopoietic stem transplantation. *Eur J Immunol.* 41: 3467-78. doi: 10.1002/eji.201141611
10. Terzic T, Cordeau M, Herblot S, Teira P, Cournoyer S, Beaunoyer M, Peuchmaur M, Duval M, Sartelet H (2018) Expression of Disialoganglioside (GD2) in Neuroblastic Tumors:

A Prognostic Value for Patients Treated With Anti-GD2 Immunotherapy. *Pediatr Dev Pathol.* 21: 355-62. doi: 10.1177/1093526617723972

11. Schumacher-Kuckelkorn R, Volland R, Gradehandt A, Hero B, Simon T, Berthold F (2017) Lack of immunocytological GD2 expression on neuroblastoma cells in bone marrow at diagnosis, during treatment, and at recurrence. *Pediatr Blood Cancer.* 64: 46-56. doi: 10.1002/psc.26184
12. Forlenza CJ, Boudreau JE, Zheng J, Le Luque JB, Chamberlain E, Heller G, Cheung NK, Hsu KC (2016) KIR3DL1 Allelic Polymorphism and HLA-B Epitopes Modulate Response to Anti-GD2 Monoclonal Antibody in Patients With Neuroblastoma. *J Clin Oncol.* 34: 2443-51. doi: 10.1200/JCO.2015.64.9558
13. Erbe AK, Wang W, Carmichael L, Kim K, Mendonca EA, Song Y, Hess D, Reville PK, London WB, Naranjo A, Hank JA, Diccianni MB, Reisfeld RA, Gillies SD, Matthay KK, Cohn SL, Hogarty MD, Maris JM, Park JR, Ozkaynak MF, Gilman AL, Yu AL, Sondel PM (2018) Neuroblastoma Patients' KIR and KIR-Ligand Genotypes Influence Clinical Outcome for Dinutuximab-based Immunotherapy: A Report from the Children's Oncology Group. *Clin Cancer Res.* 24: 189-96. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-17-1767
14. Nguyen R, Houston J, Chan WK, Finkelstein D, Dyer MA (2018) The role of interleukin-2, all-trans retinoic acid, and natural killer cells: surveillance mechanisms in anti-GD2 antibody therapy in neuroblastoma. *Cancer Immunol Immunother.* 67: 615-26. doi: 10.1007/s00262-017-2108-6
15. Tarek N, Le Luque JB, Gallagher MM, Zheng J, Venstrom JM, Chamberlain E, Modak S, Heller G, Dupont B, Cheung NK, Hsu KC (2012) Unlicensed NK cells target neuroblastoma following anti-GD2 antibody treatment. *J Clin Invest.* 122: 3260-70. doi: 10.1172/JCI62749
16. Delgado DC, Hank JA, Kolesar J, Lorentzen D, Gan J, Seo S, Kim K, Shusterman S, Gillies SD, Reisfeld RA, Yang R, Gadbow B, DeSantes KB, London WB, Seeger RC, Maris JM, Sondel PM (2010) Genotypes of NK cell KIR receptors, their ligands, and Fcγ receptors in the response of neuroblastoma patients to Hu14.18-IL2 immunotherapy. *Cancer Res.* 70: 9554-61. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-2211
17. Gross E, Sunwoo JB, Bui JD (2013) Cancer immunosurveillance and immunoediting by natural killer cells. *Cancer J.* 19: 483-9. doi: 10.1097/PPO.0000000000000005
18. Freud AG, Mundy-Bosse BL, Yu J, Caligiuri MA (2017) The Broad Spectrum of Human Natural Killer Cell Diversity. *Immunity.* 47: 820-33. doi: 10.1016/j.immuni.2017.10.008
19. Michel T, Poli A, Cuapio A, Briquemont B, Iserentant G, Ollert M, Zimmer J (2016) Human CD56bright NK Cells: An Update. *J Immunol.* 196: 2923-31. doi: 10.4049/jimmunol.1502570

20. Wagner JA, Rosario M, Romee R, Berrien-Elliott MM, Schneider SE, Leong JW, Sullivan RP, Jewell BA, Becker-Hapak M, Schappe T, Abdel-Latif S, Ireland AR, Jaishankar D, King JA, Vij R, Clement D, Goodridge J, Malmberg KJ, Wong HC, Fehniger TA (2017) CD56bright NK cells exhibit potent antitumor responses following IL-15 priming. *J Clin Invest.* 127: 4042-58. doi: 10.1172/JCI90387
21. Long EO, Kim HS, Liu D, Peterson ME, Rajagopalan S (2013) Controlling natural killer cell responses: integration of signals for activation and inhibition. *Annu Rev Immunol.* 31: 227-58. doi: 10.1146/annurev-immunol-020711-075005
22. Moretta A, Bottino C, Vitale M, Pende D, Cantoni C, Mingari MC, Biassoni R, Moretta L (2001) Activating receptors and coreceptors involved in human natural killer cell-mediated cytotoxicity. *Annu Rev Immunol.* 19: 197-223. doi: 10.1146/annurev.immunol.19.1.197
23. Liu YJ (2005) IPC: professional type 1 interferon-producing cells and plasmacytoid dendritic cell precursors. *Annu Rev Immunol.* 23: 275-306. doi: 10.1146/annurev.immunol.23.021704.115633
24. Cordeau M, Belounis A, Lelaidier M, Cordeiro P, Sartelet H, Herblot S, Duval M (2016) Efficient Killing of High Risk Neuroblastoma Using Natural Killer Cells Activated by Plasmacytoid Dendritic Cells. *PLoS One.* 11: e0164401. doi: 10.1371/journal.pone.0164401
25. Diaz-Rodriguez Y, Cordeiro P, Belounis A, Herblot S, Duval M (2017) In vitro differentiated plasmacytoid dendritic cells as a tool to induce anti-leukemia activity of natural killer cells. *Cancer Immunol Immunother.* 66: 1307-20. doi: 10.1007/s00262-017-2022-y
26. Lelaidier M, Diaz-Rodriguez Y, Cordeau M, Cordeiro P, Haddad E, Herblot S, Duval M (2015) TRAIL-mediated killing of acute lymphoblastic leukemia by plasmacytoid dendritic cell-activated natural killer cells. *Oncotarget.* 6: 29440-55. doi: 10.18632/oncotarget.4984
27. Markasz L, Stuber G, Vanherberghen B, Flaberg E, Olah E, Carbone E, Eksborg S, Klein E, Skribek H, Szekely L (2007) Effect of frequently used chemotherapeutic drugs on the cytotoxic activity of human natural killer cells. *Mol Cancer Ther.* 6: 644-54. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-06-0358
28. Nassin ML, Nicolaou E, Gurbuxani S, Cohn SL, Cunningham JM, LaBelle JL (2018) Immune Reconstitution Following Autologous Stem Cell Transplantation in Patients with High-Risk Neuroblastoma at the Time of Immunotherapy. *Biol Blood Marrow Transplant.* 24: 452-9. doi: 10.1016/j.bbmt.2017.11.012
29. Charrier E, Cordeiro P, Brito RM, Harnois M, Mezziani S, Herblot S, Le Deist F, Duval M (2014) Impaired interferon-alpha production by plasmacytoid dendritic cells after cord blood transplantation in children: implication for post-transplantation toll-like receptor ligand-based immunotherapy. *Biol Blood Marrow Transplant.* 20: 1501-7. doi: 10.1016/j.bbmt.2014.06.007



30. Alter G, Malenfant JM, Altfeld M (2004) CD107a as a functional marker for the identification of natural killer cell activity. *J Immunol Methods*. 294: 15-22. doi: 10.1016/j.jim.2004.08.008
31. Charrier E, Cordeiro P, Brito RM, Mezziani S, Herblot S, Le Deist F, Duval M (2013) Reconstitution of maturing and regulatory lymphocyte subsets after cord blood and BMT in children. *Bone Marrow Transplant*. 48: 376-82. doi: 10.1038/bmt.2012.176
32. Talleur AC, Triplett BM, Federico S, Mamcarz E, Janssen W, Wu J, Shook D, Leung W, Furman WL (2017) Consolidation Therapy for Newly Diagnosed Pediatric Patients with High-Risk Neuroblastoma Using Busulfan/Melphalan, Autologous Hematopoietic Cell Transplantation, Anti-GD2 Antibody, Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor, Interleukin-2, and Haploidentical Natural Killer Cells. *Biol Blood Marrow Transplant*. 23: 1910-7. doi: 10.1016/j.bbmt.2017.07.011
33. Federico SM, McCarville MB, Shulkin BL, Sondel PM, Hank JA, Hutson P, Meagher M, Shafer A, Ng CY, Leung W, Janssen WE, Wu J, Mao S, Brennan RC, Santana VM, Pappo AS, Furman WL (2017) A Pilot Trial of Humanized Anti-GD2 Monoclonal Antibody (hu14.18K322A) with Chemotherapy and Natural Killer Cells in Children with Recurrent/Refractory Neuroblastoma. *Clin Cancer Res*. 23: 6441-9. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-17-0379
34. Barry WE, Jackson JR, Asuelime GE, Wu HW, Sun J, Wan Z, Malvar J, Sheard MA, Wang L, Seeger RC, Kim ES (2019) Activated Natural Killer Cells in Combination with Anti-GD2 Antibody Dinutuximab Improve Survival of Mice after Surgical Resection of Primary Neuroblastoma. *Clin Cancer Res*. 25: 325-33. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-18-1317
35. Richards RM, Sotillo E, Majzner RG (2018) CAR T Cell Therapy for Neuroblastoma. *Front Immunol*. 9: 2380. doi: 10.3389/fimmu.2018.02380
36. Long AH, Haso WM, Shern JF, Wanhainen KM, Murgai M, Ingaramo M, Smith JP, Walker AJ, Kohler ME, Venkateshwara VR, Kaplan RN, Patterson GH, Fry TJ, Orentas RJ, Mackall CL (2015) 4-1BB costimulation ameliorates T cell exhaustion induced by tonic signaling of chimeric antigen receptors. *Nat Med*. 21: 581-90. doi: 10.1038/nm.3838
37. Horvath R, Budinsky V, Kayserova J, Kalina T, Formankova R, Stary J, Bartunkova J, Sedlacek P, Spisek R (2009) Kinetics of dendritic cells reconstitution and costimulatory molecules expression after myeloablative allogeneic haematopoietic stem cell transplantation: implications for the development of acute graft-versus host disease. *Clin Immunol*. 131: 60-9. doi: 10.1016/j.clim.2008.10.009
38. Shenoy S, Mohanakumar T, Todd G, Westhoff W, Dunnigan K, Adkins DR, Brown RA, DiPersio JF (1999) Immune reconstitution following allogeneic peripheral blood stem cell transplants. *Bone Marrow Transplant*. 23: 335-46. doi: 10.1038/sj.bmt.1701581
39. Bari R, Granzin M, Tsang KS, Roy A, Krueger W, Orentas R, Schneider D, Pfeifer R, Moeker N, Verhoeyen E, Dropulic B, 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

40. Castriconi R, Dondero A, Bellora F, Moretta L, Castellano A, Locatelli F, Corrias MV, Moretta A, Bottino C (2013) Neuroblastoma-derived TGF-beta1 modulates the chemokine receptor repertoire of human resting NK cells. *J Immunol.* 190: 5321-8. doi: 10.4049/jimmunol.1202693

41. Smith M, Garcia-Martinez E, Pitter MR, Fucikova J, Spisek R, Zitvogel L, Kroemer G, Galluzzi L (2018) Trial Watch: Toll-like receptor agonists in cancer immunotherapy. *Oncoimmunology.* 7: e1526250. doi: 10.1080/2162402X.2018.1526250

## ***Figures legend***

### **Figure 1. NK cell recovery and phenotype in NB patients receiving dinutuximab therapy.**

A – Blood CD56<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup> NK cell counts from healthy volunteers (CTR, n=38), patient 1 (P001, n=11), patient 2 (P002, n=8, n=3 during IL-2 treatments), patient 4 (P004, n=9 and n=3, during IL-2 treatments), and patient 5 (P005, n=9 and n=3 during IL-2 treatments). Each symbol represents a specimen at different time points. Horizontal bars represent the median of NK cell counts. A Mann-Whitney test was used to compare NK cell counts in the presence or absence of IL-2 treatments (\**P* < .05).

B – Phenotypic analysis of blood NK cells. Whole blood cells from healthy volunteers (CTR) and patients were analysed by flow cytometry. NK cells were identified as CD56<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup> (left panels) and then subdivided in CD56<sup>bright</sup>D16<sup>low/-</sup> and CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup> subsets (right panels). Data are representative of 46 independent experiments.

C – High proportion of CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>low/-</sup> in NB patients along the anti-GD2 immunotherapy. Sunburst diagrams are composed of circle levels from centre to the surface corresponding to blood samples during anti-GD2 immunotherapy at day 0, 3, 6, 27, 56, 59, 62, 87, 90, 97, 112, 115 and 118. Each circle level displays CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>-/+</sup> (dark blue) and CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup> (light blue) proportion at a specific time point (CTR, n=12), (P001, n=11), (P002, n=11), (P004, n=12), (P005, n=12).

### **Figure 2. pDC recovery and function during dinutuximab immunotherapy**

A – Blood pDC counts along immunotherapy. Whole blood cells from healthy volunteers (CTR) and patients (P001, P002, P004, P005) were analysed by flow cytometry. pDC were defined as Lin<sup>-</sup>CD11c<sup>-</sup>HLA-DR<sup>+</sup>CD123<sup>high</sup>. Each symbol represents a specimen at different time points. Horizontal bars represent median values.

B – IFN- $\alpha$  production in response to whole blood stimulation with a TLR9 ligand. Whole blood from healthy volunteers (CTR) and patients were stimulated or not with a TLR9L (CpG-A ODN2216) for 20h. Secreted IFN- $\alpha$  was measured by ELISA in the supernatant. A Wilcoxon matched-pairs test was used to compare unstimulated to TLR9L stimulated samples (\*\* $P < .01$ ; \*\*\* $P < .001$ ).

D – NK cell response to whole blood cells stimulation with a TLR9 ligand. NK cells from healthy volunteers (CTR) and patients were identified as CD56<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup> cells and TRAIL expression was measured using flow cytometry (median of fluorescence, MFI). Mean of MFI  $\pm$  SD are represented (n=27 for CTR, n=11 for P001, n=10 for P002, n=12 for P004, n=12 for P005). A Wilcoxon matched-pairs test was used to compare unstimulated to TLR9L stimulated samples (\* $P < .05$ ; \*\* $P < .01$ ; \*\*\* $P < .001$ ).

**Figure 3. *In vitro* differentiated pDC induce strong activation of NK cells from NB patients**

Increased expression of CD69 (A) and TRAIL (B) on NK cells upon co-culture with activated *in vitro* differentiated pDC. Isolated NK cells were co-cultured for 20h with (a-pDC) or without (unst.) *in vitro* differentiated pDC. NK cells were then identified as CD56<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup> cells and stained for CD69 and TRAIL. The means of MFI  $\pm$  SD are represented (CTR, n=10), (P001, n=1), (P002, n=1), (P004, n=4), (P005, n=4). A Wilcoxon matched-pairs test was used to compare unstimulated to TLR9L stimulated samples (\* $P < .05$ ; \*\* $P < .01$ ; \*\*\* $P < .001$ ).

C – High expression of TRAIL on pDC-stimulated CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>low/-</sup> and CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup> NK cell subsets. Histograms are representative of 8 different samples at different time points.

**Figure 4. Additive effect of anti-GD2 and stimulation by pDC for NK cell degranulation and the killing of autologous patient's neuroblastoma cells.**

A – Large spectrum of GD2 expression on P004’s NB cells. SJ-N-TQ42 cells were stained with anti-GD2 mAb and analysed by flow cytometry.

B – NK cell cytotoxic assays against autologous patient’s NB cells. Purified NK cells from P004 were incubated with or without TLR9-activated pDC (a-pDC) for 20h prior to cytotoxic assays against autologous SJ-N-TQ42 NB cells in the presence or not of anti-GD2 mAb (ch14.18). Specific lysis of are represented for E:T ratio of 2:1 and 5:1. Due to the low amount of peripheral blood from very young patient, only two E:T ratios were performed and the results of one (E:T 5:1) or two (E:T 2:1) experiments are displayed.

C – NK cell degranulation assays against autologous patient’s NB cells. Unstimulated NK (unst) and stimulated NK cells (a-pDC, anti-GD2 mAb, or anti-GD2 mAb+a-pDC) were incubated with target cells at a ratio of 1:1 and stained with the anti-CD107a antibody. CD107a MFI are presented for CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>low/-</sup> and CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup> NK cells.

### *Legends of supplementary figures*

**Figure S1: Therapeutic and sampling schedule along dinutuximab immunotherapy.**

**Figure S2: Blood IFN- $\alpha$  producing cells are mainly pDC.**

Whole PBMC from healthy volunteers were incubated overnight with a TLR9L (CpG-A ODN2216) or unstimulated (unst.). Intracellular IFN- $\alpha$  expressing cells were assessed using flow cytometry after surface staining with CD123, HLA-DR and BDCA2 pDC specific markers. Representative dot plots are presented (n=4).

**Figure S3: CD69 expression is upregulated on both CD56<sup>bright</sup> and CD56<sup>dim</sup> NK cells from NB patients.**

Representative dot plots of CD69 and CD56 expression are presented for healthy control (CTL) and several NB patients' samples. NK cells were purified using magnetic negative selection and cultured overnight with (a-pDC) or without (unst.) activated pDC. Percentage of cells in each quadrant are indicated.

**Figure S4: SJ-N-TQ42 phenotype assessed by flow cytometry**

HLA, human leukocyte antigen; MICA/B, major histocompatibility complex class I-related chain A/B; ULBP, UL16-binding protein; PVR, poliovirus receptor; TRAIL, tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand; FAS, FS-7-associated surface antigen.

**Table 1 - Characteristics of patients (n=5).**

|                                                               |              |
|---------------------------------------------------------------|--------------|
| <i>Age, years</i>                                             |              |
| <i>Median</i>                                                 | 4            |
| <i>Range</i>                                                  | 3.33 - 15.75 |
| <i>Sex</i>                                                    |              |
| <i>Male</i>                                                   | 3            |
| <i>Female</i>                                                 | 2            |
| <i>Histology</i>                                              |              |
| <i>Favorable</i>                                              |              |
| <i>Unfavorable</i>                                            | 5            |
| <i>unknown</i>                                                |              |
| <i>INSS stage</i>                                             |              |
| <i>Stage 1</i>                                                |              |
| <i>Stage 2</i>                                                |              |
| <i>Stage 3</i>                                                |              |
| <i>Stage 4</i>                                                | 5            |
| <i>Unknown</i>                                                |              |
| <i>MYCN status</i>                                            |              |
| <i>Non-amplified</i>                                          | 3            |
| <i>Amplified</i>                                              | 2            |
| <i>Unknown</i>                                                |              |
| <i>Exclusion criteria</i>                                     |              |
| <i>Relapsed patient<br/>(chemotherapy +<br/>Dinutumixmab)</i> | 1            |

Figures

Figure 2.1

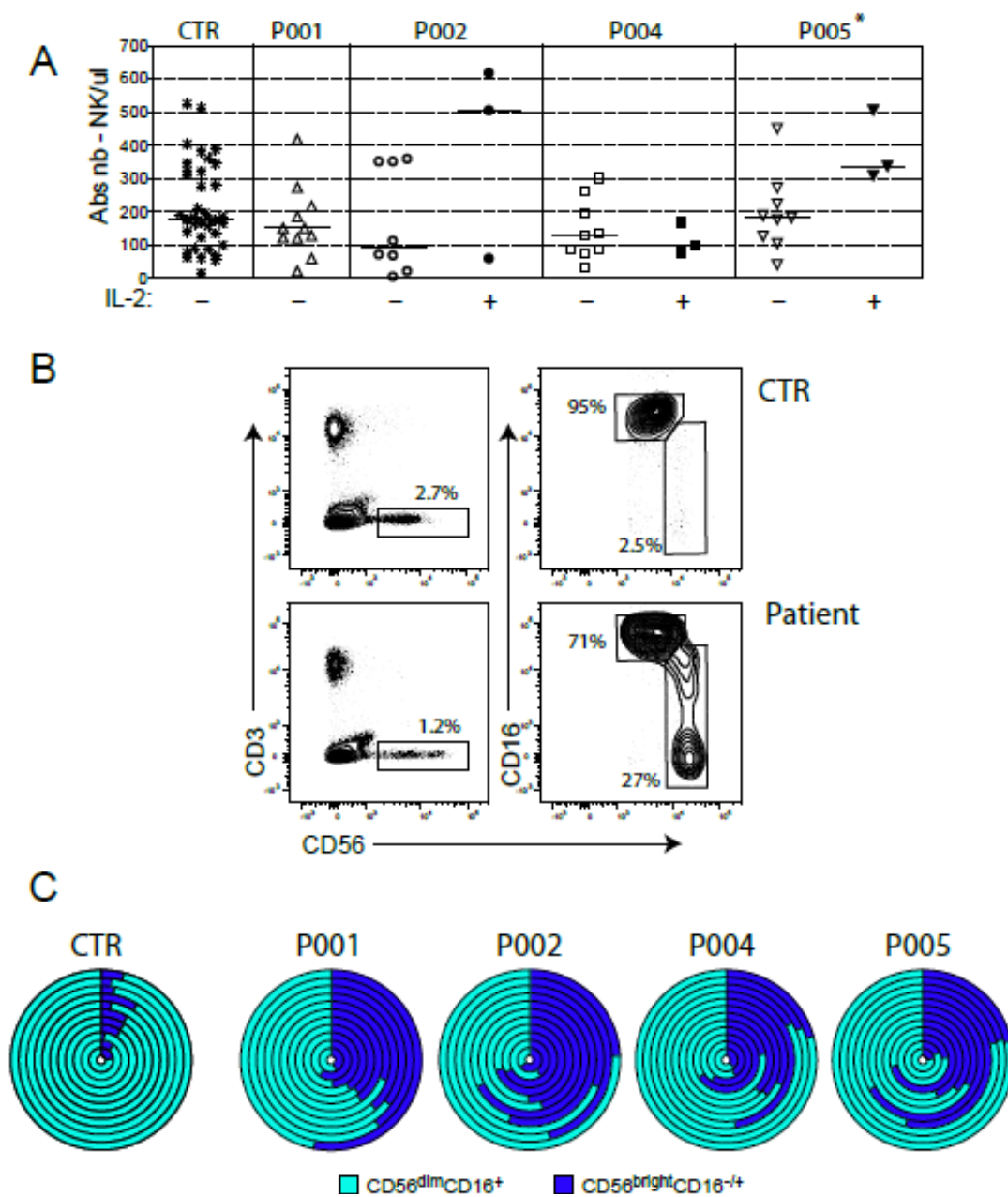




Figure 2.2

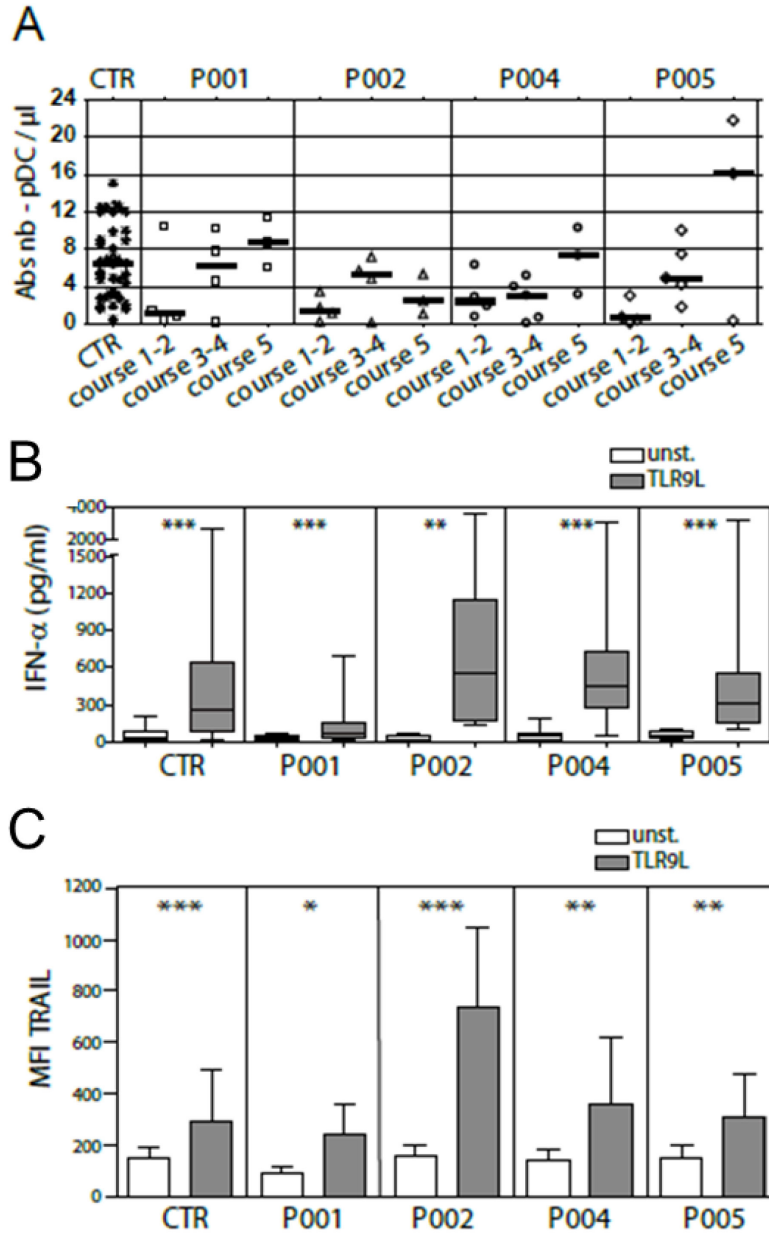


Figure 2.3

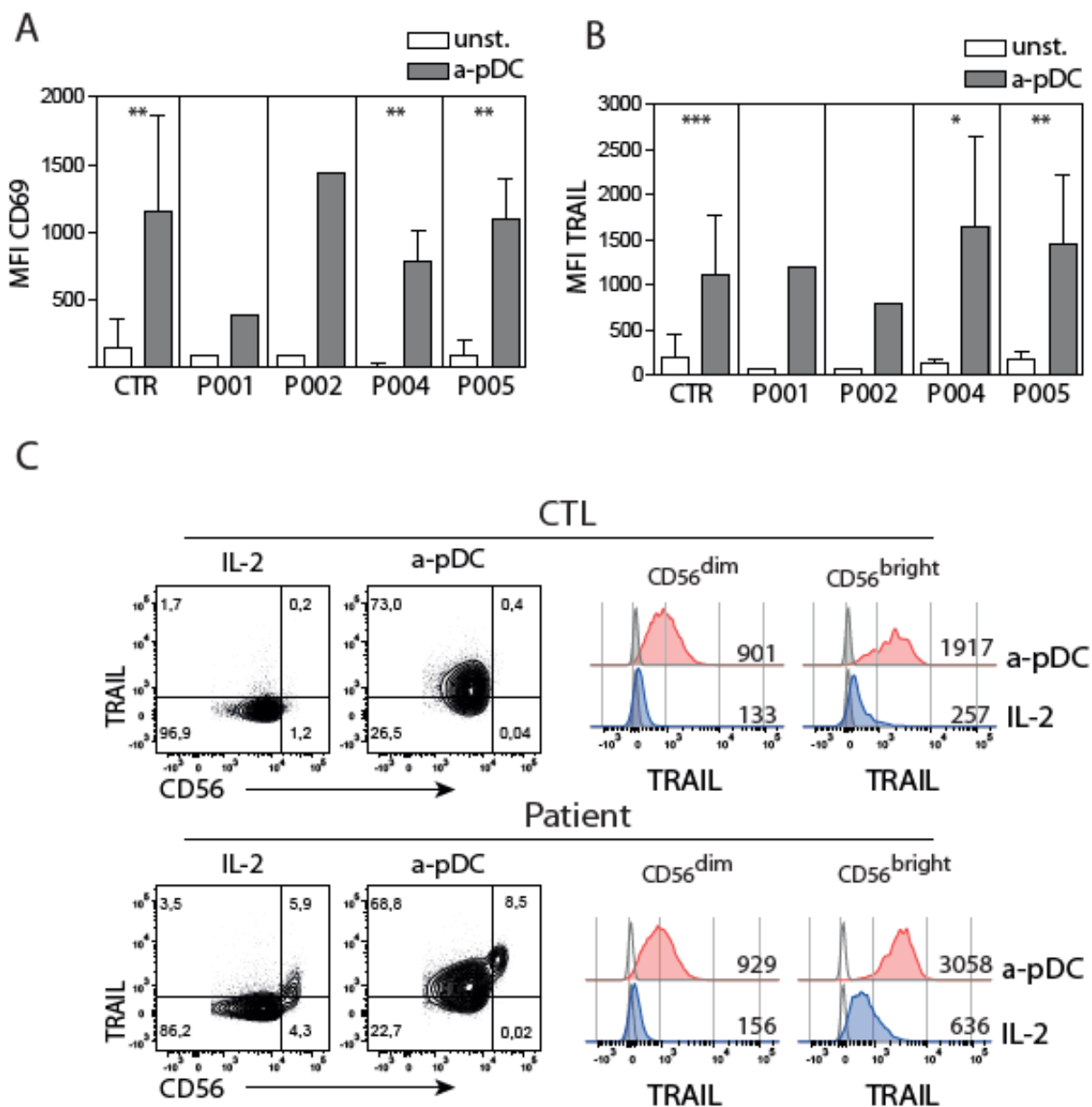


Figure 2.4

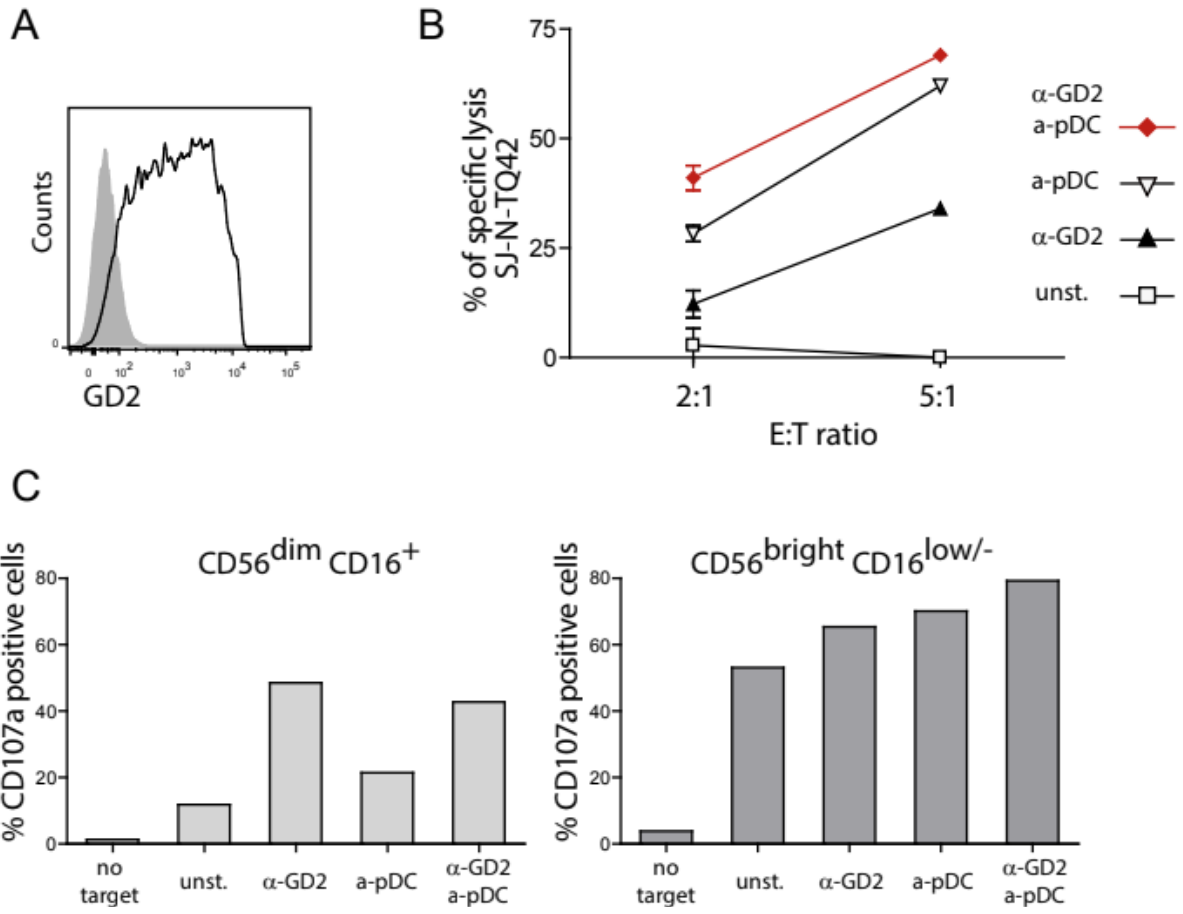


Figure 2S.1

|                       | Course 1      | Course 2      | Course 3      | Course 4      | Course 5      |
|-----------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| Time (days)           | 0-24          | 24-52         | 58-80         | 80-104        | 109-136       |
| Dinutuximab           | $\alpha$ -GD2 | $\alpha$ -GD2 | $\alpha$ -GD2 | $\alpha$ -GD2 | $\alpha$ -GD2 |
| Immunomodulator       | GM-CSF        | IL-2          | GM-CSF        | IL-2          | GM-CSF        |
| Differentiation agent | cisRA         | cisRA         | cisRA         | cisRA         | cisRA         |

Courses 1, 3, 5

| Days          | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10-13 | 24 |
|---------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|-------|----|
| GM-CSF        |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |       |    |
| $\alpha$ -GD2 |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |       |    |
| cisRA         |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |       |    |

Courses 2, 4

| Days          | 0 | 1 | 2 | 3 | 4-6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11-13 | 14-27 | 28 |
|---------------|---|---|---|---|-----|---|---|---|----|-------|-------|----|
| IL-2          |   |   |   |   |     |   |   |   |    |       |       |    |
| $\alpha$ -GD2 |   |   |   |   |     |   |   |   |    |       |       |    |
| cisRA         |   |   |   |   |     |   |   |   |    |       |       |    |


 Blood samples

Figure 2S.2

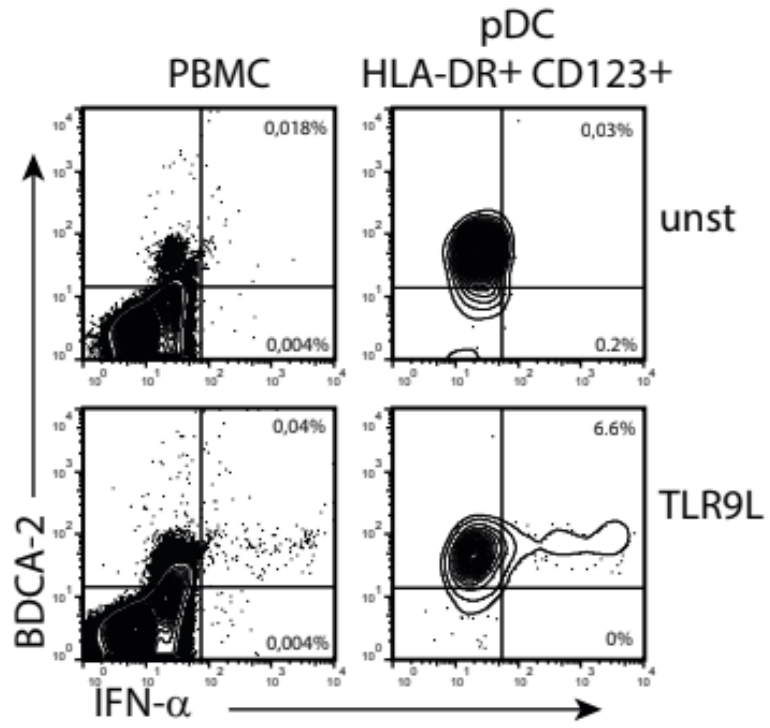


Figure 2S.3

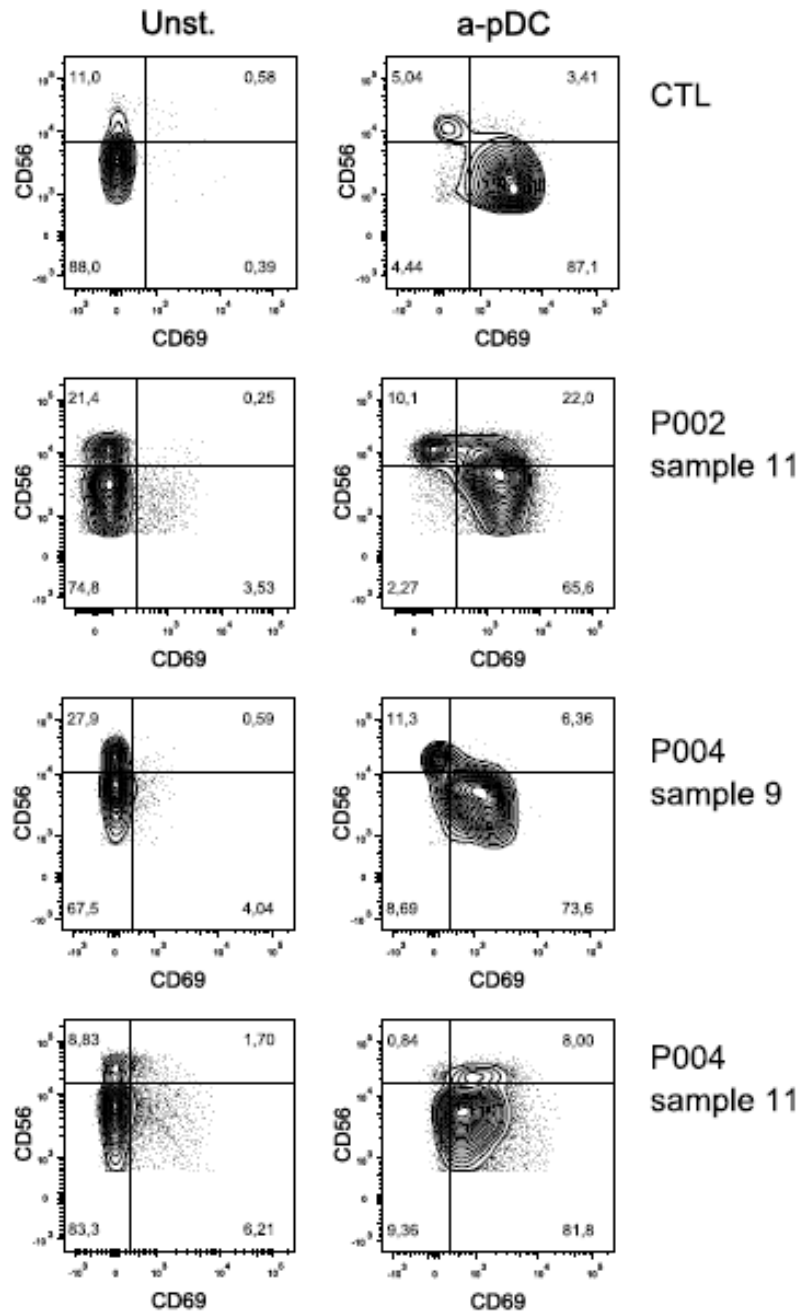
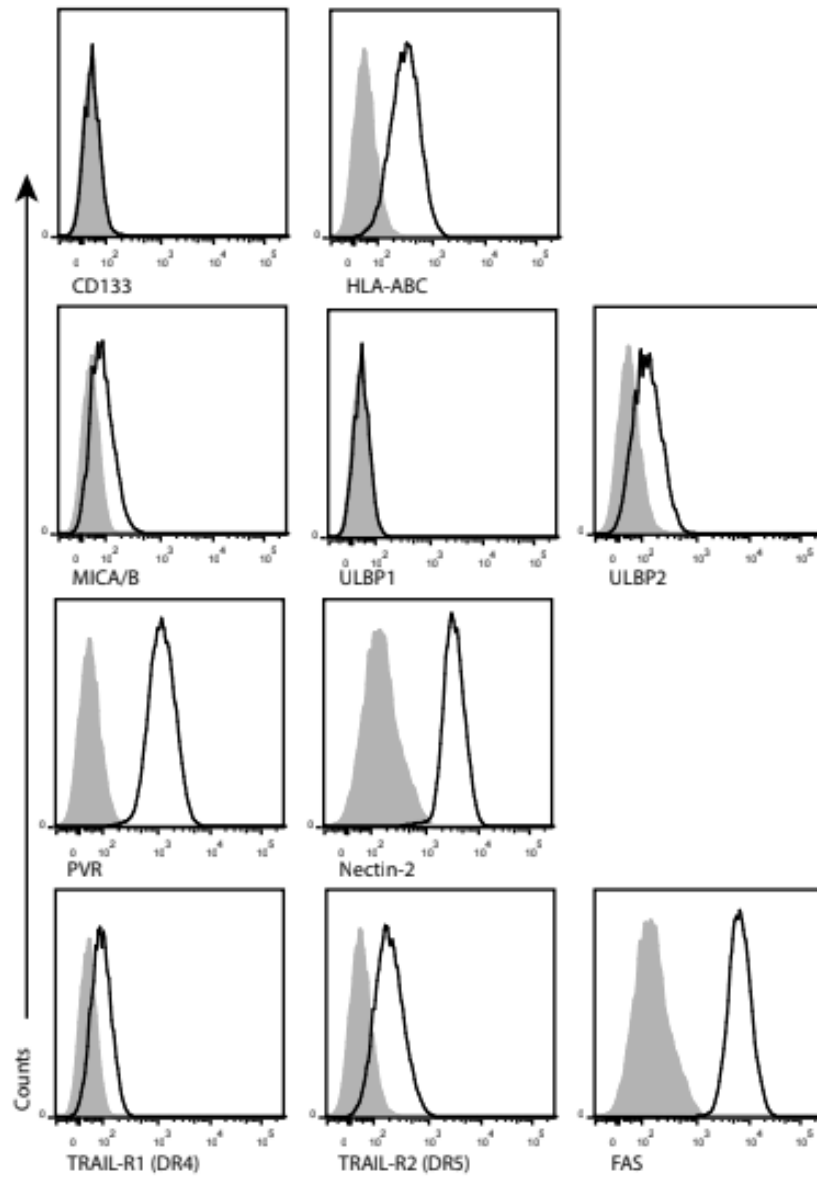


Figure 2S.4



## Discussion

L'immunothérapie anti-GD2 a marqué un tournant majeur dans le traitement contre le NB au cours des deux dernières décennies en améliorant la survie des patients atteints de NB à haut risque. Elle est actuellement l'approche de traitement adoptée contre la maladie résiduelle et consiste en l'administration de l'Ac monoclonal anti-GD2 avec des cytokines qui stimulent les effecteurs de l'ADCC, combiné à l'acide rétinoïque. Néanmoins, cette thérapie est associée à une toxicité considérable ainsi qu'à une inefficacité observée dans certains cas d'échappement immunitaire à travers la sous-expression du GD2 par les neuroblastes. Dans la perspective de conduire notre approche en clinique, nous avons testé l'hypothèse selon laquelle l'immunothérapie basée sur l'activation des cellules NK combinée au traitement anti-GD2 pourrait significativement augmenter l'efficacité de ce dernier et prévenir les rechutes du NB à haut risque.

Dans un premier temps, nous avons réalisé une preuve de concept *in vitro* en utilisant des cellules NK de volontaires sains. Celle-ci a permis d'illustrer la capacité des cellules NK stimulées par les pDC activées à afficher un phénotype d'activation unique leur conférant le pouvoir de lyser efficacement les cellules de NB. De plus, les mécanismes de cytotoxicité employés par les cellules NK stimulées ont été élucidés. En effet, ces mécanismes impliquent la voie de relargage des granules cytotoxiques médiée par DNAM-1 et l'apoptose induite par l'expression de TRAIL sur les cellules NK activées par les pDC.

Dans un deuxième temps, nous nous sommes assurés de la faisabilité de notre approche en examinant l'efficacité de notre modèle en utilisant des cellules NK de patients au moment de l'immunothérapie anti-GD2. Notre étude a prouvé la fonctionnalité de l'axe pDC-NK chez les patients à haut risque lors de l'immunothérapie. Ces patients avaient une reconstitution normale de cellules NK caractérisée par une prédominance de cellules NK CD56<sup>bright</sup>. Aussi, nous avons confirmé que la stimulation des cellules NK par les pDC augmente drastiquement l'efficacité de l'ADCC médiée par l'anti-GD2 dans la lyse des cellules du NB du patient. Ensemble, notre modèle représente une voie prometteuse pour l'amélioration de l'immunothérapie conventionnelle et pour la prévention des rechutes.



Nos résultats ont montré que la voie TRAIL et la libération de granules cytotoxiques médiée par DNAM-1, sont impliquées dans la lyse des neuroblastes par les cellules NK stimulées par les pDC activées. Plusieurs études ont déjà fait référence au rôle de DNAM-1 dans la lyse des cellules de NB par les cellules NK<sup>202,384</sup>. Par ailleurs, il a été démontré que l'IFN $\alpha$  augmente l'expression de TRAIL sur les cellules NK permettant une meilleure lyse des cellules tumorales<sup>349</sup>. De manière intéressante, nos résultats ont montré que le niveau d'expression de TRAIL est plus élevé sur les cellules NK stimulées avec les pDC activées que sur les cellules NK stimulées avec l'IFN $\alpha$  ou l'IL-15<sup>205</sup>. Ceci souligne l'avantage de la stimulation des cellules NK par les pDC leur conférant un profil d'activation optimal pour la lyse des neuroblastes. En plus, notre étude n'a pas montré une augmentation de l'expression des récepteurs NCR (NKp30, NKp44 et NKp46) à la surface des cellules NK stimulées avec les pDC activées comparée à une stimulation à l'IL-15 qui augmente l'expression des récepteurs NCR. Par conséquent, ces données suggèrent que les récepteurs NCR ne sont pas impliqués dans la lyse des neuroblastes par les cellules NK stimulées avec les pDC activées.

Ensuite, nous avons examiné la reconstitution des cellules NK chez les patients lors de l'immunothérapie anti-GD2. Nos résultats ont démontré que la reconstitution des cellules NK au moment de l'immunothérapie est normale mais néanmoins caractérisée par une grande proportion de cellules NK CD56<sup>bright</sup>. Plusieurs études indiquent que les cellules NK sont normalement présentes dans le sang des patients très tôt après la transplantation et ce indépendamment de la source du greffon<sup>352,385</sup>, y compris dans la transplantation autologue<sup>386</sup>. Notre étude vient confirmer ces études pour les patients atteints de NB<sup>387,388</sup>. Alors que des investigations plus poussées sont nécessaires afin d'expliquer l'émergence de la population NK CD56<sup>bright</sup> à la suite de la TCSH, les données de certains travaux nous amènent à poser plusieurs hypothèses. La proportion élevée des cellules CD56<sup>bright</sup> pourrait résulter d'un avantage sélectif de prolifération par rapport aux cellules CD56<sup>dim</sup>. En effet une étude de Bari *et al*, décrit une population CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>low</sup>TRAIL<sup>high</sup>CX3CR1<sup>neg</sup> avec une capacité proliférative élevée<sup>389</sup>. L'expression de récepteurs de chemokines à la surface des cellules NK pourrait également être modulée par le NB causant la rétention des cellules NK CD56<sup>dim</sup> dans la moelle osseuse. Le NB produit de hauts niveaux de TGF- $\beta$ 1 qui résulte en une augmentation de l'expression de

CX3CR1 et la diminution de l'expression de CXCR3 et CXCR4 sur les cellules NK CD56<sup>dim</sup> qui préviendrait leur libération dans la circulation <sup>390</sup>. Tel que mentionné précédemment, les cellules NK CD56<sup>bright</sup> ont un rôle d'immuno-modulation et produisent des cytokines en réponse à la stimulation. Dans cette optique, notre étude a examiné l'efficacité des cellules NK CD56<sup>bright</sup> dans la médiation de l'ADCC lors de l'immunothérapie anti-GD2. Effectivement, dans notre modèle, les cellules NK CD56<sup>bright</sup> dégranulent efficacement et affichent une forte expression de TRAIL une fois stimulées avec les pDC activées. Cependant, le nombre bas des cellules NK isolées en laboratoire ne nous a pas permis de réaliser des tests de cytotoxicité en utilisant spécifiquement les cellules NK CD56<sup>bright</sup> afin d'examiner leur potentiel cytotoxique contre les neuroblastes. Néanmoins, les données que nous avons portent à croire que cette sous population de cellules NK est aussi capable d'induire une réponse cytotoxique efficace, notamment en induisant l'apoptose via les récepteurs de mort reconnaissant TRAIL. D'autres études ont montré que les cellules NK CD56<sup>bright</sup> peuvent induire une réponse cytotoxique puissante une fois stimulées avec l'IL-15 <sup>391</sup>. Dans notre étude, les cellules NK isolées du patient lysent efficacement les neuroblastes du patient et améliorent significativement l'ADCC médiée par l'Ac monoclonal anti-GD2. Ces données suggèrent que la présence d'une population importante de cellules NK CD56<sup>bright</sup> en début d'immunothérapie n'indique pas un potentiel cytotoxique réduit mais requiert cependant une stimulation adéquate.

Par ailleurs, nous avons montré que les lignées de NB qui présentent une faible expression de GD2 sont résistantes à l'ADCC médiée par l'anti-GD2. Dans une autre étude, nous avons également constaté que les patients qui rechutent à la suite de l'immunothérapie anti-GD2 possèdent une expression hétérogène du GD2 <sup>188</sup>. Dans notre étude, nous avons démontré que les cellules NK activées par les pDC lysent les neuroblastes incluant les cellules GD2<sup>+</sup>. En effet, nous avons montré un effet additif de l'anti-GD2 et les cellules NK activées par les pDC dans la lyse des neuroblastes. Par conséquent cette approche permettrait de renforcer l'efficacité de l'immunothérapie anti-GD2 et éviter les rechutes.

Actuellement, les patients atteints de NB reçoivent de l'IL-2 et le GM-CSF afin d'améliorer l'efficacité de l'immunothérapie anti-GD2. Ces derniers augmentent l'effet ADCC médié par les cellules NK et les granulocytes, respectivement. Certaines études récentes remettent en question la pertinence d'utiliser l'IL-2 comme adjuvant au traitement anti-GD2.

Un essai clinique de phase III vient en effet de démontrer que l'IL-2 ne semble pas améliorer l'effet de l'anti-GD2 chez les patients atteints de NB<sup>340</sup>. En accord avec ce résultat, notre étude a démontré que l'IL-2 n'induit pas une augmentation du nombre des cellules NK chez tous les patients et nos essais de cytotoxicité montrent que l'IL-2 seule ne permet pas d'augmenter significativement la cytotoxicité des cellules NK vis-à-vis des cellules de NB. De plus, l'IL-2 pourrait induire l'apoptose des cellules NK due à une suractivation ou induire la prolifération des cellules T régulatrices qui inhiberaient en retour l'activation cytotoxiques des cellules NK<sup>392</sup>. Par conséquent, il existe un réel besoin de développer de nouvelles stratégies qui apportent plus de bénéfices thérapeutiques tout en induisant moins de toxicité.

Au cours de notre projet, nous nous sommes également intéressés à la reconstitution des pDC après TCSHA chez les patients atteints de NB. Malgré une faible reconstitution des pDC en début d'immunothérapie, celle-ci atteint des nouveaux normaux au fil du temps et répond à la stimulation du ligand du TLR9 en sécrétant de hauts niveaux d'IFN $\alpha$ . Aussi, ces pDC induisent une augmentation significative de l'expression de TRAIL à la surface des cellules NK. Ces observations réveillent l'intérêt de l'utilisation des ligands du TLR9 afin d'activer les pDC *in vivo*. Cependant, peu de ligands à usage clinique sont disponibles et la majorité cause d'importants effets indésirables<sup>393</sup>. Le procédé de différenciation et d'expansion de pDC *in vitro* développé dans le laboratoire permet d'obtenir suffisamment de pDC pour un usage thérapeutique<sup>365</sup>. Le transfert adoptif de pDC activées permettra d'une part de pallier le faible nombre de pDC en début d'immunothérapie et d'autre part évitera les effets secondaires liés à l'administration systémique d'un ligand du TLR9. Les pDC différenciées *in vitro* ont démontré leur efficacité dans notre modèle en induisant une forte expression de TRAIL sur les cellules NK de patients et en stimulant leur activité cytotoxique vis-à-vis des neuroblastes.

L'ensemble de ces résultats nous incite à proposer la combinaison de transferts adoptifs de pDC activées et de l'immunothérapie anti-GD2 chez les patients atteints de NB. Des travaux en cours dans le laboratoire montrent par ailleurs que les transferts adoptifs de pDC activées n'induisent pas d'effets indésirables tels que l'activation des lymphocytes T. Par conséquent, notre approche semble efficace et faisable dans les paramètres actuels de traitement du NB en comparaison avec d'autres approches telles que la thérapie cellulaire par les lymphocytes T ou les CAR-T anti-GD2.

En effet, plusieurs groupes de recherches s'intéressent au renforcement de l'immunothérapie basée sur les cellules NK dans le traitement de plusieurs cancers solides et hématologiques. Ces thérapies visent l'augmentation du nombre de cellules NK, de leur prolifération, de leur persistance ainsi que de leur activité cytotoxique. La nouvelle génération d'immunothérapies basées sur les cellules NK cibleraient quant à elles l'amplification des signaux activateurs, le blocage des signaux inhibiteurs (*immune checkpoint inhibitors*) ou l'augmentation de la migration de cellules NK vers le site tumoral. Ces stratégies thérapeutiques incluent: i) l'activation des cellules NK *in vivo* par des cytokines comme l'IL-2 ou l'IL-15 ; ii) le transfert adoptif de cellules NK expandues sur des cellules stimulatrices (*feeders*) comme les cellules K562 et/ou pré-activées à l'IL-12, l'IL-15 ou l'IL-18 ; iii) la manipulation génétique de cellules NK (CAR-T/NK) et iv) l'utilisation des *bispecific and trispecific killer cell engagers*, des molécules conçues pour former une synapse immunologique spécifique entre les cellules NK via le récepteur FcγRIII (CD16) et la cellule tumorale via un antigène tumoral spécifique<sup>394</sup>.

Les essais cliniques et précliniques montrent des résultats encourageants mais comportent toutefois plusieurs limitations. Par exemple, l'activation des cellules NK *in vivo* par l'administrant des cytokines présente non seulement un risque élevé de toxicité mais induit également l'exhaustion et l'apoptose des cellules NK. De plus, le nombre de cellules NK infusées, leur persistance chez le patient ainsi que l'exhaustion de ces derniers représentent les inconvénients principaux du transfert adoptif de cellules NK expandues et/ou activées *ex vivo*.<sup>395,396</sup> L'utilisation des *Bispecific and Trispecific Killer Cell Engagers* présente quant à elle le risque de la perte d'expression du CD16 ainsi que la perte d'expression de l'antigène tumoral<sup>397,398</sup>. Bien que des recherches soient en cours afin de développer des CAR-NK, les cellules NK n'impliquent pas de manipulations génétiques comme celles produites dans les CAR-T/NK dont les effets à moyens et à longs termes ne sont pas encore connus. Le désavantage des CAR réside également dans la durée et la complexité de leur processus de fabrication, leur faible persistance chez le patient due à l'exhaustion des effecteurs et enfin à la résistance des neuroblastes due à la sous-expression du GD2<sup>166,399</sup>. De plus, les CAR-T/NK peuvent induire une toxicité

importante à la suite du relargage de cytokines (*cytokine release syndrome*) et causer possiblement une atteinte des nerfs périphériques qui expriment le GD2<sup>166,400</sup>.

À l'opposé des stratégies mentionnées ci-haut, notre approche repose sur la reconstitution des cellules NK tôt après la TCSH qui permettrait d'éliminer rapidement la maladie résiduelle comparée à une reconstitution plus longue des lymphocytes T<sup>352</sup>. Aussi, dans un contexte de transplantation allogénique, les cellules NK ne sont pas affectées par les médicaments immunosuppresseurs administrés aux patients dans le but d'éviter la GVHD<sup>401-403</sup>. De plus, les cellules NK ne requièrent pas une sensibilisation préalable, ce qui permet son utilisation chez tous les patients, indépendamment de leur génotype. Les cellules NK vont spécifiquement cibler les cellules tumorales qui expriment des ligands activateurs (DAMP) évitant ainsi d'attaquer les tissus sains (GVHD). Les cellules NK seraient aussi plus attrayantes du fait qu'elles ne dépendent pas de l'antigène tumorale, mais dépendent en revanche d'une batterie de ligands activateurs et inhibiteurs qui permettent l'activation de plusieurs voies de lyse. Effectivement, nous avons montré que les cellules NK activées par les pDC impliquent plusieurs voies lytiques incluant la voie apoptotique dépendante de TRAIL, la libération de granules cytotoxiques induite par DNAM-1 et l'effet ADCC médié par l'anti-GD2, ce qui réduit les risques d'échappement immunitaires<sup>201,202,404</sup>.

En résumé, notre nouvelle approche de transfert adoptif de pDC activées comporte plusieurs avantages. En effet, outre son aspect innovateur, cette approche implique de moindres coûts comparée aux CAR-T/NK, n'induit pas la GVHD (absence d'activation de lymphocytes T par les pDC activées – manuscrit en préparation) et peut être réalisée chez tous les patients, indépendamment de leur génotype. Notre méthode de production de pDC en nombre suffisant permet la disponibilité d'un outil thérapeutique puissant capable d'activer les cellules NK chez le patient et d'induire une réponse anti-tumorale.

En conclusion, notre approche basée sur l'axe pDC-NK semble être une stratégie thérapeutique très prometteuse dans l'état actuel des traitements du NB à haut risque.

## Conclusions et perspectives

Notre étude préclinique réalisée dans le cadre de cette thèse a permis de bâtir les bases d'une nouvelle approche de stimulation des cellules NK pour éradiquer la maladie résiduelle et prévenir les rechutes de NB. Cette approche possède un réel potentiel pour améliorer l'effet de l'immunothérapie anti-GD2 et réduire la toxicité.

En utilisant des cellules NK provenant de volontaires sains ou de patients atteints de NB, nous avons prouvé l'efficacité de cette approche à la fois contre des neuroblastes ayant une expression hétérogène du GD2 et contre les cellules initiatrices de tumeur. Nous avons démontré que l'axe pDC-NK était fonctionnel chez les patients ayant reçu une TCSHA et l'immunothérapie anti-GD2. Toutefois, l'absence d'un agoniste efficace du TLR9 d'envisager une stimulation *in vivo* des pDC du patient. Un procédé unique de différenciation et d'expansion des pDC *in vitro* à partir de cellules souches hématopoïétiques provenant de sang de cordon ombilical nous permet d'envisager le transfert adoptif de pDC activées pour stimuler les cellules NK du patient. Ces pDC stimulées *in vitro* avec un ligand du TLR9 ont la capacité d'induire une meilleure activation des cellules NK que les pDC du sang périphérique. Présentement, la production de pDC à usage thérapeutique est en développement dans le laboratoire.

Notre approche sera subséquentement proposée pour un essai clinique chez les enfants atteints de NB à haut risque. Toutefois, à la lumière des résultats obtenus lors de nos recherches, certains aspects nécessitent une analyse plus approfondie afin de valider la faisabilité et l'application de notre approche chez le patient.

Tout d'abord, nous avons montré que la stimulation des cellules NK par les pDC activées est dépendante de l'IFN de type I, sans toutefois pouvoir suggérer précisément le ou les médiateurs responsables de cette stimulation. D'un point de vue clinique, il serait effectivement intéressant d'identifier les facteurs solubles impliqués dans la stimulation des cellules NK par les pDC activées puisque l'administration d'une cytokine unique directement chez le patient permettrait d'éviter la complexité que pourrait présenter la thérapie cellulaire. Des études préliminaires de transcriptome sur des pDC activées au CpG-ODN 2216 ont été réalisées dans

le laboratoire. Cependant, on n'a pas pu déterminer les molécules responsables de l'activation des cellules NK puisqu'un large éventail de molécules semble être sécrété par les pDC activées. Actuellement, d'autres avenues de recherches sont en cours de réalisation afin d'identifier ces molécules. Ce projet inclut également une étude approfondie sur les pDC générées *in vitro* à partir de cellules souches hématopoïétiques CD34. Effectivement, afin de montrer en partie l'innocuité de la thérapie cellulaire et avant le passage aux premières phases cliniques, il serait essentiel de caractériser les pDC générées en laboratoire. À cette fin, des études chez la souris ainsi que des études de séquençage de cellule unique (*single cell sequencing*) sont en cours de mise au point.

De plus, plusieurs études ont montré l'émergence précoce de la population NK CD56<sup>bright</sup> à la suite d'une TCSH indépendamment de la source du greffon. D'autres études ont également démontré qu'un microenvironnement immunosuppresseur induirait le recrutement de cellules NK CD56<sup>bright</sup> qui seraient faiblement cytotoxiques et une diminution des cellules NK CD56<sup>dim</sup>. Nos recherches ainsi que d'autres suggèrent que cette population de cellules NK est capable d'enclencher une activité cytotoxique contre les cellules tumorales. Dans cette optique, il serait très intéressant de comprendre les fonctions antitumorales que jouerait la population NK CD56<sup>bright</sup> chez les patients atteints de NB que ce soit en réponse à la stimulation par les pDC activées ou à l'immunothérapie anti-GD2 qui repose sur l'effet ADCC des cellules NK.

Ensuite, l'efficacité de notre approche dépend essentiellement de la capacité des cellules NK à infiltrer le microenvironnement tumoral et induire la lyse des cellules du NB ainsi que la capacité des pDC à activer les cellules NK du patient *in vivo*. Ce sont deux questions fondamentales dont les réponses permettraient de valider la faisabilité de notre approche en clinique. En effet, l'utilisation d'un modèle murin serait nécessaire afin de répondre à ces questions. Nous avons utilisé un modèle de souris NSG (*Nod/scid/γc<sup>-/-</sup>*) qui permet la greffe de tumeurs humaines et d'un système immunitaire humain par injection de cellules souches hématopoïétiques CD34<sup>+</sup>. Nos expérimentations initiales ont montré que les pDC injectées par intraveineuse chez des souris humanisées étaient retrouvées dans la rate. Cependant, d'autres manipulations seront nécessaires afin d'identifier les sites de migration des pDC après transfert adoptif. Aussi, nous avons montré que les cellules NK isolées de la rate et de la moelle osseuse de souris NSG présentent une augmentation de l'expression de TRAIL en réponse à l'injection

de pDC activées en comparaison au groupe contrôle<sup>405</sup>. Ceci suggère que la présence des pDC à proximité des cellules NK dans l'environnement tumorale ne semble pas être indispensable. Cette hypothèse est appuyée par nos résultats *in vitro* où l'on a montré par des essais de *transwell* que la stimulation des cellules NK par les pDC activées ne requiert pas la formation d'une synapse immunologique (Article 1 - Figure 4). Alors que la stimulation *in vivo* des cellules NK par le transfert adoptif de pDC activées semble être faisable, le défi principale de notre approche réside dans la capacité des cellules NK activées à infiltrer le microenvironnement tumorale et d'induire une action antitumorale. Plusieurs groupes de recherches concentrent leurs efforts sur la capacité des effecteurs immunitaires à infiltrer le microenvironnement tumorale particulièrement immunosuppresseif. Nous avons ainsi mis au point un modèle qui reproduit la maladie résiduelle du NB chez des souris humanisées en utilisant des cellules de NB qui expriment la luciférase. La progression tumorale sera alors suivie par imagerie bioluminescente. L'infiltration des cellules NK dans la tumeur pourrait alors être vérifiée par plusieurs techniques dont des études immunohistochimiques (IHC) sur les tumeurs développées chez les souris. En revanche, la difficulté principale qui pourrait être rencontrée serait l'identification des cellules NK communément reconnu à l'aide du marqueur CD56. Les cellules de NB expriment également le marqueur CD56, ce qui rendrait cette analyse plus complexe. De ce fait, une interprétation morphologique minutieuse ainsi que l'ajout de plusieurs marqueurs tel que PHOX2B seront par conséquent nécessaires afin de valider l'étude IHC.

Enfin, il serait essentiel de valider l'efficacité de notre approche dans l'élimination de la maladie résiduelle du NB. Nous avons préalablement montré que le transfert adoptif de pDC activées est capable de guérir les souris humanisées de la LAL (Annexe 1 – Article 3). La prochaine étape consistera à tester l'efficacité de notre approche en comparant la progression tumorale du NB et la survie des souris traitées par l'anti-GD2, par les pDC activées ou par la combinaison des deux traitements. Par ailleurs, nous n'avons pas observé de GVHD à la suite du traitement par les pDC activées chez les souris NSG. Néanmoins, il serait important d'évaluer et de caractériser les interactions entre les pDC activées et les lymphocytes T *in vivo*.



## Bibliographie

1. Matthay, K.K., *et al.* Neuroblastoma. *Nat Rev Dis Primers* **2**, 16078 (2016).
2. Maris, J.M. Recent advances in neuroblastoma. *N Engl J Med* **362**, 2202-2211 (2010).
3. Cheung, N.K. & Dyer, M.A. Neuroblastoma: developmental biology, cancer genomics and immunotherapy. *Nat Rev Cancer* **13**, 397-411 (2013).
4. Luksch, R., *et al.* Neuroblastoma (Peripheral neuroblastic tumours). *Crit Rev Oncol Hematol* **107**, 163-181 (2016).
5. Newman, E.A. & Nuchtern, J.G. Recent biologic and genetic advances in neuroblastoma: Implications for diagnostic, risk stratification, and treatment strategies. *Semin Pediatr Surg* **25**, 257-264 (2016).
6. Marshall, G.M., *et al.* The prenatal origins of cancer. *Nat Rev Cancer* **14**, 277-289 (2014).
7. Hansford, L.M., *et al.* Mechanisms of embryonal tumor initiation: distinct roles for MycN expression and MYCN amplification. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 12664-12669 (2004).
8. Wartiovaara, K., Barnabe-Heider, F., Miller, F.D. & Kaplan, D.R. N-myc promotes survival and induces S-phase entry of postmitotic sympathetic neurons. *J Neurosci* **22**, 815-824 (2002).
9. Huber, K. The sympathoadrenal cell lineage: specification, diversification, and new perspectives. *Dev Biol* **298**, 335-343 (2006).
10. Mosse, Y.P., *et al.* Germline PHOX2B mutation in hereditary neuroblastoma. *Am J Hum Genet* **75**, 727-730 (2004).
11. Trochet, D., *et al.* Germline mutations of the paired-like homeobox 2B (PHOX2B) gene in neuroblastoma. *Am J Hum Genet* **74**, 761-764 (2004).
12. Rybak, A., *et al.* A feedback loop comprising lin-28 and let-7 controls pre-let-7 maturation during neural stem-cell commitment. *Nat Cell Biol* **10**, 987-993 (2008).
13. Molenaar, J.J., *et al.* LIN28B induces neuroblastoma and enhances MYCN levels via let-7 suppression. *Nat Genet* **44**, 1199-1206 (2012).
14. Yu, J., *et al.* Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* **318**, 1917-1920 (2007).
15. Janoueix-Lerosey, I., *et al.* Somatic and germline activating mutations of the ALK kinase receptor in neuroblastoma. *Nature* **455**, 967-970 (2008).
16. Heck, J.E., Ritz, B., Hung, R.J., Hashibe, M. & Boffetta, P. The epidemiology of neuroblastoma: a review. *Paediatr Perinat Epidemiol* **23**, 125-143 (2009).
17. Irwin, M.S. & Park, J.R. Neuroblastoma: paradigm for precision medicine. *Pediatr Clin North Am* **62**, 225-256 (2015).
18. Tolbert, V.P. & Matthay, K.K. Neuroblastoma: clinical and biological approach to risk stratification and treatment. *Cell Tissue Res* **372**, 195-209 (2018).
19. Brodeur, G.M. & Bagatell, R. Mechanisms of neuroblastoma regression. *Nat Rev Clin Oncol* **11**, 704-713 (2014).
20. Whittle, S.B., *et al.* Overview and recent advances in the treatment of neuroblastoma. *Expert Rev Anticancer Ther* **17**, 369-386 (2017).

21. Yamamoto, K., *et al.* Marginal decrease in mortality and marked increase in incidence as a result of neuroblastoma screening at 6 months of age: cohort study in seven prefectures in Japan. *J Clin Oncol* **20**, 1209-1214 (2002).
22. Schilling, F.H., *et al.* Neuroblastoma screening at one year of age. *N Engl J Med* **346**, 1047-1053 (2002).
23. Woods, W.G., *et al.* Screening of infants and mortality due to neuroblastoma. *N Engl J Med* **346**, 1041-1046 (2002).
24. Shojaei-Brosseau, T., *et al.* Genetic epidemiology of neuroblastoma: a study of 426 cases at the Institut Gustave-Roussy in France. *Pediatr Blood Cancer* **42**, 99-105 (2004).
25. Morgenstern, D.A., *et al.* Prognostic significance of pattern and burden of metastatic disease in patients with stage 4 neuroblastoma: A study from the International Neuroblastoma Risk Group database. *Eur J Cancer* **65**, 1-10 (2016).
26. Levitt, G.A., Platt, K.A., De Byrne, R., Sebire, N. & Owens, C.M. 4S neuroblastoma: the long-term outcome. *Pediatr Blood Cancer* **43**, 120-125 (2004).
27. Strenger, V., *et al.* Diagnostic and prognostic impact of urinary catecholamines in neuroblastoma patients. *Pediatr Blood Cancer* **48**, 504-509 (2007).
28. Monclair, T., *et al.* The International Neuroblastoma Risk Group (INRG) staging system: an INRG Task Force report. *J Clin Oncol* **27**, 298-303 (2009).
29. Matthay, K.K., *et al.* Criteria for evaluation of disease extent by (123)I-metaiodobenzylguanidine scans in neuroblastoma: a report for the International Neuroblastoma Risk Group (INRG) Task Force. *Br J Cancer* **102**, 1319-1326 (2010).
30. Yanik, G.A., *et al.* Semiquantitative mIBG scoring as a prognostic indicator in patients with stage 4 neuroblastoma: a report from the Children's oncology group. *J Nucl Med* **54**, 541-548 (2013).
31. Shimada, H., *et al.* Terminology and morphologic criteria of neuroblastic tumors: recommendations by the International Neuroblastoma Pathology Committee. *Cancer* **86**, 349-363 (1999).
32. Bielle, F., *et al.* PHOX2B immunolabeling: a novel tool for the diagnosis of undifferentiated neuroblastomas among childhood small round blue-cell tumors. *Am J Surg Pathol* **36**, 1141-1149 (2012).
33. Brodeur, G.M., *et al.* International criteria for diagnosis, staging, and response to treatment in patients with neuroblastoma. *J Clin Oncol* **6**, 1874-1881 (1988).
34. Brodeur, G.M., *et al.* Revisions of the international criteria for neuroblastoma diagnosis, staging and response to treatment. *Prog Clin Biol Res* **385**, 363-369 (1994).
35. Cohn, S.L., *et al.* The International Neuroblastoma Risk Group (INRG) classification system: an INRG Task Force report. *J Clin Oncol* **27**, 289-297 (2009).
36. Peuchmaur, M., *et al.* Revision of the International Neuroblastoma Pathology Classification: confirmation of favorable and unfavorable prognostic subsets in ganglioneuroblastoma, nodular. *Cancer* **98**, 2274-2281 (2003).
37. Shimada, H., *et al.* Histopathologic prognostic factors in neuroblastic tumors: definition of subtypes of ganglioneuroblastoma and an age-linked classification of neuroblastomas. *J Natl Cancer Inst* **73**, 405-416 (1984).
38. Shimada, H., *et al.* The International Neuroblastoma Pathology Classification (the Shimada system). *Cancer* **86**, 364-372 (1999).

39. Ambros, P.F., *et al.* International consensus for neuroblastoma molecular diagnostics: report from the International Neuroblastoma Risk Group (INRG) Biology Committee. *Br J Cancer* **100**, 1471-1482 (2009).
40. Look, A.T., Hayes, F.A., Nitschke, R., McWilliams, N.B. & Green, A.A. Cellular DNA content as a predictor of response to chemotherapy in infants with unresectable neuroblastoma. *N Engl J Med* **311**, 231-235 (1984).
41. Van Roy, N., *et al.* The emerging molecular pathogenesis of neuroblastoma: implications for improved risk assessment and targeted therapy. *Genome Med* **1**, 74 (2009).
42. Schneiderman, J., *et al.* Clinical significance of MYCN amplification and ploidy in favorable-stage neuroblastoma: a report from the Children's Oncology Group. *J Clin Oncol* **26**, 913-918 (2008).
43. Look, A.T., *et al.* Clinical relevance of tumor cell ploidy and N-myc gene amplification in childhood neuroblastoma: a Pediatric Oncology Group study. *J Clin Oncol* **9**, 581-591 (1991).
44. Grandori, C., Cowley, S.M., James, L.P. & Eisenman, R.N. The Myc/Max/Mad network and the transcriptional control of cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol* **16**, 653-699 (2000).
45. Huang, M. & Weiss, W.A. Neuroblastoma and MYCN. *Cold Spring Harb Perspect Med* **3**, a014415 (2013).
46. Schwab, M., *et al.* Amplified DNA with limited homology to myc cellular oncogene is shared by human neuroblastoma cell lines and a neuroblastoma tumour. *Nature* **305**, 245-248 (1983).
47. Brodeur, G.M., Seeger, R.C., Schwab, M., Varmus, H.E. & Bishop, J.M. Amplification of N-myc in untreated human neuroblastomas correlates with advanced disease stage. *Science* **224**, 1121-1124 (1984).
48. Tonini, G.P., *et al.* MYCN oncogene amplification in neuroblastoma is associated with worse prognosis, except in stage 4s: the Italian experience with 295 children. *J Clin Oncol* **15**, 85-93 (1997).
49. Zimmerman, K.A., *et al.* Differential expression of myc family genes during murine development. *Nature* **319**, 780-783 (1986).
50. Corvi, R., Amler, L.C., Savelyeva, L., Gehring, M. & Schwab, M. MYCN is retained in single copy at chromosome 2 band p23-24 during amplification in human neuroblastoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 5523-5527 (1994).
51. Mosse, Y.P., Greshock, J., Weber, B.L. & Maris, J.M. Measurement and relevance of neuroblastoma DNA copy number changes in the post-genome era. *Cancer Lett* **228**, 83-90 (2005).
52. Mosse, Y.P., *et al.* Neuroblastomas have distinct genomic DNA profiles that predict clinical phenotype and regional gene expression. *Genes Chromosomes Cancer* **46**, 936-949 (2007).
53. Chen, Q.R., *et al.* cDNA array-CGH profiling identifies genomic alterations specific to stage and MYCN-amplification in neuroblastoma. *BMC Genomics* **5**, 70 (2004).
54. Vandesompele, J., *et al.* Multicentre analysis of patterns of DNA gains and losses in 204 neuroblastoma tumors: how many genetic subgroups are there? *Med Pediatr Oncol* **36**, 5-10 (2001).

55. Caren, H., *et al.* High-resolution array copy number analyses for detection of deletion, gain, amplification and copy-neutral LOH in primary neuroblastoma tumors: four cases of homozygous deletions of the CDKN2A gene. *BMC Genomics* **9**, 353 (2008).
56. van Noesel, M.M. & Versteeg, R. Pediatric neuroblastomas: genetic and epigenetic 'danse macabre'. *Gene* **325**, 1-15 (2004).
57. Attiyeh, E.F., *et al.* Chromosome 1p and 11q deletions and outcome in neuroblastoma. *N Engl J Med* **353**, 2243-2253 (2005).
58. Bader, S.A., Fasching, C., Brodeur, G.M. & Stanbridge, E.J. Dissociation of suppression of tumorigenicity and differentiation in vitro effected by transfer of single human chromosomes into human neuroblastoma cells. *Cell Growth Differ* **2**, 245-255 (1991).
59. Caren, H., *et al.* High-risk neuroblastoma tumors with 11q-deletion display a poor prognostic, chromosome instability phenotype with later onset. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 4323-4328 (2010).
60. Bosse, K.R. & Maris, J.M. Advances in the translational genomics of neuroblastoma: From improving risk stratification and revealing novel biology to identifying actionable genomic alterations. *Cancer* **122**, 20-33 (2016).
61. Bown, N., *et al.* 17q gain in neuroblastoma predicts adverse clinical outcome. U.K. Cancer Cytogenetics Group and the U.K. Children's Cancer Study Group. *Med Pediatr Oncol* **36**, 14-19 (2001).
62. Mosse, Y.P., *et al.* Identification of ALK as a major familial neuroblastoma predisposition gene. *Nature* **455**, 930-935 (2008).
63. Bresler, S.C., *et al.* ALK mutations confer differential oncogenic activation and sensitivity to ALK inhibition therapy in neuroblastoma. *Cancer Cell* **26**, 682-694 (2014).
64. Iwahara, T., *et al.* Molecular characterization of ALK, a receptor tyrosine kinase expressed specifically in the nervous system. *Oncogene* **14**, 439-449 (1997).
65. Hallberg, B. & Palmer, R.H. Mechanistic insight into ALK receptor tyrosine kinase in human cancer biology. *Nat Rev Cancer* **13**, 685-700 (2013).
66. Chiarle, R., Voena, C., Ambrogio, C., Piva, R. & Inghirami, G. The anaplastic lymphoma kinase in the pathogenesis of cancer. *Nat Rev Cancer* **8**, 11-23 (2008).
67. Azarova, A.M., Gautam, G. & George, R.E. Emerging importance of ALK in neuroblastoma. *Semin Cancer Biol* **21**, 267-275 (2011).
68. Chen, Y., *et al.* Oncogenic mutations of ALK kinase in neuroblastoma. *Nature* **455**, 971-974 (2008).
69. de Pontual, L., *et al.* Germline gain-of-function mutations of ALK disrupt central nervous system development. *Hum Mutat* **32**, 272-276 (2011).
70. Wang, Y., *et al.* Novel ALK inhibitor AZD3463 inhibits neuroblastoma growth by overcoming crizotinib resistance and inducing apoptosis. *Sci Rep* **6**, 19423 (2016).
71. Guan, J., *et al.* Clinical response of the novel activating ALK-I1171T mutation in neuroblastoma to the ALK inhibitor ceritinib. *Cold Spring Harb Mol Case Stud* **4**(2018).
72. Berry, T., *et al.* The ALK(F1174L) mutation potentiates the oncogenic activity of MYCN in neuroblastoma. *Cancer Cell* **22**, 117-130 (2012).
73. Liu, Z. & Thiele, C.J. ALK and MYCN: when two oncogenes are better than one. *Cancer Cell* **21**, 325-326 (2012).
74. Mosse, Y.P., *et al.* Safety and activity of crizotinib for paediatric patients with refractory solid tumours or anaplastic large-cell lymphoma: a Children's Oncology Group phase 1 consortium study. *Lancet Oncol* **14**, 472-480 (2013).

75. Eleveld, T.F., *et al.* Relapsed neuroblastomas show frequent RAS-MAPK pathway mutations. *Nat Genet* **47**, 864-871 (2015).
76. Amiel, J., *et al.* Polyalanine expansion and frameshift mutations of the paired-like homeobox gene PHOX2B in congenital central hypoventilation syndrome. *Nat Genet* **33**, 459-461 (2003).
77. Weese-Mayer, D.E., *et al.* Idiopathic congenital central hypoventilation syndrome: analysis of genes pertinent to early autonomic nervous system embryologic development and identification of mutations in PHOX2b. *Am J Med Genet A* **123A**, 267-278 (2003).
78. Raabe, E.H., *et al.* Prevalence and functional consequence of PHOX2B mutations in neuroblastoma. *Oncogene* **27**, 469-476 (2008).
79. Bachetti, T., *et al.* PHOX2B-mediated regulation of ALK expression: in vitro identification of a functional relationship between two genes involved in neuroblastoma. *PLoS One* **5**(2010).
80. Nagashimada, M., *et al.* Autonomic neurocristopathy-associated mutations in PHOX2B dysregulate Sox10 expression. *J Clin Invest* **122**, 3145-3158 (2012).
81. Pugh, T.J., *et al.* The genetic landscape of high-risk neuroblastoma. *Nat Genet* **45**, 279-284 (2013).
82. Cheung, N.K., *et al.* Association of age at diagnosis and genetic mutations in patients with neuroblastoma. *JAMA* **307**, 1062-1071 (2012).
83. Bumber, Y. & Issa, J.P. Epigenetics in cancer: what's the future? *Oncology (Williston Park)* **25**, 220-226, 228 (2011).
84. Sausen, M., *et al.* Integrated genomic analyses identify ARID1A and ARID1B alterations in the childhood cancer neuroblastoma. *Nat Genet* **45**, 12-17 (2013).
85. Decock, A., *et al.* Methyl-CpG-binding domain sequencing reveals a prognostic methylation signature in neuroblastoma. *Oncotarget* **7**, 1960-1972 (2016).
86. Alaminos, M., Davalos, V., Cheung, N.K., Gerald, W.L. & Esteller, M. Clustering of gene hypermethylation associated with clinical risk groups in neuroblastoma. *J Natl Cancer Inst* **96**, 1208-1219 (2004).
87. Asada, K., Abe, M. & Ushijima, T. Clinical application of the CpG island methylator phenotype to prognostic diagnosis in neuroblastomas. *J Hum Genet* **58**, 428-433 (2013).
88. Astuti, D., *et al.* RASSF1A promoter region CpG island hypermethylation in pheochromocytomas and neuroblastoma tumours. *Oncogene* **20**, 7573-7577 (2001).
89. Teitz, T., *et al.* Caspase 8 is deleted or silenced preferentially in childhood neuroblastomas with amplification of MYCN. *Nat Med* **6**, 529-535 (2000).
90. Gonzalez-Gomez, P., *et al.* Aberrant methylation of multiple genes in neuroblastic tumours. relationship with MYCN amplification and allelic status at 1p. *Eur J Cancer* **39**, 1478-1485 (2003).
91. Koyama, H., *et al.* Mechanisms of CHD5 Inactivation in neuroblastomas. *Clin Cancer Res* **18**, 1588-1597 (2012).
92. Witt, O., Deubzer, H.E., Lodrini, M., Milde, T. & Oehme, I. Targeting histone deacetylases in neuroblastoma. *Curr Pharm Des* **15**, 436-447 (2009).
93. Oehme, I., *et al.* Histone deacetylase 8 in neuroblastoma tumorigenesis. *Clin Cancer Res* **15**, 91-99 (2009).
94. Delcuve, G.P., Khan, D.H. & Davie, J.R. Targeting class I histone deacetylases in cancer therapy. *Expert Opin Ther Targets* **17**, 29-41 (2013).

95. Panicker, J., *et al.* Romidepsin (FK228/depsipeptide) controls growth and induces apoptosis in neuroblastoma tumor cells. *Cell Cycle* **9**, 1830-1838 (2010).
96. Schulte, J.H., *et al.* Lysine-specific demethylase 1 is strongly expressed in poorly differentiated neuroblastoma: implications for therapy. *Cancer Res* **69**, 2065-2071 (2009).
97. Fujita, T., *et al.* CHD5, a tumor suppressor gene deleted from 1p36.31 in neuroblastomas. *J Natl Cancer Inst* **100**, 940-949 (2008).
98. Wang, C., *et al.* EZH2 Mediates epigenetic silencing of neuroblastoma suppressor genes CASZ1, CLU, RUNX3, and NGFR. *Cancer Res* **72**, 315-324 (2012).
99. Swift, C.C., Eklund, M.J., Kraveka, J.M. & Alazraki, A.L. Updates in Diagnosis, Management, and Treatment of Neuroblastoma. *Radiographics* **38**, 566-580 (2018).
100. Ozkaynak, M.F., *et al.* A Comprehensive Safety Trial of Chimeric Antibody 14.18 With GM-CSF, IL-2, and Isotretinoin in High-Risk Neuroblastoma Patients Following Myeloablative Therapy: Children's Oncology Group Study ANBL0931. *Front Immunol* **9**, 1355 (2018).
101. Park, J.R., *et al.* Children's Oncology Group's 2013 blueprint for research: neuroblastoma. *Pediatr Blood Cancer* **60**, 985-993 (2013).
102. Pinto, N.R., *et al.* Advances in Risk Classification and Treatment Strategies for Neuroblastoma. *J Clin Oncol* **33**, 3008-3017 (2015).
103. Yu, A.L., *et al.* Anti-GD2 antibody with GM-CSF, interleukin-2, and isotretinoin for neuroblastoma. *N Engl J Med* **363**, 1324-1334 (2010).
104. Applebaum, M.A., *et al.* Neuroblastoma survivors are at increased risk for second malignancies: A report from the International Neuroblastoma Risk Group Project. *Eur J Cancer* **72**, 177-185 (2017).
105. Kushner, B.H., *et al.* Ifosfamide, carboplatin, and etoposide for neuroblastoma: a high-dose salvage regimen and review of the literature. *Cancer* **119**, 665-671 (2013).
106. Matthay, K.K., *et al.* Treatment of high-risk neuroblastoma with intensive chemotherapy, radiotherapy, autologous bone marrow transplantation, and 13-cis-retinoic acid. Children's Cancer Group. *N Engl J Med* **341**, 1165-1173 (1999).
107. Park, J.R., *et al.* Pilot induction regimen incorporating pharmacokinetically guided topotecan for treatment of newly diagnosed high-risk neuroblastoma: a Children's Oncology Group study. *J Clin Oncol* **29**, 4351-4357 (2011).
108. Yanik, G.A., *et al.* Validation of Postinduction Curie Scores in High-Risk Neuroblastoma: A Children's Oncology Group and SIOPEN Group Report on SIOPEN/HR-NBL1. *J Nucl Med* **59**, 502-508 (2018).
109. Cecchetto, G., *et al.* Surgical risk factors in primary surgery for localized neuroblastoma: the LNESG1 study of the European International Society of Pediatric Oncology Neuroblastoma Group. *J Clin Oncol* **23**, 8483-8489 (2005).
110. Strother, D.R., *et al.* Outcome after surgery alone or with restricted use of chemotherapy for patients with low-risk neuroblastoma: results of Children's Oncology Group study P9641. *J Clin Oncol* **30**, 1842-1848 (2012).
111. Yeung, F., Chung, P.H., Tam, P.K. & Wong, K.K. Is complete resection of high-risk stage IV neuroblastoma associated with better survival? *J Pediatr Surg* **50**, 2107-2111 (2015).

112. Simon, T., Haberle, B., Hero, B., von Schweinitz, D. & Berthold, F. Role of surgery in the treatment of patients with stage 4 neuroblastoma age 18 months or older at diagnosis. *J Clin Oncol* **31**, 752-758 (2013).
113. Berthold, F., *et al.* Myeloablative megatherapy with autologous stem-cell rescue versus oral maintenance chemotherapy as consolidation treatment in patients with high-risk neuroblastoma: a randomised controlled trial. *Lancet Oncol* **6**, 649-658 (2005).
114. Pritchard, J., *et al.* High dose melphalan in the treatment of advanced neuroblastoma: results of a randomised trial (ENSG-1) by the European Neuroblastoma Study Group. *Pediatr Blood Cancer* **44**, 348-357 (2005).
115. Kreissman, S.G., *et al.* Purged versus non-purged peripheral blood stem-cell transplantation for high-risk neuroblastoma (COG A3973): a randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol* **14**, 999-1008 (2013).
116. Saarinen-Pihkala, U.M., *et al.* Thiotepa and melphalan based single, tandem, and triple high dose therapy and autologous stem cell transplantation for high risk neuroblastoma. *Pediatr Blood Cancer* **59**, 1190-1197 (2012).
117. Ladenstein, R., *et al.* Busulfan and melphalan versus carboplatin, etoposide, and melphalan as high-dose chemotherapy for high-risk neuroblastoma (HR-NBL1/SIOPEN): an international, randomised, multi-arm, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol* **18**, 500-514 (2017).
118. Seif, A.E., *et al.* A pilot study of tandem high-dose chemotherapy with stem cell rescue as consolidation for high-risk neuroblastoma: Children's Oncology Group study ANBL00P1. *Bone Marrow Transplant* **48**, 947-952 (2013).
119. George, R.E., *et al.* High-risk neuroblastoma treated with tandem autologous peripheral-blood stem cell-supported transplantation: long-term survival update. *J Clin Oncol* **24**, 2891-2896 (2006).
120. Reynolds, C.P., *et al.* Response of neuroblastoma to retinoic acid in vitro and in vivo. *Prog Clin Biol Res* **366**, 203-211 (1991).
121. Sidell, N. Retinoic acid-induced growth inhibition and morphologic differentiation of human neuroblastoma cells in vitro. *J Natl Cancer Inst* **68**, 589-596 (1982).
122. Matthay, K.K., *et al.* Long-term results for children with high-risk neuroblastoma treated on a randomized trial of myeloablative therapy followed by 13-cis-retinoic acid: a children's oncology group study. *J Clin Oncol* **27**, 1007-1013 (2009).
123. Scott, A.M., Wolchok, J.D. & Old, L.J. Antibody therapy of cancer. *Nat Rev Cancer* **12**, 278-287 (2012).
124. Weiner, G.J. Monoclonal antibody mechanisms of action in cancer. *Immunol Res* **39**, 271-278 (2007).
125. Zafir-Lavie, I., Michaeli, Y. & Reiter, Y. Novel antibodies as anticancer agents. *Oncogene* **26**, 3714-3733 (2007).
126. Hakomori, S. Glycosylation defining cancer malignancy: new wine in an old bottle. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 10231-10233 (2002).
127. Cheresh, D.A., Pierschbacher, M.D., Herzig, M.A. & Mujoo, K. Disialogangliosides GD2 and GD3 are involved in the attachment of human melanoma and neuroblastoma cells to extracellular matrix proteins. *J Cell Biol* **102**, 688-696 (1986).
128. Furukawa, K., Soejima, H., Niikawa, N. & Shiku, H. Genomic organization and chromosomal assignment of the human beta1, 4-N-acetylgalactosaminyltransferase

- gene. Identification of multiple transcription units. *J Biol Chem* **271**, 20836-20844 (1996).
129. Wu, Z.L., Schwartz, E., Seeger, R. & Ladisch, S. Expression of GD2 ganglioside by untreated primary human neuroblastomas. *Cancer Res* **46**, 440-443 (1986).
  130. Cheung, N.K., *et al.* Monoclonal antibodies to a glycolipid antigen on human neuroblastoma cells. *Cancer Res* **45**, 2642-2649 (1985).
  131. Grant, S.C., *et al.* Targeting of small-cell lung cancer using the anti-GD2 ganglioside monoclonal antibody 3F8: a pilot trial. *Eur J Nucl Med* **23**, 145-149 (1996).
  132. Liang, Y.J., *et al.* Differential expression profiles of glycosphingolipids in human breast cancer stem cells vs. cancer non-stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**, 4968-4973 (2013).
  133. Yanagisawa, M., Yoshimura, S. & Yu, R.K. Expression of GD2 and GD3 gangliosides in human embryonic neural stem cells. *ASN Neuro* **3**(2011).
  134. Jin, H.J., *et al.* GD2 expression is closely associated with neuronal differentiation of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells. *Cell Mol Life Sci* **67**, 1845-1858 (2010).
  135. Hakomori, S. Tumor-associated carbohydrate antigens defining tumor malignancy: basis for development of anti-cancer vaccines. *Adv Exp Med Biol* **491**, 369-402 (2001).
  136. Modak, S., Kramer, K., Gultekin, S.H., Guo, H.F. & Cheung, N.K. Monoclonal antibody 8H9 targets a novel cell surface antigen expressed by a wide spectrum of human solid tumors. *Cancer Res* **61**, 4048-4054 (2001).
  137. Lipinski, M., *et al.* Characterization of neural cell adhesion molecules (NCAM) expressed by Ewing and neuroblastoma cell lines. *Int J Cancer* **40**, 81-86 (1987).
  138. Kushner, B.H., Kramer, K. & Cheung, N.K. Phase II trial of the anti-G(D2) monoclonal antibody 3F8 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor for neuroblastoma. *J Clin Oncol* **19**, 4189-4194 (2001).
  139. Handgretinger, R., *et al.* A phase I study of neuroblastoma with the anti-ganglioside GD2 antibody 14.G2a. *Cancer Immunol Immunother* **35**, 199-204 (1992).
  140. Yu, A.L., *et al.* Phase I trial of a human-mouse chimeric anti-disialoganglioside monoclonal antibody ch14.18 in patients with refractory neuroblastoma and osteosarcoma. *J Clin Oncol* **16**, 2169-2180 (1998).
  141. Gillies, S.D., Lo, K.M. & Wesolowski, J. High-level expression of chimeric antibodies using adapted cDNA variable region cassettes. *J Immunol Methods* **125**, 191-202 (1989).
  142. Hank, J.A., *et al.* Treatment of neuroblastoma patients with antiganglioside GD2 antibody plus interleukin-2 induces antibody-dependent cellular cytotoxicity against neuroblastoma detected in vitro. *J Immunother Emphasis Tumor Immunol* **15**, 29-37 (1994).
  143. Albertini, M.R., *et al.* Phase IB trial of chimeric antidisialoganglioside antibody plus interleukin 2 for melanoma patients. *Clin Cancer Res* **3**, 1277-1288 (1997).
  144. Murray, J.L., *et al.* Phase I trial of murine monoclonal antibody 14G2a administered by prolonged intravenous infusion in patients with neuroectodermal tumors. *J Clin Oncol* **12**, 184-193 (1994).
  145. Uttenreuther-Fischer, M.M., Huang, C.S. & Yu, A.L. Pharmacokinetics of human-mouse chimeric anti-GD2 mAb ch14.18 in a phase I trial in neuroblastoma patients. *Cancer Immunol Immunother* **41**, 331-338 (1995).



146. Simon, T., *et al.* Consolidation treatment with chimeric anti-GD2-antibody ch14.18 in children older than 1 year with metastatic neuroblastoma. *J Clin Oncol* **22**, 3549-3557 (2004).
147. Sait, S. & Modak, S. Anti-GD2 immunotherapy for neuroblastoma. *Expert Rev Anticancer Ther* **17**, 889-904 (2017).
148. Ozkaynak, M.F., *et al.* Phase I study of chimeric human/murine anti-ganglioside G(D2) monoclonal antibody (ch14.18) with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in children with neuroblastoma immediately after hematopoietic stem-cell transplantation: a Children's Cancer Group Study. *J Clin Oncol* **18**, 4077-4085 (2000).
149. Gilman, A.L., *et al.* Phase I study of ch14.18 with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukin-2 in children with neuroblastoma after autologous bone marrow transplantation or stem-cell rescue: a report from the Children's Oncology Group. *J Clin Oncol* **27**, 85-91 (2009).
150. Barker, E. & Reisfeld, R.A. A mechanism for neutrophil-mediated lysis of human neuroblastoma cells. *Cancer Res* **53**, 362-367 (1993).
151. Honsik, C.J., Jung, G. & Reisfeld, R.A. Lymphokine-activated killer cells targeted by monoclonal antibodies to the disialogangliosides GD2 and GD3 specifically lyse human tumor cells of neuroectodermal origin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**, 7893-7897 (1986).
152. Mujoo, K., *et al.* Functional properties and effect on growth suppression of human neuroblastoma tumors by isotype switch variants of monoclonal antiganglioside GD2 antibody 14.18. *Cancer Res* **49**, 2857-2861 (1989).
153. Munn, D.H. & Cheung, N.K. Phagocytosis of tumor cells by human monocytes cultured in recombinant macrophage colony-stimulating factor. *J Exp Med* **172**, 231-237 (1990).
154. Dallegrì, F., Ballestrero, A., Ottonello, L. & Patrone, F. Defective antibody-dependent tumour cell lysis by neutrophils from cancer patients. *Clin Exp Immunol* **77**, 58-61 (1989).
155. Fehniger, T.A., Cooper, M.A. & Caligiuri, M.A. Interleukin-2 and interleukin-15: immunotherapy for cancer. *Cytokine Growth Factor Rev* **13**, 169-183 (2002).
156. Zeng, Y., *et al.* Fractalkine (CX3CL1)- and interleukin-2-enriched neuroblastoma microenvironment induces eradication of metastases mediated by T cells and natural killer cells. *Cancer Res* **67**, 2331-2338 (2007).
157. McDowell, K.A., *et al.* NK cell-based immunotherapies in Pediatric Oncology. *J Pediatr Hematol Oncol* **37**, 79-93 (2015).
158. Dilloo, D., *et al.* Induction of two distinct natural killer-cell populations, activated T cells and antineoplastic cytokines, by interleukin-2 therapy in children with solid tumors. *Exp Hematol* **22**, 1081-1088 (1994).
159. Gaffen, S.L. & Liu, K.D. Overview of interleukin-2 function, production and clinical applications. *Cytokine* **28**, 109-123 (2004).
160. Houot, R., Schultz, L.M., Marabelle, A. & Kohrt, H. T-cell-based Immunotherapy: Adoptive Cell Transfer and Checkpoint Inhibition. *Cancer Immunol Res* **3**, 1115-1122 (2015).
161. Iannello, A., Thompson, T.W., Ardolino, M., Marcus, A. & Raulet, D.H. Immunosurveillance and immunotherapy of tumors by innate immune cells. *Curr Opin Immunol* **38**, 52-58 (2016).
162. Sadelain, M., Brentjens, R. & Riviere, I. The basic principles of chimeric antigen receptor design. *Cancer Discov* **3**, 388-398 (2013).

163. Louis, C.U., *et al.* Antitumor activity and long-term fate of chimeric antigen receptor-positive T cells in patients with neuroblastoma. *Blood* **118**, 6050-6056 (2011).
164. Pule, M.A., *et al.* A chimeric T cell antigen receptor that augments cytokine release and supports clonal expansion of primary human T cells. *Mol Ther* **12**, 933-941 (2005).
165. Hombach, A.A. & Abken, H. Costimulation by chimeric antigen receptors revisited the T cell antitumor response benefits from combined CD28-OX40 signalling. *Int J Cancer* **129**, 2935-2944 (2011).
166. Richards, R.M., Sotillo, E. & Majzner, R.G. CAR T Cell Therapy for Neuroblastoma. *Front Immunol* **9**, 2380 (2018).
167. Di Giannatale, A., *et al.* Phase II study of temozolomide in combination with topotecan (TOTEM) in relapsed or refractory neuroblastoma: a European Innovative Therapies for Children with Cancer-SIOP-European Neuroblastoma study. *Eur J Cancer* **50**, 170-177 (2014).
168. Bagatell, R., *et al.* Phase II study of irinotecan and temozolomide in children with relapsed or refractory neuroblastoma: a Children's Oncology Group study. *J Clin Oncol* **29**, 208-213 (2011).
169. Kushner, B.H., Kramer, K., Modak, S. & Cheung, N.K. Irinotecan plus temozolomide for relapsed or refractory neuroblastoma. *J Clin Oncol* **24**, 5271-5276 (2006).
170. Haas-Kogan, D.A., *et al.* Impact of radiotherapy for high-risk neuroblastoma: a Children's Cancer Group study. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **56**, 28-39 (2003).
171. Gaze, M.N., *et al.* Results of a quality assurance review of external beam radiation therapy in the International Society of Paediatric Oncology (Europe) Neuroblastoma Group's High-risk Neuroblastoma Trial: a SIOPEN study. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **85**, 170-174 (2013).
172. Gatcombe, H.G., Marcus, R.B., Jr., Katzenstein, H.M., Tighiouart, M. & Esiashvili, N. Excellent local control from radiation therapy for high-risk neuroblastoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **74**, 1549-1554 (2009).
173. Paulino, A.C., Mayr, N.A., Simon, J.H. & Buatti, J.M. Locoregional control in infants with neuroblastoma: role of radiation therapy and late toxicity. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **52**, 1025-1031 (2002).
174. Schuck, A., *et al.* Ovarian function following pelvic irradiation in prepubertal and pubertal girls and young adult women. *Strahlenther Onkol* **181**, 534-539 (2005).
175. Stone, A., *et al.* Long-term Pulmonary Outcomes in Pediatric Survivors of High-risk Neuroblastoma. *J Pediatr Hematol Oncol* **39**, 547-554 (2017).
176. Hill-Kayser, C., *et al.* Proton versus photon radiation therapy for patients with high-risk neuroblastoma: the need for a customized approach. *Pediatr Blood Cancer* **60**, 1606-1611 (2013).
177. Hattangadi, J.A., *et al.* Proton radiotherapy for high-risk pediatric neuroblastoma: early outcomes and dose comparison. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **83**, 1015-1022 (2012).
178. Wieland, D.M., *et al.* Radiolabeled adrenergi neuron-blocking agents: adrenomedullary imaging with [<sup>131</sup>I]iodobenzylguanidine. *J Nucl Med* **21**, 349-353 (1980).
179. McEwan, A.J., Shapiro, B., Sisson, J.C., Beierwaltes, W.H. & Ackery, D.M. Radioiodobenzylguanidine for the scintigraphic location and therapy of adrenergic tumors. *Semin Nucl Med* **15**, 132-153 (1985).

180. Hoefnagel, C.A., Den Hartog Jager, F.C., Van Gennip, A.H., Marcuse, H.R. & Taal, B.G. Diagnosis and treatment of a carcinoid tumor using iodine-131 meta-iodobenzylguanidine. *Clin Nucl Med* **11**, 150-152 (1986).
181. Matthay, K.K., *et al.* Phase II study on the effect of disease sites, age, and prior therapy on response to iodine-131-metaiodobenzylguanidine therapy in refractory neuroblastoma. *J Clin Oncol* **25**, 1054-1060 (2007).
182. Matthay, K.K., *et al.* Phase I dose escalation of iodine-131-metaiodobenzylguanidine with myeloablative chemotherapy and autologous stem-cell transplantation in refractory neuroblastoma: a new approaches to Neuroblastoma Therapy Consortium Study. *J Clin Oncol* **24**, 500-506 (2006).
183. London, W.B., *et al.* Historical time to disease progression and progression-free survival in patients with recurrent/refractory neuroblastoma treated in the modern era on Children's Oncology Group early-phase trials. *Cancer* **123**, 4914-4923 (2017).
184. Tong, Q.S., *et al.* Expression and clinical significance of stem cell marker CD133 in human neuroblastoma. *World J Pediatr* **4**, 58-62 (2008).
185. Kramer, K., *et al.* Disialoganglioside GD2 loss following monoclonal antibody therapy is rare in neuroblastoma. *Med Pediatr Oncol* **36**, 194-196 (2001).
186. Schumacher-Kuckelkorn, R., Hero, B., Ernestus, K. & Berthold, F. Lacking immunocytological GD2 expression in neuroblastoma: report of 3 cases. *Pediatr Blood Cancer* **45**, 195-201 (2005).
187. Schumacher-Kuckelkorn, R., *et al.* Lack of immunocytological GD2 expression on neuroblastoma cells in bone marrow at diagnosis, during treatment, and at recurrence. *Pediatr Blood Cancer* **64**, 46-56 (2017).
188. Terzic, T., *et al.* Expression of Disialoganglioside (GD2) in Neuroblastic Tumors: A Prognostic Value for Patients Treated With Anti-GD2 Immunotherapy. *Pediatr Dev Pathol* **21**, 355-362 (2018).
189. Schulte, M., Koster, J., Rahmann, S. & Schramm, A. Cancer evolution, mutations, and clonal selection in relapse neuroblastoma. *Cell Tissue Res* **372**, 263-268 (2018).
190. Ross, R.A. & Spengler, B.A. Human neuroblastoma stem cells. *Semin Cancer Biol* **17**, 241-247 (2007).
191. Mangani, D., Weller, M. & Roth, P. The network of immunosuppressive pathways in glioblastoma. *Biochem Pharmacol* **130**, 1-9 (2017).
192. Carlson, L.M., *et al.* Low-dose aspirin delays an inflammatory tumor progression in vivo in a transgenic mouse model of neuroblastoma. *Carcinogenesis* **34**, 1081-1088 (2013).
193. Mina, M., *et al.* Tumor-infiltrating T lymphocytes improve clinical outcome of therapy-resistant neuroblastoma. *Oncoimmunology* **4**, e1019981 (2015).
194. Vanichapol, T., Chutipongtanate, S., Anurathapan, U. & Hongeng, S. Immune Escape Mechanisms and Future Prospects for Immunotherapy in Neuroblastoma. *Biomed Res Int* **2018**, 1812535 (2018).
195. Asgharzadeh, S., *et al.* Clinical significance of tumor-associated inflammatory cells in metastatic neuroblastoma. *J Clin Oncol* **30**, 3525-3532 (2012).
196. Huber, V., *et al.* Cancer acidity: An ultimate frontier of tumor immune escape and a novel target of immunomodulation. *Semin Cancer Biol* **43**, 74-89 (2017).
197. Dondero, A., *et al.* PD-L1 expression in metastatic neuroblastoma as an additional mechanism for limiting immune surveillance. *Oncoimmunology* **5**, e1064578 (2016).

198. Prigione, I., *et al.* Immunogenicity of human neuroblastoma. *Ann N Y Acad Sci* **1028**, 69-80 (2004).
199. Corrias, M.V., *et al.* Lack of HLA-class I antigens in human neuroblastoma cells: analysis of its relationship to TAP and tapasin expression. *Tissue Antigens* **57**, 110-117 (2001).
200. Bhat, P., *et al.* Modulating autophagy in cancer therapy: Advancements and challenges for cancer cell death sensitization. *Biochem Pharmacol* **147**, 170-182 (2018).
201. Castriconi, R., *et al.* Human NK cell infusions prolong survival of metastatic human neuroblastoma-bearing NOD/scid mice. *Cancer Immunol Immunother* **56**, 1733-1742 (2007).
202. Castriconi, R., *et al.* Natural killer cell-mediated killing of freshly isolated neuroblastoma cells: critical role of DNAX accessory molecule-1-poliovirus receptor interaction. *Cancer Res* **64**, 9180-9184 (2004).
203. Tarek, N., *et al.* Unlicensed NK cells target neuroblastoma following anti-GD2 antibody treatment. *J Clin Invest* **122**, 3260-3270 (2012).
204. Lang, P., *et al.* Haploidentical stem cell transplantation in patients with pediatric solid tumors: preliminary results of a pilot study and analysis of graft versus tumor effects. *Klin Padiatr* **218**, 321-326 (2006).
205. Cordeau, M., *et al.* Efficient Killing of High Risk Neuroblastoma Using Natural Killer Cells Activated by Plasmacytoid Dendritic Cells. *PLoS One* **11**, e0164401 (2016).
206. Mizushima, N. & Klionsky, D.J. Protein turnover via autophagy: implications for metabolism. *Annu Rev Nutr* **27**, 19-40 (2007).
207. Ghosh, A., *et al.* Activation of peroxisome proliferator-activated receptor alpha induces lysosomal biogenesis in brain cells: implications for lysosomal storage disorders. *J Biol Chem* **290**, 10309-10324 (2015).
208. Yuan, J. & Kroemer, G. Alternative cell death mechanisms in development and beyond. *Genes Dev* **24**, 2592-2602 (2010).
209. Denton, D., Nicolson, S. & Kumar, S. Cell death by autophagy: facts and apparent artefacts. *Cell Death Differ* **19**, 87-95 (2012).
210. Gozuacik, D. & Kimchi, A. Autophagy as a cell death and tumor suppressor mechanism. *Oncogene* **23**, 2891-2906 (2004).
211. Frake, R.A., Ricketts, T., Menzies, F.M. & Rubinsztein, D.C. Autophagy and neurodegeneration. *J Clin Invest* **125**, 65-74 (2015).
212. Rubinsztein, D.C., Marino, G. & Kroemer, G. Autophagy and aging. *Cell* **146**, 682-695 (2011).
213. Netea-Maier, R.T., Plantinga, T.S., van de Veerdonk, F.L., Smit, J.W. & Netea, M.G. Modulation of inflammation by autophagy: Consequences for human disease. *Autophagy* **12**, 245-260 (2016).
214. Gomes, L.C. & Dikic, I. Autophagy in antimicrobial immunity. *Mol Cell* **54**, 224-233 (2014).
215. Nowikovsky, K., Devenish, R.J., Froschauer, E. & Schweyen, R.J. Determination of yeast mitochondrial KHE activity, osmotic swelling and mitophagy. *Methods Enzymol* **457**, 305-317 (2009).
216. Walter, K.M., *et al.* Hif-2alpha promotes degradation of mammalian peroxisomes by selective autophagy. *Cell Metab* **20**, 882-897 (2014).

217. Wang, X., Li, S., Liu, Y. & Ma, C. Redox regulated peroxisome homeostasis. *Redox Biol* **4**, 104-108 (2015).
218. Mizushima, N. & Komatsu, M. Autophagy: renovation of cells and tissues. *Cell* **147**, 728-741 (2011).
219. Li, W.W., Li, J. & Bao, J.K. Microautophagy: lesser-known self-eating. *Cell Mol Life Sci* **69**, 1125-1136 (2012).
220. Cuervo, A.M. & Wong, E. Chaperone-mediated autophagy: roles in disease and aging. *Cell Res* **24**, 92-104 (2014).
221. Mizumura, K., Choi, A.M. & Ryter, S.W. Emerging role of selective autophagy in human diseases. *Front Pharmacol* **5**, 244 (2014).
222. van der Vaart, A., Mari, M. & Reggiori, F. A picky eater: exploring the mechanisms of selective autophagy in human pathologies. *Traffic* **9**, 281-289 (2008).
223. Steele, S., Brunton, J. & Kawula, T. The role of autophagy in intracellular pathogen nutrient acquisition. *Front Cell Infect Microbiol* **5**, 51 (2015).
224. Kaur, J. & Debnath, J. Autophagy at the crossroads of catabolism and anabolism. *Nat Rev Mol Cell Biol* **16**, 461-472 (2015).
225. Lamb, C.A., Yoshimori, T. & Tooze, S.A. The autophagosome: origins unknown, biogenesis complex. *Nat Rev Mol Cell Biol* **14**, 759-774 (2013).
226. Nakatogawa, H., Suzuki, K., Kamada, Y. & Ohsumi, Y. Dynamics and diversity in autophagy mechanisms: lessons from yeast. *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**, 458-467 (2009).
227. He, C. & Klionsky, D.J. Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy. *Annu Rev Genet* **43**, 67-93 (2009).
228. Yorimitsu, T. & Klionsky, D.J. Autophagy: molecular machinery for self-eating. *Cell Death Differ* **12 Suppl 2**, 1542-1552 (2005).
229. Glick, D., Barth, S. & Macleod, K.F. Autophagy: cellular and molecular mechanisms. *J Pathol* **221**, 3-12 (2010).
230. Panda, P.K., *et al.* Mechanism of autophagic regulation in carcinogenesis and cancer therapeutics. *Semin Cell Dev Biol* **39**, 43-55 (2015).
231. Klionsky, D.J. & Emr, S.D. Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation. *Science* **290**, 1717-1721 (2000).
232. Deter, R.L. & De Duve, C. Influence of glucagon, an inducer of cellular autophagy, on some physical properties of rat liver lysosomes. *J Cell Biol* **33**, 437-449 (1967).
233. Mortimore, G.E. & Schworer, C.M. Induction of autophagy by amino-acid deprivation in perfused rat liver. *Nature* **270**, 174-176 (1977).
234. Jung, C.H., Ro, S.H., Cao, J., Otto, N.M. & Kim, D.H. mTOR regulation of autophagy. *FEBS Lett* **584**, 1287-1295 (2010).
235. Kim, Y.C. & Guan, K.L. mTOR: a pharmacologic target for autophagy regulation. *J Clin Invest* **125**, 25-32 (2015).
236. Martina, J.A., Chen, Y., Gucek, M. & Puertollano, R. MTORC1 functions as a transcriptional regulator of autophagy by preventing nuclear transport of TFEB. *Autophagy* **8**, 903-914 (2012).
237. Sridharan, S., Jain, K. & Basu, A. Regulation of autophagy by kinases. *Cancers (Basel)* **3**, 2630-2654 (2011).
238. Gwinn, D.M., *et al.* AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint. *Mol Cell* **30**, 214-226 (2008).

239. Schumker, E., Kloog, Y. & Pinkas-Kramarski, R. Ras and autophagy in cancer development and therapy. *Oncotarget* **5**, 577-586 (2014).
240. Yang, Z. & Klionsky, D.J. Mammalian autophagy: core molecular machinery and signaling regulation. *Curr Opin Cell Biol* **22**, 124-131 (2010).
241. Zhou, Y.Y., Li, Y., Jiang, W.Q. & Zhou, L.F. MAPK/JNK signalling: a potential autophagy regulation pathway. *Biosci Rep* **35**(2015).
242. Pattingre, S., *et al.* Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit Beclin 1-dependent autophagy. *Cell* **122**, 927-939 (2005).
243. White, E. The role for autophagy in cancer. *J Clin Invest* **125**, 42-46 (2015).
244. Aita, V.M., *et al.* Cloning and genomic organization of beclin 1, a candidate tumor suppressor gene on chromosome 17q21. *Genomics* **59**, 59-65 (1999).
245. Qu, X., *et al.* Promotion of tumorigenesis by heterozygous disruption of the beclin 1 autophagy gene. *J Clin Invest* **112**, 1809-1820 (2003).
246. Yue, Z., Jin, S., Yang, C., Levine, A.J. & Heintz, N. Beclin 1, an autophagy gene essential for early embryonic development, is a haploinsufficient tumor suppressor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 15077-15082 (2003).
247. He, S., *et al.* Truncating mutation in the autophagy gene UVRAG confers oncogenic properties and chemosensitivity in colorectal cancers. *Nat Commun* **6**, 7839 (2015).
248. Takamura, A., *et al.* Autophagy-deficient mice develop multiple liver tumors. *Genes Dev* **25**, 795-800 (2011).
249. Mortensen, M., *et al.* The autophagy protein Atg7 is essential for hematopoietic stem cell maintenance. *J Exp Med* **208**, 455-467 (2011).
250. Avalos, Y., *et al.* Tumor suppression and promotion by autophagy. *Biomed Res Int* **2014**, 603980 (2014).
251. Moloney, J.N. & Cotter, T.G. ROS signalling in the biology of cancer. *Semin Cell Dev Biol* **80**, 50-64 (2018).
252. Villar, V.H., Merhi, F., Djavaheri-Mergny, M. & Duran, R.V. Glutaminolysis and autophagy in cancer. *Autophagy* **11**, 1198-1208 (2015).
253. Pattingre, S., Bauvy, C. & Codogno, P. Amino acids interfere with the ERK1/2-dependent control of macroautophagy by controlling the activation of Raf-1 in human colon cancer HT-29 cells. *J Biol Chem* **278**, 16667-16674 (2003).
254. Liao, J.K., *et al.* Cancer-associated fibroblasts confer cisplatin resistance of tongue cancer via autophagy activation. *Biomed Pharmacother* **97**, 1341-1348 (2018).
255. Fesler, A., *et al.* Autophagy regulated by miRNAs in colorectal cancer progression and resistance. *Cancer Transl Med* **3**, 96-100 (2017).
256. Perera, R.M., *et al.* Transcriptional control of autophagy-lysosome function drives pancreatic cancer metabolism. *Nature* **524**, 361-365 (2015).
257. Yang, A., *et al.* Autophagy is critical for pancreatic tumor growth and progression in tumors with p53 alterations. *Cancer Discov* **4**, 905-913 (2014).
258. Martinez-Outschoorn, U.E., *et al.* Stromal-epithelial metabolic coupling in cancer: integrating autophagy and metabolism in the tumor microenvironment. *Int J Biochem Cell Biol* **43**, 1045-1051 (2011).
259. Wilde, L., *et al.* Metabolic coupling and the Reverse Warburg Effect in cancer: Implications for novel biomarker and anticancer agent development. *Semin Oncol* **44**, 198-203 (2017).

260. Morel, E., *et al.* Autophagy: A Druggable Process. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **57**, 375-398 (2017).
261. Belounis, A., *et al.* Autophagy is associated with chemoresistance in neuroblastoma. *BMC Cancer* **16**, 891 (2016).
262. Yang, Y.P., *et al.* Application and interpretation of current autophagy inhibitors and activators. *Acta Pharmacol Sin* **34**, 625-635 (2013).
263. Yuan, N., *et al.* Bafilomycin A1 targets both autophagy and apoptosis pathways in pediatric B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica* **100**, 345-356 (2015).
264. Lu, Y., *et al.* Vacuolin-1 potently and reversibly inhibits autophagosome-lysosome fusion by activating RAB5A. *Autophagy* **10**, 1895-1905 (2014).
265. Solomon, V.R. & Lee, H. Chloroquine and its analogs: a new promise of an old drug for effective and safe cancer therapies. *Eur J Pharmacol* **625**, 220-233 (2009).
266. Wolfram, J., *et al.* A chloroquine-induced macrophage-preconditioning strategy for improved nanodelivery. *Sci Rep* **7**, 13738 (2017).
267. Gonzalez-Polo, R.A., *et al.* The apoptosis/autophagy paradox: autophagic vacuolization before apoptotic death. *J Cell Sci* **118**, 3091-3102 (2005).
268. Redmann, M., *et al.* Inhibition of autophagy with bafilomycin and chloroquine decreases mitochondrial quality and bioenergetic function in primary neurons. *Redox Biol* **11**, 73-81 (2017).
269. Amaravadi, R.K., *et al.* Principles and current strategies for targeting autophagy for cancer treatment. *Clin Cancer Res* **17**, 654-666 (2011).
270. Amaravadi, R.K., *et al.* Autophagy inhibition enhances therapy-induced apoptosis in a Myc-induced model of lymphoma. *J Clin Invest* **117**, 326-336 (2007).
271. White, E. & DiPaola, R.S. The double-edged sword of autophagy modulation in cancer. *Clin Cancer Res* **15**, 5308-5316 (2009).
272. Torgersen, M.L., Engedal, N., Boe, S.O., Hokland, P. & Simonsen, A. Targeting autophagy potentiates the apoptotic effect of histone deacetylase inhibitors in t(8;21) AML cells. *Blood* **122**, 2467-2476 (2013).
273. Maycotte, P., *et al.* Chloroquine sensitizes breast cancer cells to chemotherapy independent of autophagy. *Autophagy* **8**, 200-212 (2012).
274. Choi, J.H., Yoon, J.S., Won, Y.W., Park, B.B. & Lee, Y.Y. Chloroquine enhances the chemotherapeutic activity of 5-fluorouracil in a colon cancer cell line via cell cycle alteration. *APMIS* **120**, 597-604 (2012).
275. Zanutto-Filho, A., *et al.* Autophagy inhibition improves the efficacy of curcumin/temozolomide combination therapy in glioblastomas. *Cancer Lett* **358**, 220-231 (2015).
276. Mulcahy Levy, J.M., *et al.* Autophagy inhibition overcomes multiple mechanisms of resistance to BRAF inhibition in brain tumors. *Elife* **6**(2017).
277. Ma, X.H., *et al.* Targeting ER stress-induced autophagy overcomes BRAF inhibitor resistance in melanoma. *J Clin Invest* **124**, 1406-1417 (2014).
278. Paglin, S., *et al.* Rapamycin-sensitive pathway regulates mitochondrial membrane potential, autophagy, and survival in irradiated MCF-7 cells. *Cancer Res* **65**, 11061-11070 (2005).
279. Kim, K.W., Moretti, L., Mitchell, L.R., Jung, D.K. & Lu, B. Endoplasmic reticulum stress mediates radiation-induced autophagy by perk-eIF2alpha in caspase-3/7-deficient cells. *Oncogene* **29**, 3241-3251 (2010).

280. Chaachouay, H., *et al.* Autophagy contributes to resistance of tumor cells to ionizing radiation. *Radiother Oncol* **99**, 287-292 (2011).
281. Nagelkerke, A., Bussink, J., van der Kogel, A.J., Sweep, F.C. & Span, P.N. The PERK/ATF4/LAMP3-arm of the unfolded protein response affects radioresistance by interfering with the DNA damage response. *Radiother Oncol* **108**, 415-421 (2013).
282. Tam, S.Y., Wu, V.W. & Law, H.K. Influence of autophagy on the efficacy of radiotherapy. *Radiat Oncol* **12**, 57 (2017).
283. Defachelles, A.S., Cougnenc, O. & Carpentier, P. [Radio iodized metaiodobenzylguanidine (MIBG) in the treatment of neuroblastoma: modalities and indications]. *Bull Cancer* **98**, 559-569 (2011).
284. Kassis, A.I. & Adelstein, S.J. Radiobiologic principles in radionuclide therapy. *J Nucl Med* **46 Suppl 1**, 4S-12S (2005).
285. Kabeya, Y., *et al.* LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *EMBO J* **19**, 5720-5728 (2000).
286. Bjorkoy, G., *et al.* p62/SQSTM1 forms protein aggregates degraded by autophagy and has a protective effect on huntingtin-induced cell death. *J Cell Biol* **171**, 603-614 (2005).
287. Benito-Cuesta, I., Diez, H., Ordonez, L. & Wandosell, F. Assessment of Autophagy in Neurons and Brain Tissue. *Cells* **6**(2017).
288. Sivridis, E., *et al.* LC3A-positive light microscopy detected patterns of autophagy and prognosis in operable breast carcinomas. *Am J Pathol* **176**, 2477-2489 (2010).
289. Koukourakis, M.I., *et al.* Autophagosome Proteins LC3A, LC3B and LC3C Have Distinct Subcellular Distribution Kinetics and Expression in Cancer Cell Lines. *PLoS One* **10**, e0137675 (2015).
290. Giatromanolaki, A., *et al.* Autophagy and lysosomal related protein expression patterns in human glioblastoma. *Cancer Biol Ther* **15**, 1468-1478 (2014).
291. Lin, Y.C., *et al.* Inhibition of High Basal Level of Autophagy Induces Apoptosis in Human Bladder Cancer Cells. *J Urol* **195**, 1126-1135 (2016).
292. Bray, K., *et al.* Autophagy suppresses RIP kinase-dependent necrosis enabling survival to mTOR inhibition. *PLoS One* **7**, e41831 (2012).
293. Wu, J., Zhang, B., Wu, Y.R., Davidson, M.M. & Hei, T.K. Targeted cytoplasmic irradiation and autophagy. *Mutat Res* **806**, 88-97 (2017).
294. Gomez-Sanchez, R., *et al.* Routine Western blot to check autophagic flux: cautions and recommendations. *Anal Biochem* **477**, 13-20 (2015).
295. Gottlieb, R.A., Andres, A.M., Sin, J. & Taylor, D.P. Untangling autophagy measurements: all fluxed up. *Circ Res* **116**, 504-514 (2015).
296. Pugsley, H.R. Assessing Autophagic Flux by Measuring LC3, p62, and LAMP1 Co-localization Using Multispectral Imaging Flow Cytometry. *J Vis Exp* (2017).
297. Rosenfeld, M.R., *et al.* A phase I/II trial of hydroxychloroquine in conjunction with radiation therapy and concurrent and adjuvant temozolomide in patients with newly diagnosed glioblastoma multiforme. *Autophagy* **10**, 1359-1368 (2014).
298. Goldberg, S.B., *et al.* A phase I study of erlotinib and hydroxychloroquine in advanced non-small-cell lung cancer. *J Thorac Oncol* **7**, 1602-1608 (2012).
299. Russell, J., Wheldon, T.E. & Stanton, P. A radioresistant variant derived from a human neuroblastoma cell line is less prone to radiation-induced apoptosis. *Cancer Res* **55**, 4915-4921 (1995).



300. Cooper, M.A., Fehniger, T.A. & Caligiuri, M.A. The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends Immunol* **22**, 633-640 (2001).
301. Lanier, L.L., Le, A.M., Civin, C.I., Loken, M.R. & Phillips, J.H. The relationship of CD16 (Leu-11) and Leu-19 (NKH-1) antigen expression on human peripheral blood NK cells and cytotoxic T lymphocytes. *J Immunol* **136**, 4480-4486 (1986).
302. Freud, A.G., Mundy-Bosse, B.L., Yu, J. & Caligiuri, M.A. The Broad Spectrum of Human Natural Killer Cell Diversity. *Immunity* **47**, 820-833 (2017).
303. Michel, T., *et al.* Human CD56bright NK Cells: An Update. *J Immunol* **196**, 2923-2931 (2016).
304. Karre, K. Natural killer cell recognition of missing self. *Nat Immunol* **9**, 477-480 (2008).
305. Zingoni, A., *et al.* Natural Killer Cell Response to Chemotherapy-Stressed Cancer Cells: Role in Tumor Immunosurveillance. *Front Immunol* **8**, 1194 (2017).
306. Tomasello, E., Blery, M., Vely, F. & Vivier, E. Signaling pathways engaged by NK cell receptors: double concerto for activating receptors, inhibitory receptors and NK cells. *Semin Immunol* **12**, 139-147 (2000).
307. Yawata, M., *et al.* Roles for HLA and KIR polymorphisms in natural killer cell repertoire selection and modulation of effector function. *J Exp Med* **203**, 633-645 (2006).
308. Fernandez, N.C., *et al.* A subset of natural killer cells achieves self-tolerance without expressing inhibitory receptors specific for self-MHC molecules. *Blood* **105**, 4416-4423 (2005).
309. Raulat, D.H. & Vance, R.E. Self-tolerance of natural killer cells. *Nat Rev Immunol* **6**, 520-531 (2006).
310. Raffaghello, L., *et al.* Multiple defects of the antigen-processing machinery components in human neuroblastoma: immunotherapeutic implications. *Oncogene* **24**, 4634-4644 (2005).
311. Locatelli, F., *et al.* Cellular and molecular basis of haploidentical hematopoietic stem cell transplantation in the successful treatment of high-risk leukemias: role of alloreactive NK cells. *Front Immunol* **4**, 15 (2013).
312. Houchins, J.P., Yabe, T., McSherry, C. & Bach, F.H. DNA sequence analysis of NKG2, a family of related cDNA clones encoding type II integral membrane proteins on human natural killer cells. *J Exp Med* **173**, 1017-1020 (1991).
313. Braud, V.M., *et al.* HLA-E binds to natural killer cell receptors CD94/NKG2A, B and C. *Nature* **391**, 795-799 (1998).
314. Pegram, H.J., Andrews, D.M., Smyth, M.J., Darcy, P.K. & Kershaw, M.H. Activating and inhibitory receptors of natural killer cells. *Immunol Cell Biol* **89**, 216-224 (2011).
315. Gilfillan, S., Ho, E.L., Cella, M., Yokoyama, W.M. & Colonna, M. NKG2D recruits two distinct adapters to trigger NK cell activation and costimulation. *Nat Immunol* **3**, 1150-1155 (2002).
316. Cosman, D., *et al.* ULBPs, novel MHC class I-related molecules, bind to CMV glycoprotein UL16 and stimulate NK cytotoxicity through the NKG2D receptor. *Immunity* **14**, 123-133 (2001).
317. Steinle, A., *et al.* Interactions of human NKG2D with its ligands MICA, MICB, and homologs of the mouse RAE-1 protein family. *Immunogenetics* **53**, 279-287 (2001).
318. Fuchs, A., Cella, M., Kondo, T. & Colonna, M. Paradoxical inhibition of human natural interferon-producing cells by the activating receptor NKp44. *Blood* **106**, 2076-2082 (2005).

319. Kruse, P.H., Matta, J., Ugolini, S. & Vivier, E. Natural cytotoxicity receptors and their ligands. *Immunol Cell Biol* **92**, 221-229 (2014).
320. Sivori, S., *et al.* Involvement of natural cytotoxicity receptors in human natural killer cell-mediated lysis of neuroblastoma and glioblastoma cell lines. *J Neuroimmunol* **107**, 220-225 (2000).
321. Shibuya, A., *et al.* DNAM-1, a novel adhesion molecule involved in the cytolytic function of T lymphocytes. *Immunity* **4**, 573-581 (1996).
322. Reymond, N., *et al.* DNAM-1 and PVR regulate monocyte migration through endothelial junctions. *J Exp Med* **199**, 1331-1341 (2004).
323. Long, E.O., Kim, H.S., Liu, D., Peterson, M.E. & Rajagopalan, S. Controlling natural killer cell responses: integration of signals for activation and inhibition. *Annu Rev Immunol* **31**, 227-258 (2013).
324. Fuchs, A., Cella, M., Giurisato, E., Shaw, A.S. & Colonna, M. Cutting edge: CD96 (tactile) promotes NK cell-target cell adhesion by interacting with the poliovirus receptor (CD155). *J Immunol* **172**, 3994-3998 (2004).
325. Wang, W., Erbe, A.K., Hank, J.A., Morris, Z.S. & Sondel, P.M. NK Cell-Mediated Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity in Cancer Immunotherapy. *Front Immunol* **6**, 368 (2015).
326. Warren, H.S. & Kinnear, B.F. Quantitative analysis of the effect of CD16 ligation on human NK cell proliferation. *J Immunol* **162**, 735-742 (1999).
327. Glas, R., *et al.* Recruitment and activation of natural killer (NK) cells in vivo determined by the target cell phenotype. An adaptive component of NK cell-mediated responses. *J Exp Med* **191**, 129-138 (2000).
328. Smyth, M.J., *et al.* Activation of NK cell cytotoxicity. *Mol Immunol* **42**, 501-510 (2005).
329. Chavez-Galan, L., Arenas-Del Angel, M.C., Zenteno, E., Chavez, R. & Lascurain, R. Cell death mechanisms induced by cytotoxic lymphocytes. *Cell Mol Immunol* **6**, 15-25 (2009).
330. Arase, H., Arase, N. & Saito, T. Fas-mediated cytotoxicity by freshly isolated natural killer cells. *J Exp Med* **181**, 1235-1238 (1995).
331. Kayagaki, N., *et al.* Expression and function of TNF-related apoptosis-inducing ligand on murine activated NK cells. *J Immunol* **163**, 1906-1913 (1999).
332. Degli-Esposti, M. To die or not to die--the quest of the TRAIL receptors. *J Leukoc Biol* **65**, 535-542 (1999).
333. Takeda, K., *et al.* Involvement of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in surveillance of tumor metastasis by liver natural killer cells. *Nat Med* **7**, 94-100 (2001).
334. Sprick, M.R., *et al.* FADD/MORT1 and caspase-8 are recruited to TRAIL receptors 1 and 2 and are essential for apoptosis mediated by TRAIL receptor 2. *Immunity* **12**, 599-609 (2000).
335. Li, H., Zhu, H., Xu, C.J. & Yuan, J. Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* **94**, 491-501 (1998).
336. Martin-Fontecha, A., *et al.* Induced recruitment of NK cells to lymph nodes provides IFN-gamma for T(H)1 priming. *Nat Immunol* **5**, 1260-1265 (2004).
337. Biron, C.A., Nguyen, K.B., Pien, G.C., Cousens, L.P. & Salazar-Mather, T.P. Natural killer cells in antiviral defense: function and regulation by innate cytokines. *Annu Rev Immunol* **17**, 189-220 (1999).

338. Jiang, T., Zhou, C. & Ren, S. Role of IL-2 in cancer immunotherapy. *Oncoimmunology* **5**, e1163462 (2016).
339. Rosenberg, S.A., *et al.* Experience with the use of high-dose interleukin-2 in the treatment of 652 cancer patients. *Ann Surg* **210**, 474-484; discussion 484-475 (1989).
340. Ladenstein, R., *et al.* Interleukin 2 with anti-GD2 antibody ch14.18/CHO (dinutuximab beta) in patients with high-risk neuroblastoma (HR-NBL1/SIOPEN): a multicentre, randomised, phase 3 trial. *Lancet Oncol* **19**, 1617-1629 (2018).
341. Pillet, A.H., Theze, J. & Rose, T. Interleukin (IL)-2 and IL-15 have different effects on human natural killer lymphocytes. *Hum Immunol* **72**, 1013-1017 (2011).
342. Porrata, L.F., *et al.* Interleukin-15 affects patient survival through natural killer cell recovery after autologous hematopoietic stem cell transplantation for non-Hodgkin lymphomas. *Clin Dev Immunol* **2010**, 914945 (2010).
343. Conlon, K.C., *et al.* Redistribution, hyperproliferation, activation of natural killer cells and CD8 T cells, and cytokine production during first-in-human clinical trial of recombinant human interleukin-15 in patients with cancer. *J Clin Oncol* **33**, 74-82 (2015).
344. Perez-Martinez, A., *et al.* A phase I/II trial of interleukin-15--stimulated natural killer cell infusion after haplo-identical stem cell transplantation for pediatric refractory solid tumors. *Cytotherapy* **17**, 1594-1603 (2015).
345. Smyth, M.J., Taniguchi, M. & Street, S.E. The anti-tumor activity of IL-12: mechanisms of innate immunity that are model and dose dependent. *J Immunol* **165**, 2665-2670 (2000).
346. Parihar, R., Dierksheide, J., Hu, Y. & Carson, W.E. IL-12 enhances the natural killer cell cytokine response to Ab-coated tumor cells. *J Clin Invest* **110**, 983-992 (2002).
347. Ghayur, T., *et al.* Caspase-1 processes IFN-gamma-inducing factor and regulates LPS-induced IFN-gamma production. *Nature* **386**, 619-623 (1997).
348. Bhatia, S., *et al.* Recombinant interleukin-21 plus sorafenib for metastatic renal cell carcinoma: a phase 1/2 study. *J Immunother Cancer* **2**, 2 (2014).
349. Sato, K., *et al.* Antiviral response by natural killer cells through TRAIL gene induction by IFN-alpha/beta. *Eur J Immunol* **31**, 3138-3146 (2001).
350. Gerosa, F., *et al.* The reciprocal interaction of NK cells with plasmacytoid or myeloid dendritic cells profoundly affects innate resistance functions. *J Immunol* **174**, 727-734 (2005).
351. Benlahrech, A., *et al.* Human NK Cell Up-regulation of CD69, HLA-DR, Interferon gamma Secretion and Cytotoxic Activity by Plasmacytoid Dendritic Cells is Regulated through Overlapping but Different Pathways. *Sensors (Basel)* **9**, 386-403 (2009).
352. Charrier, E., *et al.* Reconstitution of maturing and regulatory lymphocyte subsets after cord blood and BMT in children. *Bone Marrow Transplant* **48**, 376-382 (2013).
353. Talmadge, J.E., *et al.* Rapid immunologic reconstitution following transplantation with mobilized peripheral blood stem cells as compared to bone marrow. *Bone Marrow Transplant* **19**, 161-172 (1997).
354. Venstrom, J.M., *et al.* KIR and HLA genotypes are associated with disease progression and survival following autologous hematopoietic stem cell transplantation for high-risk neuroblastoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **15**, 7330-7334 (2009).

355. Shusterman, S., *et al.* Antitumor activity of hu14.18-IL2 in patients with relapsed/refractory neuroblastoma: a Children's Oncology Group (COG) phase II study. *J Clin Oncol* **28**, 4969-4975 (2010).
356. Liu, Y.J. IPC: professional type 1 interferon-producing cells and plasmacytoid dendritic cell precursors. *Annu Rev Immunol* **23**, 275-306 (2005).
357. Swiecki, M. & Colonna, M. The multifaceted biology of plasmacytoid dendritic cells. *Nat Rev Immunol* **15**, 471-485 (2015).
358. Cella, M., *et al.* Plasmacytoid monocytes migrate to inflamed lymph nodes and produce large amounts of type I interferon. *Nat Med* **5**, 919-923 (1999).
359. Facchetti, F., Vermi, W., Mason, D. & Colonna, M. The plasmacytoid monocyte/interferon producing cells. *Virchows Arch* **443**, 703-717 (2003).
360. Villani, A.C., *et al.* Single-cell RNA-seq reveals new types of human blood dendritic cells, monocytes, and progenitors. *Science* **356**(2017).
361. See, P., *et al.* Mapping the human DC lineage through the integration of high-dimensional techniques. *Science* **356**(2017).
362. Alculumbre, S.G., *et al.* Diversification of human plasmacytoid predendritic cells in response to a single stimulus. *Nat Immunol* **19**, 63-75 (2018).
363. Gilliet, M., Cao, W. & Liu, Y.J. Plasmacytoid dendritic cells: sensing nucleic acids in viral infection and autoimmune diseases. *Nat Rev Immunol* **8**, 594-606 (2008).
364. Finotti, G., Tamassia, N. & Cassatella, M.A. Interferon-lambdas and Plasmacytoid Dendritic Cells: A Close Relationship. *Front Immunol* **8**, 1015 (2017).
365. Diaz-Rodriguez, Y., Cordeiro, P., Belounis, A., Herblot, S. & Duval, M. In vitro differentiated plasmacytoid dendritic cells as a tool to induce anti-leukemia activity of natural killer cells. *Cancer Immunol Immunother* **66**, 1307-1320 (2017).
366. Souza-Fonseca-Guimaraes, F., Young, A. & Smyth, M.J. IFN type III: in vivo NK cell response. *Oncotarget* **6**, 19960-19961 (2015).
367. Lasfar, A., *et al.* Concerted action of IFN-alpha and IFN-lambda induces local NK cell immunity and halts cancer growth. *Oncotarget* **7**, 49259-49267 (2016).
368. Wallet, S.M., Puri, V. & Gibson, F.C. Linkage of Infection to Adverse Systemic Complications: Periodontal Disease, Toll-Like Receptors, and Other Pattern Recognition Systems. *Vaccines (Basel)* **6**(2018).
369. Nie, L., Cai, S.Y., Shao, J.Z. & Chen, J. Toll-Like Receptors, Associated Biological Roles, and Signaling Networks in Non-Mammals. *Front Immunol* **9**, 1523 (2018).
370. Medzhitov, R. Toll-like receptors and innate immunity. *Nat Rev Immunol* **1**, 135-145 (2001).
371. Connolly, D.J. & O'Neill, L.A. New developments in Toll-like receptor targeted therapeutics. *Curr Opin Pharmacol* **12**, 510-518 (2012).
372. Burns, C.A. & Brown, M.D. Imiquimod for the treatment of skin cancer. *Dermatol Clin* **23**, 151-164, vii (2005).
373. Krieg, A.M. Development of TLR9 agonists for cancer therapy. *J Clin Invest* **117**, 1184-1194 (2007).
374. Fang, Y., *et al.* Molecular characterization of in vivo adjuvant activity in ferrets vaccinated against influenza virus. *J Virol* **84**, 8369-8388 (2010).
375. Tulic, M.K., *et al.* Amb a 1-immunostimulatory oligodeoxynucleotide conjugate immunotherapy decreases the nasal inflammatory response. *J Allergy Clin Immunol* **113**, 235-241 (2004).

376. Smith, M., *et al.* Trial Watch: Toll-like receptor agonists in cancer immunotherapy. *Oncoimmunology* **7**, e1526250 (2018).
377. Swann, J.B., *et al.* Type I IFN contributes to NK cell homeostasis, activation, and antitumor function. *J Immunol* **178**, 7540-7549 (2007).
378. Viola, A. & Luster, A.D. Chemokines and their receptors: drug targets in immunity and inflammation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **48**, 171-197 (2008).
379. Hanabuchi, S., *et al.* Human plasmacytoid dendritic cells activate NK cells through glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor-ligand (GITRL). *Blood* **107**, 3617-3623 (2006).
380. Mailliard, R.B., *et al.* Dendritic cells mediate NK cell help for Th1 and CTL responses: two-signal requirement for the induction of NK cell helper function. *J Immunol* **171**, 2366-2373 (2003).
381. Palucka, K. & Banchereau, J. Cancer immunotherapy via dendritic cells. *Nat Rev Cancer* **12**, 265-277 (2012).
382. Garg, A.D., *et al.* Trial watch: Dendritic cell-based anticancer immunotherapy. *Oncoimmunology* **6**, e1328341 (2017).
383. Morse, M.A., *et al.* A phase I study of dexosome immunotherapy in patients with advanced non-small cell lung cancer. *J Transl Med* **3**, 9 (2005).
384. Bottino, C., *et al.* Natural killer cells and neuroblastoma: tumor recognition, escape mechanisms, and possible novel immunotherapeutic approaches. *Front Immunol* **5**, 56 (2014).
385. Shenoy, S., *et al.* Immune reconstitution following allogeneic peripheral blood stem cell transplants. *Bone Marrow Transplant* **23**, 335-346 (1999).
386. Nassin, M.L., *et al.* Immune Reconstitution Following Autologous Stem Cell Transplantation in Patients with High-Risk Neuroblastoma at the Time of Immunotherapy. *Biol Blood Marrow Transplant* **24**, 452-459 (2018).
387. Dulphy, N., *et al.* An unusual CD56(bright) CD16(low) NK cell subset dominates the early posttransplant period following HLA-matched hematopoietic stem cell transplantation. *J Immunol* **181**, 2227-2237 (2008).
388. Jacobs, R., *et al.* CD16- CD56+ natural killer cells after bone marrow transplantation. *Blood* **79**, 3239-3244 (1992).
389. Bari, R., *et al.* 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 (2019).
390. Castriconi, R., *et al.* Neuroblastoma-derived TGF-beta1 modulates the chemokine receptor repertoire of human resting NK cells. *J Immunol* **190**, 5321-5328 (2013).
391. Wagner, J.A., *et al.* CD56bright NK cells exhibit potent antitumor responses following IL-15 priming. *J Clin Invest* **127**, 4042-4058 (2017).
392. Bayer, A.L., *et al.* Expansion of a restricted residual host T reg-cell repertoire is dependent on IL-2 following experimental autologous hematopoietic stem transplantation. *Eur J Immunol* **41**, 3467-3478 (2011).
393. Qin, M., Li, Y., Yang, X. & Wu, H. Safety of Toll-like receptor 9 agonists: a systematic review and meta-analysis. *Immunopharmacol Immunotoxicol* **36**, 251-260 (2014).
394. Shimasaki, N., Jain, A. & Campana, D. NK cells for cancer immunotherapy. *Nat Rev Drug Discov* **19**, 200-218 (2020).

395. Kushner, B.H., *et al.* Humanized 3F8 Anti-GD2 Monoclonal Antibody Dosing With Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor in Patients With Resistant Neuroblastoma: A Phase 1 Clinical Trial. *JAMA Oncol* **4**, 1729-1735 (2018).
396. Barry, W.E., *et al.* Activated Natural Killer Cells in Combination with Anti-GD2 Antibody Dinutuximab Improve Survival of Mice after Surgical Resection of Primary Neuroblastoma. *Clin Cancer Res* **25**, 325-333 (2019).
397. Grzywacz, B., Kataria, N. & Verneris, M.R. CD56(dim)CD16(+) NK cells downregulate CD16 following target cell induced activation of matrix metalloproteinases. *Leukemia* **21**, 356-359; author reply 359 (2007).
398. Lajoie, L., *et al.* ADAM17-mediated shedding of FcγRIIIA on human NK cells: identification of the cleavage site and relationship with activation. *J Immunol* **192**, 741-751 (2014).
399. Kasakovski, D., Xu, L. & Li, Y. T cell senescence and CAR-T cell exhaustion in hematological malignancies. *J Hematol Oncol* **11**, 91 (2018).
400. Maude, S. & Barrett, D.M. Current status of chimeric antigen receptor therapy for haematological malignancies. *Br J Haematol* **172**, 11-22 (2016).
401. Lin, S.J. & Kuo, M.L. Effect of cyclosporin A on interleukin-15-activated umbilical cord blood natural killer cell function. *Cytotherapy* **10**, 397-405 (2008).
402. Petersson, E., *et al.* Activation of alloreactive natural killer cells is resistant to cyclosporine. *Transplantation* **63**, 1138-1144 (1997).
403. Mehta, B.A., Schmidt-Wolf, I.G., Weissman, I.L. & Negrin, R.S. Two pathways of exocytosis of cytoplasmic granule contents and target cell killing by cytokine-induced CD3+ CD56+ killer cells. *Blood* **86**, 3493-3499 (1995).
404. Castriconi, R., *et al.* Both CD133+ and CD133- medulloblastoma cell lines express ligands for triggering NK receptors and are susceptible to NK-mediated cytotoxicity. *European journal of immunology* **37**, 3190-3196 (2007).
405. Lelaidier, M., *et al.* TRAIL-mediated killing of acute lymphoblastic leukemia by plasmacytoid dendritic cell-activated natural killer cells. *Oncotarget* **6**, 29440-29455 (2015).

## Annexe 1 | Article 3

A Belounis a participé à la réalisation de certaines expérimentations en purifiant des cellules NK, des cellules pDC et en générant des pDC *in vitro* à partir de cellules souches hématopoïétiques. A Belounis a également participé aux discussions scientifiques entourant le projet de recherche.

### **In vitro differentiated plasmacytoid dendritic cells as a tool to induce anti-leukemia activity of natural killer cells**

Yildian Díaz-Rodríguez,<sup>1,2</sup> Paulo Cordeiro,<sup>1</sup> Assila Belounis,<sup>1,2</sup>  
Sabine Herblot<sup>1,2,3</sup> and Michel Duval<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup> *Groupe de Recherche en Transplantation & Immunologie du Sang de Cordon (GRETISC), Centre Cancérologie Charles-Bruneau, Centre de recherche du CHU Sainte-Justine, Montreal, Quebec, Canada.*

<sup>2</sup> *Département de Microbiologie Infectiologie & Immunologie, Université de Montréal, Montreal, Quebec, Canada.*

<sup>3</sup> *Département de Pédiatrie, Université de Montréal, Montreal, Quebec, Canada.*

Corresponding author: Sabine Herblot, PhD

CHU Sainte-Justine

Centre de cancérologie Charles-Bruneau

3175, côte Sainte-Catherine

Montréal (Québec) H3T 1C5, Canada

Email: [sabine.herblot@umontreal.ca](mailto:sabine.herblot@umontreal.ca)

Phone: 514-345-4931 Ext. 3910

**Cet article a été publié dans *Cancer Immunology, Immunotherapy*. 2017. 66, 1307-1320.**

## ***Abstract***

Acute lymphoblastic leukemia (ALL) is believed to be resistant to NK cell-mediated killing. To overcome this resistance, we developed an innovative approach based on NK cell stimulation with Toll-like receptor (TLR)-activated plasmacytoid dendritic cells (pDC). The translation of this approach into the clinic requires the production of high numbers of human pDC. Herein, we show that *in vitro* differentiation of cord blood CD34<sup>+</sup> progenitors in the presence of aryl hydrocarbon-receptor antagonists gives rise to clinically relevant numbers of pDC, as about 10<sup>8</sup> pDC can be produced from a typical cord blood unit. Blocking the aryl hydrocarbon-receptor pathway significantly increased the yield of pDC. When compared to pDC isolated from peripheral blood, *in vitro* differentiated pDC (ivD-pDC) exhibited an increased capacity to induce NK cell-mediated killing of ALL. Although ivD-pDC produced lower amounts of IFN- $\alpha$  than peripheral blood pDC upon TLR activation, they produced more IFN- $\lambda$ 2, known to play a critical role in the induction of anti-tumoral NK cell functions. Both TLR-9 and TLR-7 ligands triggered pDC-induced NK cell activation, offering the possibility to use any clinical grade TLR-7 or TLR-9 ligands in future clinical trials. Finally, adoptive transfer of ivD-pDC cultured in the presence of an AHR antagonist cured humanized mice with minimal ALL disease. Collectively, our results pave the way to clinical-grade production of sufficient numbers of human pDC for innate immunotherapy against ALL and other refractory malignancies.

**Keywords:** Natural killer cells; plasmacytoid dendritic cells; *in vitro* expansion and differentiation of hematopoietic cells; AHR antagonist



**Précis:** This study paves the way toward a novel and innovative immunotherapeutic strategy for stimulating the anti-leukemia functions of donor-derived NK cells following hematopoietic stem cell transplantation.

***Abbreviations:***

AHR: Aryl hydrocarbon receptor

ALL: Acute lymphoblastic leukemia

ATCC: American type culture collection

BSA: Body surface area

CD: Cluster of differentiation

DC: dendritic cells

ELISA: Enzyme-linked immunosorbent assay

FBS: Fetal bovine serum

FITC: fluorescein isothiocyanate

Fluc: Firefly luciferase

GFP: Green fluorescent protein

GM-CSF: Granulocyte macrophage colony stimulating factor

HSCT: Hematopoietic stem cell transplantation

IFN: Interferon

IL: Interleukin

IU: International unit

ivD-: In vitro differentiated-

mDC: Myeloid dendritic cells

mo-DC: Monocyte-derived dendritic cells

NK: Natural killer

NSG: *Nod/Scid/γc<sup>-/-</sup>*

ODN: Oligonucleotide

PB: Peripheral blood

PCR: Polymerase chain reaction

pDC: Plasmacytoid dendritic cells

PE: Phycoerythrin

PI: Propidium iodide

RPMI: Roswell Park Memorial Institute medium

SR1: Stem regenin 1

TLR: Toll-like receptor

TNF: Tumor necrosis factor

TPO: Thrombopoietin

TRAIL: TNF-related apoptosis-inducing ligand

## ***Introduction***

In the last decade, immunotherapy has been considered a major breakthrough in the field of anti-cancer therapy, since this approach demonstrated its efficacy against chemotherapy refractory cancers. Although many efforts focused on antigen-targeted approaches, harnessing innate immunity to fight cancer cells has also been proposed and natural killer (NK) cells are increasingly used to design anti-cancer immunotherapy [1-3].

NK cells recognize and kill infected or transformed cells without prior sensitization [3]. Their cytotoxicity activity against cancer cells is highly regulated by the balance between activating and inhibitory signals as well as their education in order to distinguish self and untransformed cells from cancer and infected cells. Nonetheless, cancer cells can become resistant to NK cell-mediated lysis by down-regulating ligands for NK cell activating receptors. To circumvent this resistance, NK cell stimulation is required to increase the cytotoxic functions of NK cells [4]. Interleukin (IL)-2 and IL-15 are the most frequently used cytokines to increase NK cell lytic functions, but their use in clinics is associated with high toxicity and side effects that can dampen the efficacy of NK cell mediated cytotoxicity against cancer. Indeed, concentrations over 20,000 IU/mL commonly used *in vitro* would be highly toxic in patients [5]. Moreover, lower doses of IL-2 result in Treg expansion that may reduce immune responses including NK cell anti-leukemia functions [6-8], and recent data revealed that IL-15 promotes B-acute lymphocyte leukemia (ALL) cell expansion and their invasion of the central nervous system [9,10]. NK cell functions can also be stimulated by low numbers of activated dendritic cells [11]. In particular, plasmacytoid dendritic cells (pDC) are an attractive tool to stimulate NK cell functions since this specialized dendritic subset produces high amounts of type I Interferon (IFN) in response to stimulation. Moreover, we recently demonstrated that Toll-like receptor (TLR)-activated

pDC induce a unique NK cell phenotype that could not be reproduced by IFN- $\alpha$  alone [12]. This phenotype is characterized by a high expression of TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) on the cell surface.

The outcome for relapsed ALL has not significantly improved over the last 2 decades, despite advances in hematopoietic stem cell transplantation (HSCT). As we and others showed that functional NK cells reappear 1 month after HSCT, these innate immune effectors are an attractive tool to fight residual leukemia early after transplant [13-16]. However, ALL cells are resistant to NK cell-mediated lysis [17,18]. We recently revealed that co-culture of resting NK cells with TLR-9-activated pDC overcame the resistance of ALL to NK-cell killing. Nonetheless, the efficacy of post-transplant administration of a TLR-ligand to activate donor-derived pDC may be impaired by the defective pDC reconstitution after HSCT [19]. Adoptive transfer of pDC is therefore a novel therapeutic option to activate NK cells early after HSCT and to eradicate residual ALL cells. Thus, we used a preclinical model of HSCT to study the adoptive transfers of pDC and demonstrated that this transfer controlled the development of human ALL in humanized mice [12]. These findings open new therapeutic options for patients with refractory ALL.

The principal drawback for adoptive transfers of activated pDC in the clinic is their low frequency in the peripheral blood, precluding their isolation in sufficient numbers for patient therapy. However, pDC could be expanded and differentiated *in vitro* from human hematopoietic precursors in the presence of fms-like tyrosine kinase receptor 3 ligand (FLT3-L) and thrombopoietin (TPO) [20,19]. In addition, recent reports showed that aryl hydrocarbon receptor (AHR) antagonists favored the differentiation toward the dendritic pathway and increased the numbers of pDC generated from CD34<sup>+</sup> human progenitors [21]. Nonetheless, the

capacity of these *in vitro* differentiated pDC (ivD-pDC) to induce NK cell cytotoxicity against ALL remains to be determined. We therefore aimed to produce clinically relevant numbers of ivD-pDC from cord blood CD34<sup>+</sup> cells in presence of FLT3-L, TPO, and AHR antagonists. We also aimed to characterize ivD-pDC and to evaluate their capacity to induce NK cell cytotoxicity against ALL *in vitro* and *in vivo*.

## ***Materials and methods***

### **Cell line**

The pre-B ALL cell line, REH, was obtained from ATCC (Manassas, VA, USA) and maintained in RPMI-1640 medium (Wisent, Saint-Bruno, QC) supplemented with 10% heat-inactivated FBS (Wisent) at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. This cell line was transduced with a GFP-expressing retrovirus to obtain REH-GFP cells easily traceable by flow cytometry.

### ***In vitro* DC differentiation**

Human pDC were expanded and differentiated from purified cord blood-CD34<sup>+</sup> progenitors as previously described [19]. Briefly, cord blood units were obtained from the CHU Sainte-Justine Research Center cord blood bank with the approval from the Institutional Review Board. Mononuclear cells were isolated by gradient centrifugation using Ficoll-Paque Plus (GE Healthcare Bio-Science AB, Uppsala, Sweden) and CD34<sup>+</sup> cells were positively selected using magnetic beads (Miltenyi Biotec, San Diego, CA). Purified cells were seeded at  $0.2 \times 10^6/\text{mL}$  in serum-free expansion medium (StemSpan<sup>TM</sup> SFEM, StemCell Technologies, Vancouver, BC), complemented with recombinant human stem cell factor (10 ng/mL), TPO (50 ng/mL), and FLT3-Ligand (100 ng/mL) (all from R&D System, Minneapolis, MN, USA; or Miltenyi Biotec). When required, AHR antagonists were added: CH223191 (1 μM, Sigma, St-Louis, MO, USA) or SR1 (1 μM, Selleckchem, Houston, TX, USA). Culture medium was refreshed every 2–3 days and after 7 days of culture, culture medium was replaced by StemSpan medium supplemented with human IL-7 (10 ng/mL, Cytheris, Issy-les-Moulineaux, France), TPO, FLT3-L, and CH223191 or SR1. Cultures were maintained for 14 days at 37°C in a humidified incubator with 5% CO<sub>2</sub>. *In vitro* differentiated pDC were then purified by flow cytometry after

staining with mouse anti-human antibodies (HLA-DR-PE/Cy7 and CD123-APC, BD Biosciences, San Jose, CA, USA) and exclusion of dead cells with Sytox Blue dye. *In vitro* differentiated mDC were sorted from the same culture using CD1c-PE and HLA-DR-PE/Cy7 markers. Cell sorting was performed on an Aria cell sorter (BD Biosciences). Sorted DC (pDC: HLA-DR<sup>+</sup>/CD123<sup>high</sup> Sytox<sup>neg</sup>, mDC: HLA-DR<sup>+</sup>/CD1c<sup>+</sup> Sytox<sup>neg</sup>) were then resuspended in RPMI1640 medium (Wisent) supplemented with 10% of heat-inactivated serum and used for NK cell stimulation experiments.

Monocyte-derived DC were generated by culturing CD14<sup>+</sup> peripheral blood monocytes in presence of GM-CSF (50 ng/mL) and IL-4 (10 ng/mL) (both from R&D systems) for 4 days. Lipopolysaccharide (1µg/mL) was then added for 2 additional days.

### **NK cell and DC isolation from adult peripheral blood**

Peripheral blood samples were obtained from healthy volunteers after written informed consent was obtained in accordance with the Declaration of Helsinki and CHU Sainte Justine IRB approval. Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were prepared by density gradient centrifugation using Ficoll-Paque Plus. NK cells, pDC and mDC were purified by negative selection using magnetic beads (EasySep® enrichment kits, StemCell Technologies). The purity of NK cells and DCs was assessed by flow cytometry and was always above 95%.

### **NK cell stimulation**

Purified NK cells were plated in a 96-well round bottom plate ( $2 \times 10^6$  cells/mL) and *in vitro* differentiated- or adult pDC were added in a NK:pDC ratio of 10:1. pDC were stimulated by adding a TLR-9 ligand (CpG-A ODN2216, 10 µg/mL, InvivoGen, San Diego, CA, USA) or a TLR-7 ligand (Imiquimod, 0.8µg/mL, Sigma), and NK/pDC co-cultures were incubated

overnight at 37°C and 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. Similarly, NK cells were co-cultured with mo-DC, peripheral blood or *in vitro* generated mDC. mDC and moDC were stimulated by adding a TLR-3 ligand (poly-IC, 10 µg/mL, Sigma). Unstimulated NK cells or NK cells cultured with unstimulated pDC were used as negative controls. NK cells stimulated with IFN-α (1,000 IU/mL) were used as a positive control for each experiment. Increasing doses of IL-2 (200 to 20,000 IU/mL; Novartis Pharmaceuticals Canada, Dorval, Quebec, Canada) were also used to stimulate NK cells. IFN-α signaling neutralization assays were performed by incubating NK cells and pDC with neutralizing antibodies (anti-IFN-α/β receptor chain2 and anti-IFN-α) (20 µg/mL, MMHAR-2 and MMHA-2, respectively, PBL Assay Science, Piscataway, NJ, USA) for 30 min prior to the addition of TLR ligands or IFN-α. Blocking antibodies were kept in culture medium overnight.

### **Analysis of NK cell activation by flow cytometry**

NK cell activation was analyzed after overnight stimulation with IFN-α or activated pDC. Cells were harvested, washed, and then stained with conjugated antibodies: APC-anti-human CD56, PE/Cy5-anti-human CD3 to define NK cell population (CD56<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup>), FITC-anti-human CD69, and PE-anti-TRAIL. Activated pDC were labeled with anti-human CD123, anti-human HLA-DR, anti-human CD40, and anti-human CD86 (pDC were defined as HLA-DR<sup>+</sup>/CD123<sup>high</sup>). All conjugated antibodies were purchased from BD Biosciences or Biolegend (San Diego, CA, USA). Samples were analyzed in a LSR Fortessa cytometer (BD Biosciences) and data analysis was performed with FlowJo software version 10 (Tree Star, Ashland, OR, USA).

### **NK cell cytotoxic assays**



NK cytotoxic assays were performed using flow cytometry. Briefly,  $10^5$  target cells (REH-GFP) and  $5 \times 10^5$  NK cells were plated in triplicates (effector:target ratio of 5:1) in a 96-well coned plates and incubated for two hours at  $37^\circ\text{C}$ . Cells were then harvested, dead cells were labeled with propidium iodide (PI), and counting beads were added to each sample. Flow cytometry acquisitions were performed on a LSR Fortessa cytometer (BD Biosciences). The absolute number of live target cells ( $\text{GFP}^+\text{PI}^-$ ) was calculated and the percentage of specific lysis was defined as follows:  $\text{Specific lysis (\%)} = [(\text{\#absolute live target cells} - \text{\#experimental live target cells}) / \text{\#absolute live target cells}] \times 100$ .

#### **IFN- $\alpha$ and IFN- $\gamma$ quantification using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)**

After NK cell stimulation with IFN- $\alpha$  or activated pDC, culture supernatants were collected and stored at  $-80^\circ\text{C}$ . IFN- $\alpha$  and IFN- $\gamma$  quantification was performed by ELISA following the manufacturer's protocol (PBL InterferonSource, Piscataway, NJ, USA).

#### **IFN- $\lambda$ quantification using quantitative PCR**

Purified peripheral blood pDC or ivD-pDC were stimulated with ODN CpG 2216 for 24 h. Unstimulated and stimulated cells were harvested and total RNA contents were prepared using Qiagen RNeasy kit according to manufacturers' instructions (Qiagen, Hilden, Germany). Quantitative RT-PCR was performed using QuantiTect Probe PCR Kit (Qiagen, Mississauga, ON, Canada). Specific primers and FAM probes for  $\beta 2$ microglobulin, IL-29, and IL-28A were purchased from ThermoFisher Scientific (Waltham, MA, USA). For IL-28B, we used custom primers and FAM probe (Fw: CAAAGATGCCTTAGAAGAGTCG, Rv: TCCAGAACCTTCAGCGTCAG, FAM probe: GCTGAAGGACTGCAAGTGCCG) [22].

### ***In vivo* control of ALL in humanized mice**

*Nod/Scid/IL-2R $\gamma$ <sup>-/-</sup>* mice were purchased from the Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME) and maintained in pathogen-free conditions. Humanized mice were generated as previously described [12]. Protocols for generating humanized mice were approved by our local Animal Care Committee according to the guidelines of the Canadian Council on Animal Care in Science. To promote human NK cell differentiation, humanized mice received human IL-15/IL-15R $\alpha$ -Fc complex (ALT803, Altor Biosciences, Miramar, FL, USA [23]) once a week for seven weeks starting six weeks after transplantation. To reproduce human ALL in humanized mice,  $5 \times 10^3$  REH cells expressing the Firefly luciferase gene (Fluc) were injected intravenously 8 weeks after transplantation, followed 48 h later by infusions of unstimulated or TLR-9 activated ivD-pDC ( $10^5$  cells per mouse). pDC injections were repeated once a week for five weeks. A group of humanized mice injected with REH cells was treated by daily injections of human IL-2 (20,000 IU) for two weeks. A group of humanized mice injected with REH cells and treated with saline injection was used as control. Leukemia development was monitored by weekly *in vivo* bioluminescence imaging using a custom apparatus from Labeo Technologies Inc (Montreal, QC, Canada). Briefly, mice were anesthetized and imaged 12 min after intraperitoneal injection of 150 mg/kg D-luciferin (Caliper Life Sciences, Waltham, MA). Each mouse was imaged in anterior-posterior prone position using a constant exposure time (500 ms). Mice were euthanized when overt leukemia signs were observed.

### **Statistics**

One-way ANOVA tests were used for multiple group comparisons of paired data and paired t-tests were used for single data comparisons. The log rank test was used to compare survival

curves. A value of  $p < 0.05$  (\*) was considered significant with a confidence interval of 99% (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

## ***Results***

### **AHR antagonists increase *in vitro* differentiation of functional plasmacytoid dendritic cells from CD34<sup>+</sup> progenitors**

We and others showed that the culture of human CD34<sup>+</sup> progenitors, in the presence of Flt3-L and TPO, gave rise to fully differentiated pDC [24,12,20]. Additionally, the presence of AHR antagonists favored dendritic cell differentiation [21,25]. Since the induction of differentiation programs may also interfere with the cellular functions of *in vitro* generated cells, we aimed to assess the functional properties of human ivD-pDC obtained in the absence or in the presence of AHR antagonists (CH223191 and StemRegenin-1 – SR1).

Human CD34<sup>+</sup> progenitors were purified from cord blood samples and cultured for two weeks with or without AHR antagonists [12]. The presence of AHR antagonists increased both percentages and absolute numbers of ivD-pDC, and SR1 was superior to CH223191 to induce pDC differentiation (**Figure 1**). We were able to obtain an average number of  $4 \times 10^6$  ivD-pDC from  $10^5$  CD34<sup>+</sup> cord blood cells.

We next assessed the competence of ivD-pDC to induce NK cell-mediated killing of leukemia. IvD-pDC were sorted by flow cytometry according to HLA-DR and CD123 surface expression. Sorted cells were co-cultured with purified peripheral blood NK cells in the presence of a TLR-9 ligand (A-CpG ODN) at a pDC:NK cell ratio of 1:10. Cytotoxic assays against a pre-B ALL cell line using unstimulated NK cells or pDC-activated NK cells revealed that NK cell cytotoxicity against ALL was not affected by the presence of AHR antagonists in pDC culture. The killing of ALL cells was even significantly higher with ivD-pDC than with pDC isolated from peripheral blood (PB-pDC), reaching an average of 75% ALL cell killing at a NK:ALL ratio of 5:1 (**Figure 2A**).

At concentrations attainable in humans (200 IU/mL), the stimulation of NK cells with IL-2 was not able to induce ALL lysis (**Figure 2B**). High doses of IL-2 (20,000 IU/mL) induced 55% ALL cell killing at a NK:ALL ratio of 5:1, but these concentrations would be highly toxic in patients. We also compared ALL lysis induced by pDC-stimulated NK cells and by mDC-stimulated NK cells. mDC were either purified from peripheral blood (PB-mDC) or *in vitro* generated from cord-blood CD34<sup>+</sup> cells (ivD-mDC) or monocytes (mo-DC) and stimulated with the TLR-3 ligand Poly(I:C). NK cell-mediated cytotoxicity against REH cells was similar for NK cells stimulated with activated PB-mDC and PB-pDC (**Figure 2C**). Nonetheless, *in vitro* generated mDC (either mo-DC or ivD-mDC) were unable to induce NK cell-mediated ALL cell lysis (**Figure 2C**).

Although the induction of NK cell cytotoxicity was stronger with ivD-pDC than with PB-pDC, there were some phenotypic differences between NK cells stimulated by ivD-pDC and by PB-pDC. TLR-9 activated ivD-pDC induced the up-regulation of CD69 and TRAIL on NK cells, although this up-regulation was lower than that observed after NK cell stimulation with TLR-9-activated PB-pDC (**Figure 3A**). The production of IFN- $\gamma$  by NK cells stimulated with ivD-pDC was also 4–5-fold lower than by NK cells stimulated with PB-pDC (**Figure 3B**). TRAIL and CD69 expression and IFN- $\gamma$  production by NK cells were the same for all ivD-pDC, whether they were obtained in the presence of AHR or not. Taken together, these results indicate that ivD-pDC are more potent than PB-pDC to induce NK cell lytic activity against ALL, despite a lower expression of TRAIL and CD69 on NK cells and weaker IFN- $\gamma$  production.

### **IvD-pDC produce less IFN- $\alpha$ , but more IFN- $\lambda$ than PB-pDC**

We next assessed the production of IFN- $\alpha$  in response to TLR-9 stimulation of ivD-pDC. We observed that although ivD-pDC produced appreciable amounts of IFN- $\alpha$  (up to 2000 pg/mL for 40 000 pDC), these amounts were about 10-fold lower than IFN- $\alpha$  produced by PB-pDC (**Figure 4A**). Of note, ivD-pDC obtained in the presence of AHR antagonists produced higher amounts of IFN- $\alpha$  than ivD-pDC obtained in the absence of inhibitors, and SR1 was superior to CH223191. We next explored the expression of *IFN- $\lambda$*  (*IL-28A*, *IL-28B*, and *IL-29*) RNA by activated ivD-pDC because it has been recently reported that these type III IFN, particularly IL-28B/IFN- $\lambda$ 2, play a major role in NK cell anti-tumoral functions [26-28]. TLR-9 stimulation increased the expression of type III *IFN* RNA in both ivD-pDC and PB-PDC. When compared with activated PB-pDC, activated ivD-pDC expressed as much IL-28A and IL-29, but more *IL-28B/IFN- $\lambda$ 2* RNA (**Figure 4B**). These results indicate that the cytotoxic activity of pDC-activated NK cells against ALL cells does not correlate with the amount of IFN- $\alpha$  produced by activated pDC in NK/pDC co-cultures and suggest a role for type III IFN in pDC-induced NK cell activation.

#### **IFN- $\alpha$ signaling is required for NK cell stimulation by ivD-pDC**

Since ivD-pDC produce lower amount of IFN- $\alpha$  than peripheral blood pDC in response to TLR stimulation, we next tested whether type I IFN signaling was required for NK cell response. We used a combination of blocking antibodies against type I IFN receptor and IFN- $\alpha$  to block IFN- $\alpha$  signaling pathway during NK cell stimulation with activated pDC. We verified the efficacy of the blocking antibodies using STAT1 and phosphorylated-STAT1 staining and showed that STAT1 signaling was abrogated by our combination of blocking antibodies (**Figure 4C**). We observed that IFN- $\alpha$  signaling was required for both TRAIL and CD69 upregulation on

activated NK cells (**Figure 4C**) and to induce the cytolytic activity of activated NK cells against ALL (**Figure 4D**). Therefore, IFN- $\alpha$  production by activated pDC is required for NK cell stimulation and the lower amount of IFN- $\alpha$  produced by ivD-pDC is sufficient to obtain maximal NK cell lytic activity.

### **TLR-7 and TLR-9 ligands are equally efficient to stimulate ivD-pDC and to induce NK cell cytotoxicity against ALL**

We then compared pDC stimulation via TLR-7 and TLR-9 pathways for the induction of NK cell activation and NK cell-mediated lysis of ALL cells. Cytotoxic assays against REH cell line did not show any differences in the cytolytic activity of NK cells stimulated with TLR-7- or TLR-9-activated ivD-pDC (**Figure 5A**). TRAIL and CD69 expression was induced on NK cells co-cultured with TLR-7 and TLR-9-activated ivD-pDC (**Figure 5B**). The production of IFN- $\gamma$  by activated NK cells was similar when NK cells were co-cultured with TLR-7 or TLR-9 activated ivD-pDC, although PB-pDC activation through TLR-9 induced more IFN- $\gamma$  production by NK cells than activation through TLR-7 (**Figure 5C**). Finally, the production of IFN- $\alpha$  by TLR-7-activated pDC was lower than by TLR-9-activated pDC (**Figure 5D**). Taken together these results indicate that, despite a lower production of IFN- $\alpha$  by TLR-7-activated ivD-pDC, TLR-7 and TLR-9 ligands induce similar ivD-pDC-mediated NK cell lytic activity against ALL cells.

### **Adoptive transfers of activated ivD-pDC cure minimal ALL disease in humanized mice**

We recently reported adoptive transfers of activated pDC control human ALL in humanized mice [12]. In these experiments, activated pDC were obtained from *in vitro* differentiation of CD34<sup>+</sup> progenitors in the absence of AHR antagonists. We show here that adoptive transfers of

TLR-activated ivD-pDC obtained in the presence of the AHR antagonist SR1 cured ALL bearing mice (**Figure 6**). To reproduce a minimal ALL disease, we injected  $5 \times 10^3$  ALL cells in humanized NSG mice. The time to overt leukemia in untreated mice was longer when compared to our previous published data in which  $10^4$  ALL cells were injected (52-day median survival versus 35 days), but 85% of control mice died from overt leukemia within 40–90 days post-ALL injection. None of the mice treated with weekly injections of TLR-activated ivD-pDC ( $10^5$  cells per week – 5 weeks) developed leukemia as assessed by *in vivo* bioluminescence imaging and necropsy at the time of euthanasia (**Figure 6A-B**). As controls, we treated a group of humanized mice injected with REH cells with daily injections of recombinant human IL-2 (20,000 UI) and another group of mice with unstimulated ivD-pDC. Mice within these two groups develop leukemia with the same kinetics as untreated control mice (**Figure 6**). Therefore, these results demonstrate that adoptive transfer of ivD-pDC obtained in the presence of AHR antagonist is a unique therapeutic tool to cure minimal residual ALL disease *in vivo*.



## ***Discussion***

Our data show that NK cell stimulation with TLR-activated ivD-pDC induces anti-leukemia activity against resistant ALL cells both *in vitro* and *in vivo*. pDC obtained by *in vitro* differentiation of CD34<sup>+</sup> progenitors in the presence of AHR antagonists are even more efficient than PB-pDC to stimulate NK cell lytic activity despite lower production of IFN- $\alpha$  and lower expression of NK cell activation markers. We further show that, in the presence of AHR antagonists, clinically relevant numbers of ivD-pDC are obtained from cord blood CD34<sup>+</sup> progenitor cultures. Both TLR-7 and TLR-9 ligands are equally efficient to stimulate ivD-pDC and induce NK cell anti-leukemia activity. Finally, adoptive transfers of ivD-pDC obtained in the presence of AHR antagonist cured ALL in humanized mice.

We took advantage of the combination of FLT3, TPO, and AHR antagonist to produce clinically relevant numbers of ivD-pDC from cord blood CD34<sup>+</sup> cells. FLT3 plays a non-redundant role in pDC differentiation, as demonstrated by the lack of pDC in *flt3*-knockout mice and the increase in pDC numbers in humans following injections of recombinant FLT3-L [29-33]. Accordingly, *in vitro* culture of cord blood-derived hematopoietic progenitors in the presence of FLT3-L gives rise to differentiated DC populations among which pDC represent 3–5% of total cells [34]. Moreover, the addition of TPO increased the yield of human ivD-pDC [20]. Recent studies revealed that AHR inhibitors induce not only human stem cell expansion, but also favor dendritic differentiation and functions [35,21]. Thus, we associated FLT3-L and AHR to stem cell factors, TPO and IL-7, to produce ivD-pDC. We obtained 40 times more pDC than the initial number of CD34<sup>+</sup> cells. From the average of  $2.5 \times 10^6$  CD34<sup>+</sup> cells contained in a typical cord blood unit, we thus expect to produce  $10^8$  ivD-pDC. This number is sufficient for clinical use in one patient, as we were able to cure ALL in mice with 5 injections of  $10^5$  pDC.

According to the most accurate method of dosage conversion from mice to humans based on body surface area (BSA) [36,37], 5 injections of  $10^5$  pDC correspond to  $7.5 \times 10^7$  pDC/m<sup>2</sup>, while a 30-kg child BSA is 1 m<sup>2</sup> and a medium-size adult BSA is 1.7 m<sup>2</sup>, suggesting that about  $10^8$  ivD-pDC will be sufficient for human therapy.

NK cell stimulation with high doses of IL-2 or PB-mDC induced the NK cell-mediated lysis of ALL, but none of these approaches has the potential for translation into the clinics. Indeed, the concentration of IL-2 able to induce NK cell lytic activity against ALL cells *in vitro* would be highly toxic in humans, and lower concentrations that can be reached in patients did not induced NK cell lysis of ALL [5]. Accordingly, IL-2 administrated to humanized mice at therapeutic doses was unable to control ALL development. Similarly, PB-pDC and PB-mDC are equally efficient to induce NK cell lytic activity, but their low amounts in peripheral blood of healthy volunteers preclude their use to stimulate NK cell anti-leukemia function in patients. IvD-pDC, ivD-mDC and moDC can be obtained in sufficient numbers for clinical use, but among them only ivD-pDC were able to induce NK cell-mediated killing of ALL.

The equal efficiency of TLR-9 and TLR-7 to activate ivD-pDC is an asset for future clinical use. Indeed, production of clinical-grade activated pDC will require the use of a clinical-grade TLR ligand. Both TLR-7 and TLR-9 ligands are currently in clinical development (NCT02188810 [38,39]), but the final availability of these compounds for clinical use will depend on the results of ongoing clinical trials. Equal efficacy of different TLR ligands indicates that the possibility to activate ivD-pDC in future clinical trials will not rely on the availability of a single compound.

Activated ivD-pDC produce less IFN- $\alpha$  than activated PB-pDCs, and even less when they are activated through the TLR-7 pathway. However, this lower production did not impact the

cytolytic activity of NK cells against ALL cells. Indeed, ALL killing was higher when NK cells were activated with ivD-pDCs, reaching an average killing of 75% at a NK:ALL cell ratio of 5:1. This is in line with the results of our previous work on the anti-leukemic potential of PB-pDC [12]. We showed that NK cell activation by pDC was dependent on the IFN- $\alpha$  pathway, but not reproduced by IFN- $\alpha$  alone, suggesting that the paracrine-autocrine activation loop of IFN- $\alpha$  and other cytokines play a role in NK cell activation [40]. Recent results showed the importance of the IFN- $\lambda$  pathway, and particularly of IFN- $\lambda$ 2 (IL28-B), in NK cell function and anti-cancer activity [26-28]. Thus, we explored the expression of type III/IFN- $\lambda$  (*IL-28A*, *IL-28B*, and *IL-29*) RNA following TLR activation of pDC. IL28-A and IL-29 expression was not significantly different between PB-pDC and ivD-pDC, but IL28-B/IFN- $\lambda$ 2 expression by ivD-pDC was higher. As we showed that NK cell activation by pDC was independent of cell-contact [12], type III IFN and particularly IL28-B/IFN- $\lambda$ 2 are good candidates to be some of the soluble mediators of NK cell activation. Experiments are underway to further delineate their role as well as the role of other cytokines.

Collectively, our results pave the way to clinical grade production of sufficient numbers of human pDC for therapeutic use. Our serum-free culture conditions will be easily compatible with GMP standards and most of the clinical-grade TLR-7 or TLR-9 ligands are expected to be as efficient to induce ivD-pDC activation. This novel immunotherapeutic approach based on early post-transplant NK cell stimulation by adoptive transfers of ivD-pDC eradicates the residual leukemic cells and prevents the relapse of leukemia in a preclinical model. It may even be used in other types of cancer, as we have recently showed its efficacy against neuroblastoma, a leading cause of death from cancer in children.

## *Acknowledgements*

This work was supported by the Canadian Institutes of Research in Health (grant#130246) and the Fondation Centre de Cancérologie Charles-Bruneau. Yildian Diaz-Rodriguez was supported by the Fond de recherche du Québec en Santé and the Fondation CHU Sainte-Justine - Fondation des Étoiles. The authors thank Dr. Hing C. Wong (Altor Biosciences) for providing IL-15/IL-15Rc-Fc complexes. We would like to thank Editage ([www.editage.com](http://www.editage.com)) for English language editing.

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

## ***References***

1. Rezvani K, Rouce RH (2015) The Application of Natural Killer Cell Immunotherapy for the Treatment of Cancer. *Front Immunol* 6:578. doi:10.3389/fimmu.2015.00578
2. Miller JS (2013) Therapeutic applications: natural killer cells in the clinic. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2013:247-253. doi:10.1182/asheducation-2013.1.247
3. Vivier E, Ugolini S (2011) Natural killer cells: from basic research to treatments. *Front Immunol* 2:18. doi:10.3389/fimmu.2011.00018
4. Zwirner NW, Domaica CI (2010) Cytokine regulation of natural killer cell effector functions. *Biofactors* 36 (4):274-288. doi:10.1002/biof.107
5. Dutcher JP, Schwartzentruber D, Kauffman H, Argarwala S, Tarhini A, Lowder J, Atkins MB (2014) High dose interleukin-2 (Aldesleukin) - expert consensus on best management practices-2014. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer* 2 (26). doi:10.1186/s40425-014-0026-0
6. Bluestone JA (2011) The yin and yang of interleukin-2-mediated immunotherapy. *N Engl J Med* 365 (22):2129-2131. doi:10.1056/NEJMe1110900
7. Malek TR, Castro I (2010) Interleukin-2 receptor signaling: at the interface between tolerance and immunity. *Immunity* 33 (2):153-165. doi:10.1016/j.immuni.2010.08.004
8. Koreth J, Matsuoka K, Kim HT, McDonough SM, Bindra B, Alyea EP, 3rd, Armand P, Cutler C, Ho VT, Treister NS, Bienfang DC, Prasad S, Tzachanis D, Joyce RM, Avigan DE, Antin JH, Ritz J, Soiffer RJ (2011) Interleukin-2 and regulatory T cells in graft-versus-host disease. *N Engl J Med* 365 (22):2055-2066. doi:10.1056/NEJMoa1108188
9. Williams MT, Yousafzai Y, Cox C, Blair A, Carmody R, Sai S, Chapman KE, McAndrew R, Thomas A, Spence A, Gibson B, Graham GJ, Halsey C (2014) Interleukin-15 enhances cellular proliferation and upregulates CNS homing molecules in pre-B acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 123 (20):3116-3127. doi:10.1182/blood-2013-05-499970
10. Cario G, Izraeli S, Teichert A, Rhein P, Skokowa J, Moricke A, Zimmermann M, Schrauder A, Karawajew L, Ludwig WD, Welte K, Schunemann HJ, Schlegelberger B, Schrappe M, Stanulla M (2007) High interleukin-15 expression characterizes childhood acute lymphoblastic leukemia with involvement of the CNS. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 25 (30):4813-4820. doi:10.1200/JCO.2007.11.8166
11. Gerosa F, Gobbi A, Zorzi P, Burg S, Briere F, Carra G, Trinchieri G (2005) The reciprocal interaction of NK cells with plasmacytoid or myeloid dendritic cells profoundly affects innate resistance functions. *J Immunol* 174 (2):727-734. doi:174/2/727
12. Lelaidier M, Diaz-Rodriguez Y, Cordeau M, Cordeiro P, Haddad E, Herblot S, Duval M (2015) TRAIL-mediated killing of acute lymphoblastic leukemia by plasmacytoid dendritic

cell-activated natural killer cells. *Oncotarget* 6 (30):29440-29455. doi:10.18632/oncotarget.4984

13. Charrier E, Cordeiro P, Brito RM, Mezziani S, Herblot S, Le Deist F, Duval M (2013) Reconstitution of maturing and regulatory lymphocyte subsets after cord blood and BMT in children. *Bone marrow transplantation* 48 (3):376-382. doi:10.1038/bmt.2012.176

14. Beziat V, Nguyen S, Lapusan S, Hervier B, Dhedin N, Bories D, Uzunov M, Boudifa A, Trebeden-Negre H, Norol F, Marjanovic Z, Marie JP, Vernant JP, Debre P, Rio B, Vieillard V (2009) Fully functional NK cells after unrelated cord blood transplantation. *Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, UK* 23 (4):721-728. doi:10.1038/leu.2008.343

15. Foley B, Cooley S, Verneris MR, Curtsinger J, Luo X, Waller EK, Weisdorf DJ, Miller JS (2011) NK cell education after allogeneic transplantation: dissociation between recovery of cytokine-producing and cytotoxic functions. *Blood* 118 (10):2784-2792. doi:10.1182/blood-2011-04-347070

16. Szabolcs P, Niedzwiecki D (2008) Immune reconstitution in children after unrelated cord blood transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 14 (1 Suppl 1):66-72. doi:10.1016/j.bbmt.2007.10.016

17. Romanski A, Bug G, Becker S, Kampfmann M, Seifried E, Hoelzer D, Ottmann OG, Tonn T (2005) Mechanisms of resistance to natural killer cell-mediated cytotoxicity in acute lymphoblastic leukemia. *Exp Hematol* 33 (3):344-352. doi:10.1016/j.exphem.2004.11.006

18. Torelli GF, Peragine N, Raponi S, Pagliara D, De Propriis MS, Vitale A, Bertaina A, Barberi W, Moretta L, Basso G, Santoni A, Guarini A, Locatelli F, Foa R (2014) Recognition of adult and pediatric acute lymphoblastic leukemia blasts by natural killer cells. *Haematologica* 99 (7):1248-1254. doi:10.3324/haematol.2013.101931

19. Charrier E, Cordeiro P, Brito RM, Harnois M, Mezziani S, Herblot S, Le Deist F, Duval M (2014) Impaired interferon-alpha production by plasmacytoid dendritic cells after cord blood transplantation in children: implication for post-transplantation toll-like receptor ligand-based immunotherapy. *Biol Blood Marrow Transplant* 20 (10):1501-1507. doi:10.1016/j.bbmt.2014.06.007

20. Chen W, Antonenko S, Sederstrom JM, Liang X, Chan AS, Kanzler H, Blom B, Blazar BR, Liu YJ (2004) Thrombopoietin cooperates with FLT3-ligand in the generation of plasmacytoid dendritic cell precursors from human hematopoietic progenitors. *Blood* 103 (7):2547-2553. doi:10.1182/blood-2003-09-3058

21. Thordardottir S, Hangalapura BN, Hutten T, Cossu M, Spanholtz J, Schaap N, Radstake TR, van der Voort R, Dolstra H (2014) The aryl hydrocarbon receptor antagonist StemRegenin 1 promotes human plasmacytoid and myeloid dendritic cell development from CD34+ hematopoietic progenitor cells. *Stem Cells Dev* 23 (9):955-967. doi:10.1089/scd.2013.0521

22. Egli A, Santer DM, O'Shea D, Barakat K, Syedbasha M, Vollmer M, Baluch A, Bhat R, Groenendyk J, Joyce MA, Lisboa LF, Thomas BS, Battegay M, Khanna N, Mueller T, Tyrrell DL, Houghton M, Humar A, Kumar D (2014) IL-28B is a key regulator of B- and T-cell vaccine responses against influenza. *PLoS pathogens* 10 (12):e1004556. doi:10.1371/journal.ppat.1004556
23. Xu W, Jones M, Liu B, Zhu X, Johnson CB, Edwards AC, Kong L, Jeng EK, Han K, Marcus WD, Rubinstein MP, Rhode PR, Wong HC (2013) Efficacy and mechanism-of-action of a novel superagonist interleukin-15: interleukin-15 receptor alphaSu/Fc fusion complex in syngeneic murine models of multiple myeloma. *Cancer research* 73 (10):3075-3086. doi:10.1158/0008-5472.CAN-12-2357
24. Charrier E, Cordeiro P, Cordeau M, Dardari R, Michaud A, Harnois M, Merindol N, Herblot S, Duval M (2012) Post-transcriptional down-regulation of Toll-like receptor signaling pathway in umbilical cord blood plasmacytoid dendritic cells. *Cell Immunol* 276 (1-2):114-121. doi:10.1016/j.cellimm.2012.04.010
25. Liu H, Ramachandran I, Gabrilovich DI (2014) Regulation of plasmacytoid dendritic cell development in mice by aryl hydrocarbon receptor. *Immunol Cell Biol* 92 (2):200-203. doi:10.1038/icb.2013.65
26. Lasfar A, de la Torre A, Abushahba W, Cohen-Solal KA, Castaneda I, Yuan Y, Reuhl K, Zloza A, Raveche E, Laskin DL, Kotenko SV (2016) Concerted action of IFN-alpha and IFN-lambda induces local NK cell immunity and halts cancer growth. *Oncotarget*. doi:10.18632/oncotarget.10272
27. Souza-Fonseca-Guimaraes F, Young A, Mittal D, Martinet L, Bruedigam C, Takeda K, Andoniou CE, Degli-Esposti MA, Hill GR, Smyth MJ (2015) NK cells require IL-28R for optimal in vivo activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112 (18):E2376-2384. doi:10.1073/pnas.1424241112
28. Souza-Fonseca-Guimaraes F, Young A, Smyth MJ (2015) IFN type III: in vivo NK cell response. *Oncotarget* 6 (24):19960-19961. doi:10.18632/oncotarget.4758
29. Onai N, Kurabayashi K, Hosoi-Amaiike M, Toyama-Sorimachi N, Matsushima K, Inaba K, Ohteki T (2013) A clonogenic progenitor with prominent plasmacytoid dendritic cell developmental potential. *Immunity* 38 (5):943-957. doi:10.1016/j.immuni.2013.04.006
30. McKenna HJ, Stocking KL, Miller RE, Brasel K, De Smedt T, Maraskovsky E, Maliszewski CR, Lynch DH, Smith J, Pulendran B, Roux ER, Teepe M, Lyman SD, Peschon JJ (2000) Mice lacking flt3 ligand have deficient hematopoiesis affecting hematopoietic progenitor cells, dendritic cells, and natural killer cells. *Blood* 95 (11):3489-3497
31. Waskow C, Liu K, Darrasse-Jeze G, Guermonprez P, Ginhoux F, Merad M, Shengelia T, Yao K, Nussenzweig M (2008) The receptor tyrosine kinase Flt3 is required for dendritic cell development in peripheral lymphoid tissues. *Nat Immunol* 9 (6):676-683. doi:10.1038/ni.1615

32. Maraskovsky E, Daro E, Roux E, Teepe M, Maliszewski CR, Hoek J, Caron D, Lebsack ME, McKenna HJ (2000) In vivo generation of human dendritic cell subsets by Flt3 ligand. *Blood* 96 (3):878-884
33. Pulendran B, Banchereau J, Burkeholder S, Kraus E, Guinet E, Chalouni C, Caron D, Maliszewski C, Davoust J, Fay J, Palucka K (2000) Flt3-ligand and granulocyte colony-stimulating factor mobilize distinct human dendritic cell subsets in vivo. *J Immunol* 165 (1):566-572
34. Blom B, Ho S, Antonenko S, Liu YJ (2000) Generation of interferon alpha-producing predendritic cell (Pre-DC)2 from human CD34(+) hematopoietic stem cells. *J Exp Med* 192 (12):1785-1796
35. Boitano AE, Wang J, Romeo R, Bouchez LC, Parker AE, Sutton SE, Walker JR, Flaveny CA, Perdew GH, Denison MS, Schultz PG, Cooke MP (2010) Aryl hydrocarbon receptor antagonists promote the expansion of human hematopoietic stem cells. *Science* 329 (5997):1345-1348. doi:10.1126/science.1191536
36. Reagan-Shaw S, Nihal M, Ahmad N (2008) Dose translation from animal to human studies revisited. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 22 (3):659-661. doi:10.1096/fj.07-9574LSF
37. Administration USDoHaHSFaD (2005) Guidance for Industry Estimating the Maximum Safe Starting Dose in Initial Clinical Trials for Therapeutics in Adult Healthy Volunteers.
38. Belani CP, Nemunaitis JJ, Chachoua A, Eisenberg PD, Raez LE, Cuevas JD, Mather CB, Benner RJ, Meech SJ (2013) Phase 2 trial of erlotinib with or without PF-3512676 (CPG 7909, a Toll-like receptor 9 agonist) in patients with advanced recurrent EGFR-positive non-small cell lung cancer. *Cancer biology & therapy* 14 (7):557-563. doi:10.4161/cbt.24598
39. Witzig TE, Wiseman GA, Maurer MJ, Habermann TM, Micallef IN, Nowakowski GS, Ansell SM, Colgan JP, Inwards DJ, Porrata LF, Link BK, Zent CS, Johnston PB, Shanafelt TD, Allmer C, Asmann YW, Gupta M, Ballas ZK, Smith BJ, Weiner GJ (2013) A phase I trial of immunostimulatory CpG 7909 oligodeoxynucleotide and 90 yttrium ibritumomab tiuxetan radioimmunotherapy for relapsed B-cell non-Hodgkin lymphoma. *American journal of hematology* 88 (7):589-593. doi:10.1002/ajh.23460
40. Kerkmann M, Rothenfusser S, Hornung V, Towarowski A, Wagner M, Sarris A, Giese T, Endres S, Hartmann G (2003) Activation with CpG-A and CpG-B oligonucleotides reveals two distinct regulatory pathways of type I IFN synthesis in human plasmacytoid dendritic cells. *J Immunol* 170 (9):4465-4474



## ***Figure Legends***

**Figure 1: AHR antagonists increase the yield of in vitro differentiated pDC.** Cord blood CD34<sup>+</sup> progenitors were cultured for two weeks in the absence (CTL - control) or in the presence of AHR antagonists (CH223191 or StemRegenin-1, SR1). Absolute numbers of differentiated pDCs were determined using immunostaining and flow cytometry analysis. A – Differentiated pDC were identified as HLA-DR<sup>+</sup>CD123<sup>hi</sup> by flow cytometry. Representative contour plots are presented with percentage of pDCs for each culture condition. B – Absolute numbers of pDCs obtained from 10<sup>5</sup> CD34<sup>+</sup> cells are presented with median (n = 7 independent experiments). Statistical analyses were performed using one-way analysis of variance. \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001.

**Figure 2: TLR-9-activated ivD-pDC induce NK cell cytolytic activity against ALL that cannot be reproduced by IL-2 or ivD-mDC stimulation of NK cells.** Peripheral blood NK cells were stimulated by 18-h co-culture with ivD-pDC or PB-pDC in the presence of TLR-9 ligand (CpG ODN 2216, 10 µg/mL) or unstimulated (unst.). A – Cytotoxic assays were performed against REH pre-B ALL cell line at a E:T ratio of 5:1 using flow cytometry count of viable cells. Averages of specific lysis are presented with standard deviation (SD) (n = 5 independent experiments). B – Peripheral blood NK cells were unstimulated (unst.) or stimulated by 18-h co-culture with PB-pDC in the presence of CpG ODN 2216 (10 µg/mL) or increasing amount of IL-2. Cytotoxic assays were performed against REH pre-B ALL cell line at a E:T ratio of 5:1. Averages of specific lysis are presented with standard deviation (SD) (n = 3 independent experiments). C – Peripheral blood NK cells were unstimulated (unst) or stimulated by 18-h co-culture with PB-mDC or PB-pDC or in vitro differentiated mDC, mo-DC or pDC. The TLR-9 ligand CpG ODN 2216 (10 µg/mL) was added in the culture containing

pDC and the TLR-3 ligand Poly(I:C) (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) was added in the culture containing mDC. Cytotoxic assays were performed against REH cells at a E:T ratio of 5:1. Averages of specific lysis are presented with standard deviation (SD) (n = 2-3 independent experiments). Statistical analyses were performed using one-way analysis of variance. \*p < 0.05, \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001.

**Figure 3: Phenotypic changes of pDC-stimulated NK cells.** A – Phenotypic analysis of activated NK cells was performed by immunostaining (TRAIL and CD69) and flow cytometry analysis (gated on CD56<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup> cells). Representative histograms are presented with mean of fluorescence (MFI) for TRAIL (left panel) and CD69 (right panel). Bar graphs represent the average MFI for TRAIL and CD69 with SD (n = 3–7 experiments). B – IFN- $\gamma$  production by unstimulated NK cells (CTL – control) or pDC-stimulated NK cells was measured by ELISA in culture supernatants. Averages of 6 independent experiments are presented with SD. Statistical analyses were performed using one-way analysis of variance. \*p < 0.05, \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001.

**Figure 4: IFN- $\alpha$  signaling is required for NK cell stimulation by ivD-pDC although ivD-pDC produce less IFN- $\alpha$  as compared with PB-pDC.** A – The production of IFN- $\alpha$  was assessed by ELISA in culture supernatants following stimulation of purified pDC with a TLR-9 ligand (CpG ODN 2216, 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). B – The production of type III IFN (IL-28A, IL-28B, and IL-29) was assessed by Q-PCR before and after TLR-stimulation of purified pDC. C – Type I IFN signaling blockade was performed using a combination of anti-IFN- $\alpha$  and anti-IFN receptor antibodies in NK/pDC co-cultures. Intracellular staining of STAT1 and phosphorylated-STAT1 confirms the blockade of type I IFN signaling in both ivD-pDC and PB-pDC. This blockade abolishes the up-regulation of TRAIL and CD69 on NK cells. D – Cytotoxic

assays were performed against REH cell line at a ratio E:T 5:1 using unstimulated NK cells, NK cells stimulated with activated ivD-pDC (cultured in the presence of SR1) or PB-pDC, in the presence or the absence of type I IFN blocking antibodies. The mean of specific lysis is presented with SD (n = 3 independent experiments). Statistical analyses were performed using one-way analysis of variance. \*p < 0.05, \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001.

**Figure 5: TLR-7 and TLR-9 ligands are equally efficient to stimulate ivD-pDC and to induce NK cell lysis of ALL.** We compared the efficacy of TLR-9 (CpG ODN 2216) and TLR-7 (Imiquimod) ligands for the induction of NK cell lytic functions. A – Cytotoxic assays against REH cells were performed as above with NK cells either unstimulated (unst.) or co-cultured with ivD-pDC or PB-pDC stimulated with TLR-9 or TLR-7 ligand. Mean of specific lysis with SD are presented (n = 3 independent experiments). B – NK cell activation status was assessed by immunostaining and flow cytometry analysis (TRAIL and CD69 markers). C – IFN- $\gamma$  production by NK cells was assessed by ELISA in the supernatants of NK/pDC co-cultures in which pDC were stimulated with TLR-9 or TLR-7 ligand. The means of 3 independent experiments are presented with SD. D – IFN- $\alpha$  production by activated pDC was assessed by ELISA in the culture supernatant of pDC stimulated with TLR-9 or TLR-7 ligand. The mean of 3 independent experiments are presented with SD.

Statistical analyses were performed using one-way analysis of variance. \*p < 0.05, \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001.

**Figure 6: Activated ivD-pDC infusions cure human ALL in humanized mice.** Irradiated newborn NSG mice were transplanted with  $10^4$  human cord blood-derived CD34<sup>+</sup> cells.  $10^5$  REH ALL cells were intravenously injected in humanized mice 8 weeks after transplantation.

Forty-eight hours after leukemia injection, mice were injected with activated pDC (a-pDC; n=12) or unstimulated pDC (unst-pDC, n=5) (once a week, for 5 weeks), 20,000 IU of IL-2 (daily injections; n=7) or saline solution for control mice (control; n=18). A – *In vivo* bioluminescence imaging of ALL-bearing mice was performed weekly. Images of representative mice are shown; units in rainbow color scales are proportional to the numbers of photons per second. B – Survival curves of ALL-bearing humanized mice treated with unstimulated or TLR9-activated ivD-pDC, IL-2 or saline solution injections. Mice were euthanized after overt leukemia onset. Flow cytometry analysis of bone marrow samples confirmed complete leukemia involvement. Log-rank test was used to compare survival.

Figures

Figure 1

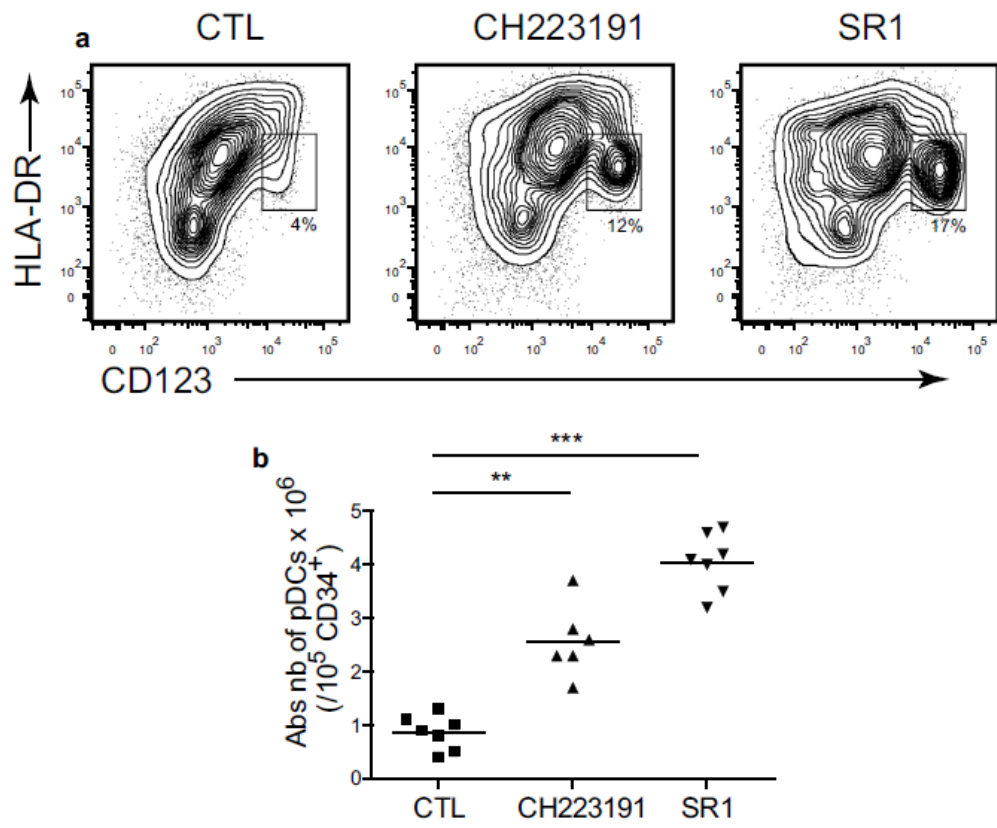


Figure 2

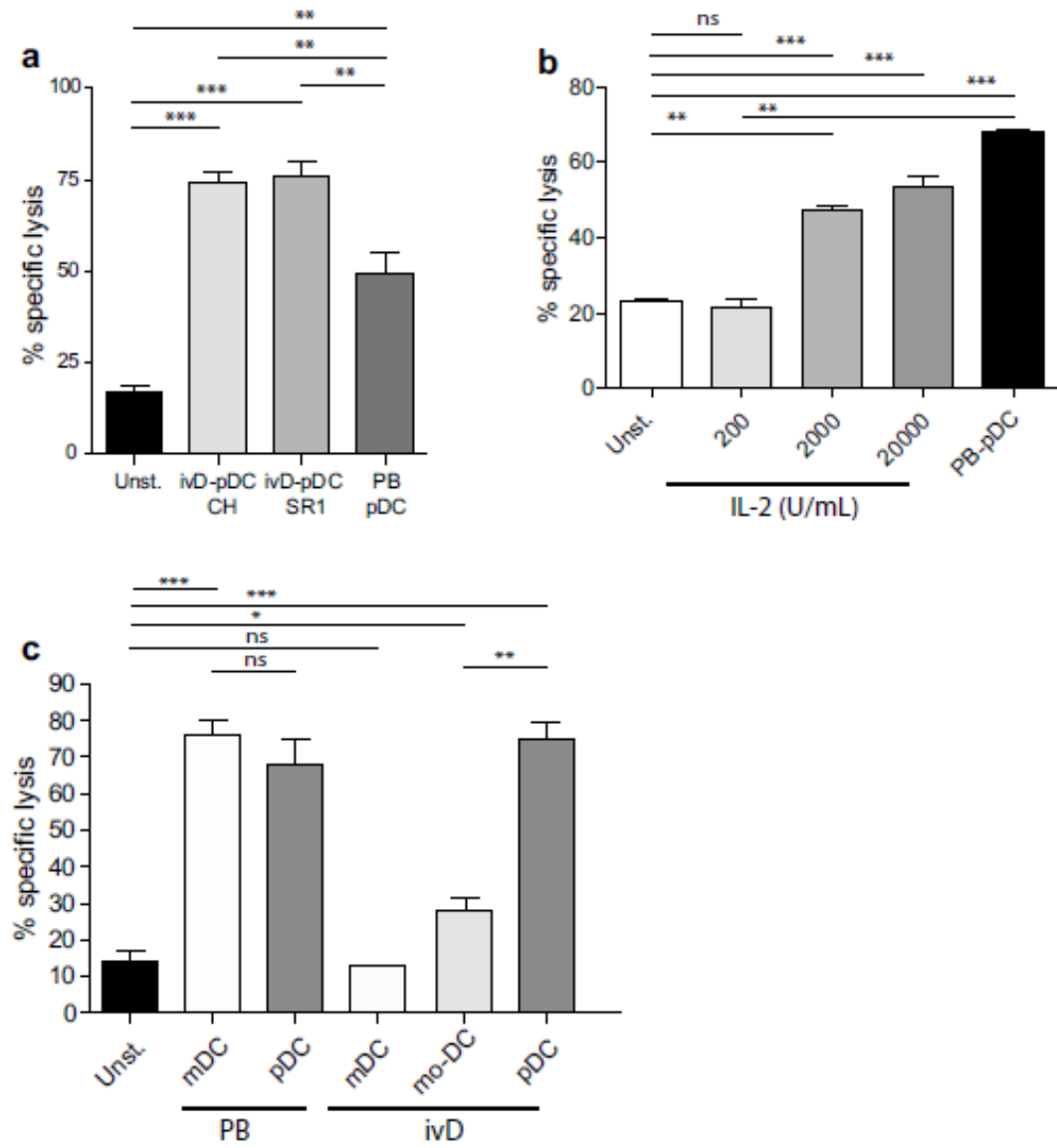


Figure 3

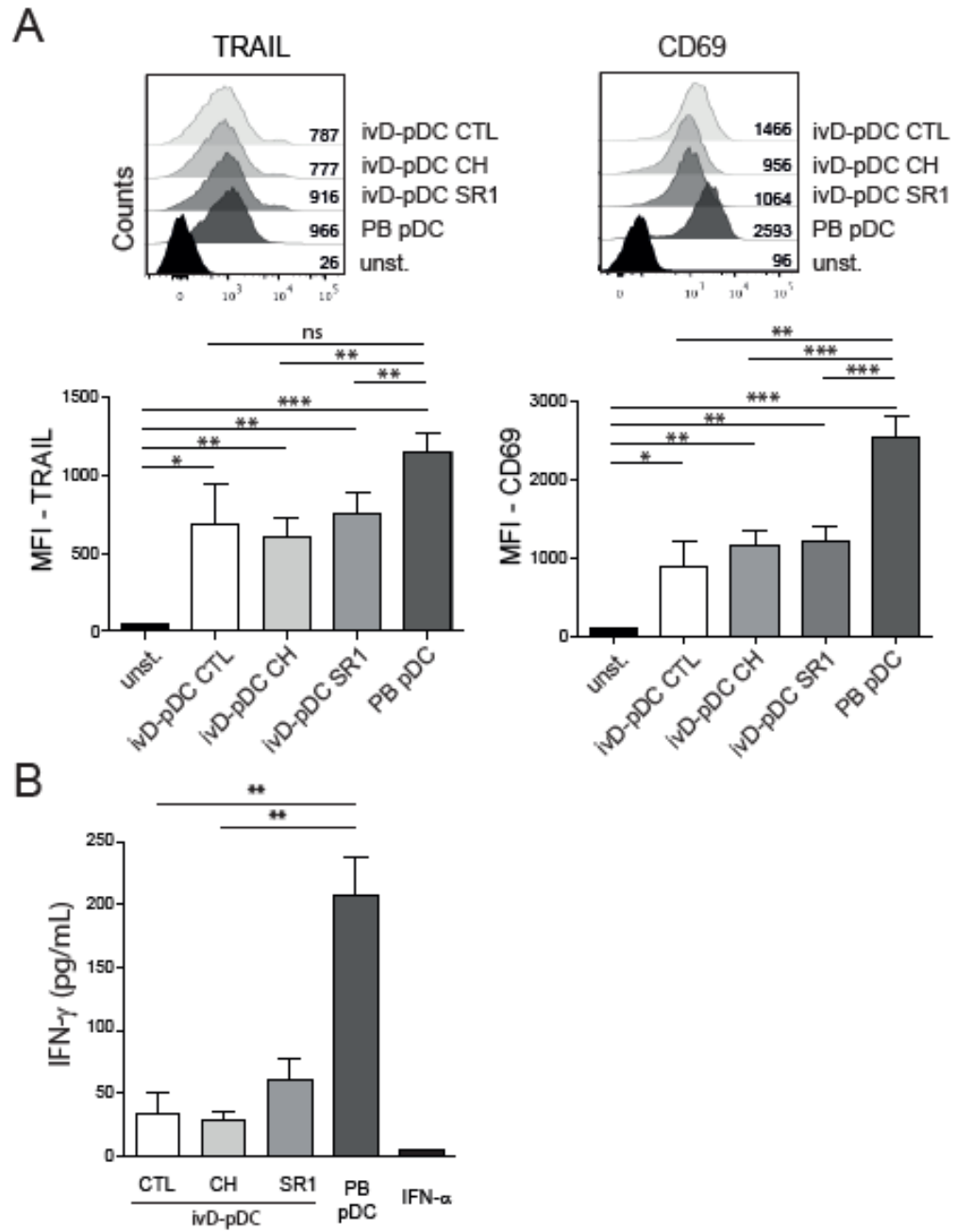


Figure 4

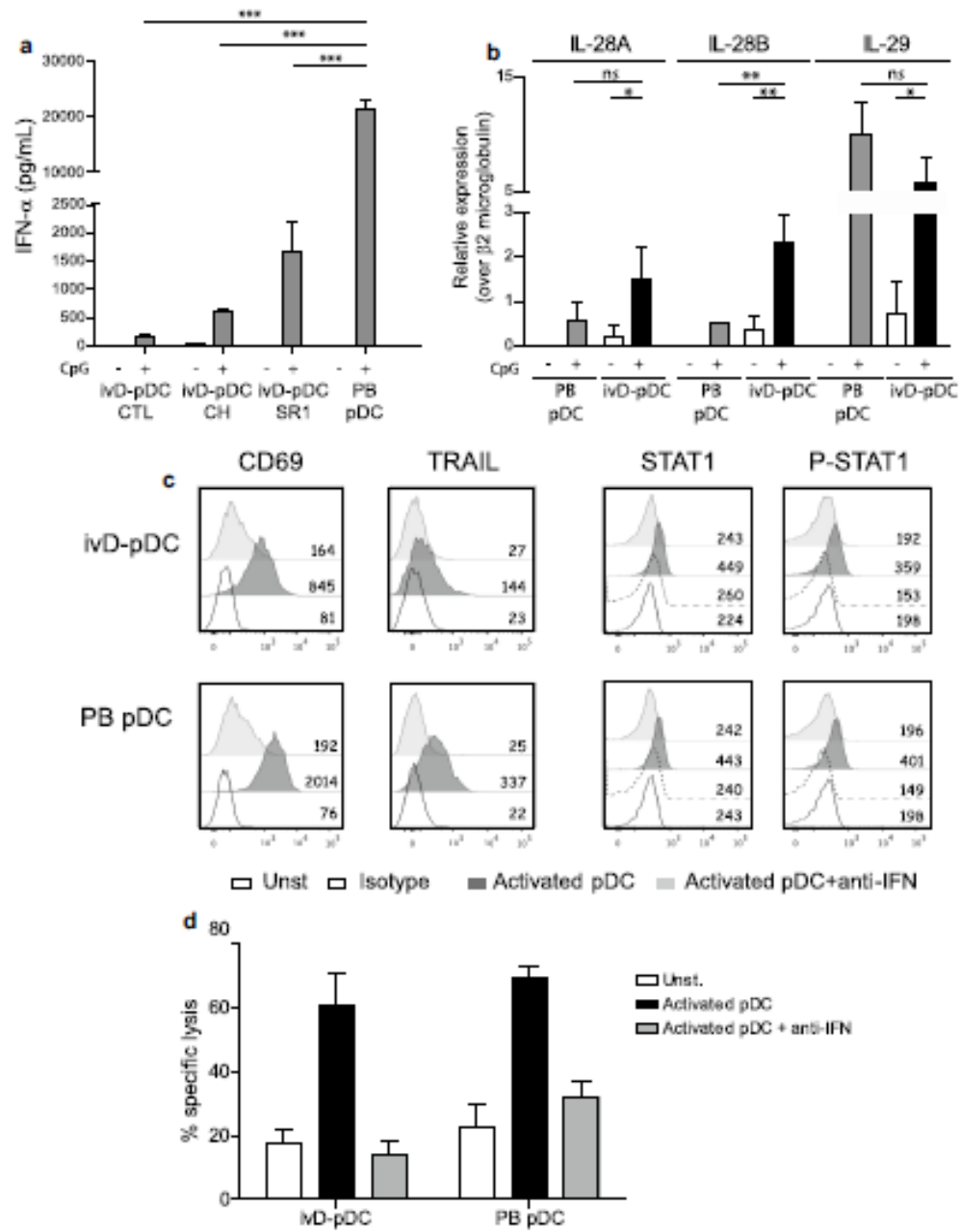




Figure 5

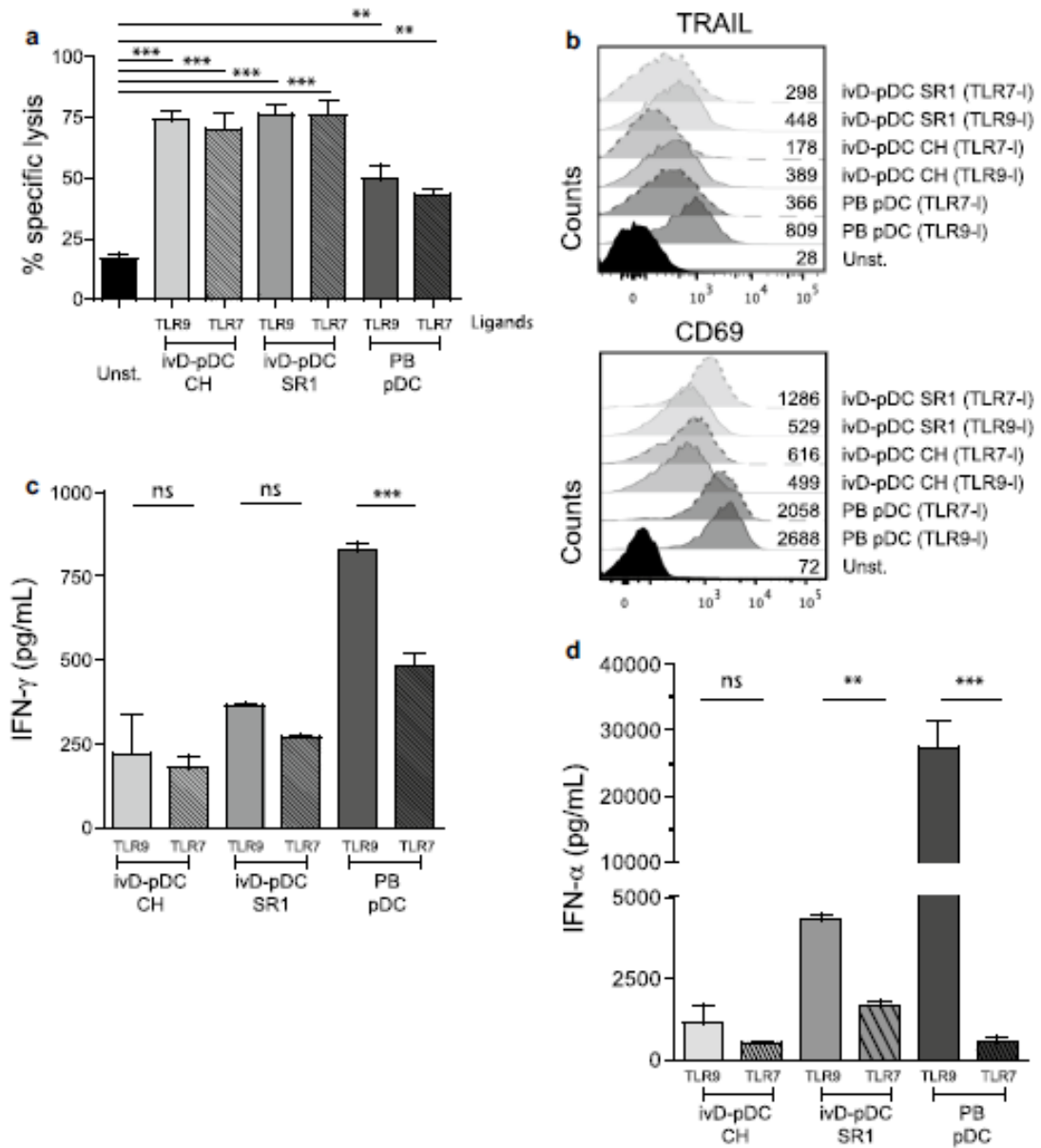


Figure 6

