

MÉMOIRE
DU DIPLÔME D'ÉTUDES SPECIALISÉES
DE BIOLOGIE MÉDICALE

Soutenu le 23 Avril 2019

Par Mme Pauline Saint-Jacques
Née le 19 Avril 1990

Conformément aux dispositions du décret n°2003-76
du 23 janvier 2003, tenant lieu de

THÈSE
POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

----oOo----

**Manipulation de cellules Natural Killer expandues: un outil thérapeutique dans les
hémopathies malignes en post allogreffe de cellules souches hématopoïétiques.**

----oOo----

JURY :

Président : Professeur Jean-Paul Borg

Membres : Professeur Florence Sabatier

Professeur Régis Costello

Docteur Cyril Fauriat

27 Boulevard Jean Moulin – 13385 MARSEILLE Cedex 05
Tel. : 04 91 83 55 00 – Fax : 04 91 80 26 12

ADMINISTRATION :

<i>Doyen :</i>	Mme Françoise DIGNAT-GEORGE
<i>Vice-Doyens :</i>	M. Jean-Paul BORG, M. François DEVRED, M. Pascal RATHELOT
<i>Chargés de Mission :</i>	Mme Pascale BARBIER, M. David BERGE-LEFRANC, Mme Manon CARRE, Mme Caroline DUCROS, Mme Frédérique GRIMALDI
<i>Conseiller du Doyen :</i>	M. Patrice VANELLE
<i>Doyens honoraires :</i>	M. Jacques REYNAUD, M. Pierre TIMON-DAVID, M. Patrice VANELLE
<i>Professeurs émérites :</i>	M. José SAMPOL, M. Athanassios ILIADIS, M. Jean-Pierre REYNIER, M. Henri PORTUGAL
<i>Professeurs honoraires :</i>	M. Guy BALANSARD, M. Yves BARRA, Mme Claudette BRIAND, M. Jacques CATALIN, Mme Andrée CREMIEUX, M. Aimé CREVAT, M. Bernard CRISTAU, M. Gérard DUMENIL, M. Alain DURAND, Mme Danielle GARÇON, M. Maurice JALFRE, M. Joseph JOACHIM, M. Maurice LANZA, M. José MALDONADO, M. Patrick REGLI, M. Jean-Claude SARI
<i>Chef des Services Administratifs :</i>	Mme Florence GAUREL
<i>Chef de Cabinet :</i>	Mme Aurélie BELENGUER
<i>Responsable de la Scolarité :</i>	Mme Nathalie BESNARD

DEPARTEMENT BIO-INGENIERIE PHARMACEUTIQUE

Responsable : Professeur Philippe PICCERELLE

PROFESSEURS

BIOPHYSIQUE

M. Vincent PEYROT
M. Hervé KOVACIC

GENIE GENETIQUE ET BIOINGENIERIE

M. Christophe DUBOIS

PHARMACIE GALENIQUE, PHARMACOTECHNIE INDUSTRIELLE,
BIOPHARMACIE ET COSMETIQUE

M. Philippe PICCERELLE

MAITRES DE CONFERENCES

BIOPHYSIQUE

M. Robert GILLI
Mme Odile RIMET-GASPARINI
Mme Pascale BARBIER
M. François DEVRED
Mme Manon CARRE
M. Gilles BREUZARD
Mme Alessandra PAGANO

GENIE GENETIQUE ET BIOTECHNOLOGIE

M. Eric SEREE-PACHA
Mme Véronique REY-BOURGAREL

PHARMACIE GALENIQUE, PHARMACOTECHNIE INDUSTRIELLE,
BIOPHARMACIE ET COSMETOLOGIE

M. Pascal PRINDERRE
M. Emmanuel CAUTURE
Mme Véronique ANDRIEU
Mme Marie-Pierre SAVELLI

NUTRITION ET DIETETIQUE

M. Léopold TCHIAKPE

A.H.U.

THERAPIE CELLULAIRE

M. Jérémy MAGALON

ENSEIGNANTS CONTRACTUELS

ANGLAIS

Mme Angélique GOODWIN

DEPARTEMENT BIOLOGIE PHARMACEUTIQUE

Responsable : Professeur Philippe CHARPIOT

PROFESSEURS

BIOCHIMIE FONDAMENTALE, MOLECULAIRE ET CLINIQUE

M. Philippe CHARPIOT

BIOLOGIE CELLULAIRE

M. Jean-Paul BORG

HEMATOLOGIE ET IMMUNOLOGIE

Mme Françoise DIGNAT-GEORGE
Mme Laurence CAMOIN-JAU
Mme Florence SABATIER-MALATERRE
Mme Nathalie BARDIN

MICROBIOLOGIE

M. Jean-Marc ROLAIN
M. Philippe COLSON

PARASITOLOGIE ET MYCOLOGIE MEDICALE, HYGIENE ET
ZOOLOGIE

Mme Nadine AZAS-KREDER

MAITRES DE CONFERENCES

BIOCHIMIE FONDAMENTALE, MOLECULAIRE ET CLINIQUE	Mme Dominique JOURDHEUIL-RAHMANI M. Thierry AUGIER M. Edouard LAMY Mme Alexandrine BERTAUD Mme Claire CERINI Mme Edwige TELLIER M. Stéphane POITEVIN
HEMATOLOGIE ET IMMUNOLOGIE	Mme Aurélie LEROYER M. Romaric LACROIX Mme Sylvie COINTE
MICROBIOLOGIE	Mme Michèle LAGET M. Michel DE MEO Mme Anne DAVIN-REGLI Mme Véronique ROUX M. Fadi BITTAR Mme Isabelle PAGNIER Mme Sophie EDOUARD M. Seydina Mouhamadou DIENE
PARASITOLOGIE ET MYCOLOGIE MEDICALE, HYGIENE ET ZOOLOGIE	Mme Carole DI GIORGIO M. Aurélien DUMETRE Mme Magali CASANOVA Mme Anita COHEN
BIOLOGIE CELLULAIRE	Mme Anne-Catherine LOUHMEAU

A.H.U.

HEMATOLOGIE ET IMMUNOLOGIE	M. Maxime LOYENS
----------------------------	------------------

DEPARTEMENT CHIMIE PHARMACEUTIQUE

Responsable : Professeur Patrice VANELLE

PROFESSEURS

CHIMIE ANALYTIQUE, QUALITOLOGIE ET NUTRITION	Mme Catherine BADENS
CHIMIE PHYSIQUE – PREVENTION DES RISQUES ET NUISANCES TECHNOLOGIQUES	M. Philippe GALLICE
CHIMIE MINERALE ET STRUCTURALE – CHIMIE THERAPEUTIQUE	M. Pascal RATHELOT M. Maxime CROZET
CHIMIE ORGANIQUE PHARMACEUTIQUE	M. Patrice VANELLE M. Thierry TERME
PHARMACOGNOSIE, ETHNOPHARMACOLOGIE, HOMEOPATHIE	Mme Evelyne OLLIVIER

MAITRES DE CONFERENCES

BOTANIQUE ET CRYPTOLOGIE, BIOLOGIE CELLULAIRE	Mme Anne FAVEL Mme Joëlle MOULIN-TRAFFORT
CHIMIE ANALYTIQUE, QUALITOLOGIE ET NUTRITION	Mme Catherine DEFOORT M. Alain NICOLAY Mme Estelle WOLFF Mme Elise LOMBARD Mme Camille DESGROUAS
CHIMIE PHYSIQUE – PREVENTION DES RISQUES ET NUISANCES TECHNOLOGIQUES	M. David BERGE-LEFRANC M. Pierre REBOUILLON
CHIMIE THERAPEUTIQUE	Mme Sandrine FRANCO-ALIBERT Mme Caroline DUCROS M. Marc MONTANA Mme Manon ROCHE
CHIMIE ORGANIQUE PHARMACEUTIQUE HYDROLOGIE	M. Armand GELLIS M. Christophe CURTI Mme Julie BROGGI M. Nicolas PRIMAS M. Cédric SPITZ M. Sébastien REDON
PHARMACOGNOSIE, ETHNOPHARMACOLOGIE, HOMEOPATHIE	M. Riad ELIAS Mme Valérie MAHIOU-LEDDET Mme Sok Siya BUN Mme Béatrice BAGHDIKIAN

MAITRES DE CONFERENCE ASSOCIES A TEMPS PARTIEL (M.A.S.T.)

CHIMIE ANALYTIQUE, QUALITOLOGIE ET NUTRITION	Mme Anne-Marie PENET-LOREC
CHIMIE PHYSIQUE – PREVENTION DES RISQUES ET NUISANCES TECHNOLOGIQUES	M. Cyril PUJOL
DROIT ET ECONOMIE DE LA PHARMACIE	M. Marc LAMBERT
GESTION PHARMACEUTIQUE, PHARMACOECONOMIE ET ETHIQUE PHARMACEUTIQUE OFFICINALE, DROIT ET COMMUNICATION PHARMACEUTIQUES A L'OFFICINE ET GESTION DE LA PHARMAFAC	Mme Félicia FERRERA

A.H.U.

CHIMIE ANALYTIQUE, QUALITOLOGIE ET NUTRITION	M. Mathieu CERINO
--	-------------------

ATER

CHIMIE ANALYTIQUE	M. Charles DESMARCHELIER
CHIMIE THERAPEUTIQUE	Mme Fanny MATHIAS

DEPARTEMENT MEDICAMENT ET SECURITE SANITAIRE

Responsable : Professeur Benjamin GUILLET

PROFESSEURS

PHARMACIE CLINIQUE	Mme Diane BRAGUER M. Stéphane HONORÉ
PHARMACODYNAMIE	M. Benjamin GUILLET
TOXICOLOGIE GENERALE	M. Bruno LACARELLE
TOXICOLOGIE DE L'ENVIRONNEMENT	Mme Frédérique GRIMALDI

MAITRES DE CONFERENCES

PHARMACODYNAMIE	M. Guillaume HACHE Mme Ahlem BOUHLEL M. Philippe GARRIGUE
PHYSIOLOGIE	Mme Sylviane LORTET Mme Emmanuelle MANOS-SAMPOL
TOXICOCINETIQUE ET PHARMACOCINETIQUE	M. Joseph CICCOLINI Mme Raphaëlle FANCIULLINO Mme Florence GATTACECCA
TOXICOLOGIE GENERALE ET PHARMACIE CLINIQUE	M. Pierre-Henri VILLARD Mme Caroline SOLAS-CHESNEAU Mme Marie-Anne ESTEVE

A.H.U.

PHARMACIE CLINIQUE	M. Florian CORREARD
PHARMACOCINETIQUE	Mme Nadège NEANT

CHARGES D'ENSEIGNEMENT A LA FACULTE

Mme Valérie AMIRAT-COMBRALIER, Pharmacien-Praticien hospitalier

M. Pierre BERTAULT-PERES, Pharmacien-Praticien hospitalier

Mme Marie-Hélène BERTOCCHIO, Pharmacien-Praticien hospitalier

Mme Martine BUES-CHARBIT, Pharmacien-Praticien hospitalier

M. Nicolas COSTE, Pharmacien-Praticien hospitalier

Mme Sophie GENSOLLEN, Pharmacien-Praticien hospitalier

M. Sylvain GONNET, Pharmacien titulaire

Mme Florence LEANDRO, Pharmacien adjoint

M. Stéphane PICHON, Pharmacien titulaire

M. Patrick REGGIO, Pharmacien conseil, DRSM de l'Assurance Maladie

Mme Clémence TABELLE, Pharmacien-Praticien attaché

Mme TONNEAU-PFUG, Pharmacien adjoint

M. Badr Eddine TEHHANI, Pharmacien – Praticien hospitalier

M. Joël VELLOZZI, Expert-Comptable

Mise à jour le 22 février 2018

A mon jury de thèse

Monsieur le Professeur Jean-Paul Borg

Je vous remercie chaleureusement d'avoir accepté de présider mon jury de thèse. En tant que professeur de biologie cellulaire à la faculté de pharmacie de Marseille, vice-doyen chargé de la recherche et directeur du Centre de Recherche en Cancérologie de Marseille, vous avez été très présent tout au long de mes études. Soyez assuré de ma sincère reconnaissance et de mon profond respect.

Madame le Professeur Florence Sabatier

Je suis très honorée que vous ayez accepté de siéger à ce jury. J'ai découvert la thérapie cellulaire il y a quelques années dans votre laboratoire à la Conception et vous avez fortement contribué à me donner le goût de la biologie médicale. Soyez assurée de ma profonde reconnaissance.

Monsieur le Professeur Régis Costello

Je vous adresse mes sincères remerciements pour apporter votre expérience clinique à la critique de ce travail. J'ai eu la chance de travailler à vos côtés lors de mon semestre au laboratoire d'hématologie de la Conception et de mesurer votre grande implication auprès de vos patients. Veuillez trouver ici l'expression de ma parfaite considération.

Monsieur le Docteur Cyril Fauriat

Un grand merci pour ton accompagnement et ton soutien tout au long de ce travail. Par ta bienveillance et ton ouverture d'esprit, tu m'as beaucoup aidé à choisir librement ce master 2. Merci pour ta disponibilité, pour ton investissement et pour toute l'énergie que tu as dépensé pour me former sur les différentes techniques. J'ai beaucoup appris durant cette année, tant sur le plan professionnel que personnel et je suis heureuse de présenter un travail de recherche translationnel pour ma thèse de pharmacien.

A toutes les personnes rencontrées pendant mon internat

Je tiens à remercier **l'équipe du CRCM « Immunité et cancer »** pour m'avoir chaleureusement accueillie, et particulièrement **le Professeur Daniel Olive**, qui m'a donné l'opportunité d'intégrer son équipe. Merci au **Docteur Raynier Devilliers** pour son aide précieuse.

J'exprime ma reconnaissance à tous les biologistes avec qui j'ai travaillé pendant mon internat. Je remercie particulièrement les personnes qui m'ont transmis leur passion pour l'hématologie : les Docteurs **Yaël Berda, Maud Arpin, Romaric Lacroix, Corinne Brunet, Charlotte Grosdidier, Véronique Baccini, Sylvie Cointe et Maxime Loyens**. Merci beaucoup à l'équipe du laboratoire d'hématologie de l'Institut Paoli Calmettes, les Docteurs **Anne Murati, Véronique Gelsi-Boyer, Anne-Catherine Lhoumeau et Carine Bozian**.

Je remercie chaleureusement les Docteurs **Sarah Machergui-Hammami, Marie-Christine Cabasso, Philippe Delmas, Stéphane Guinard, Guillaume Roux, Marion Semet** et l'ensemble de l'équipe du laboratoire du CHICAS de Gap. Cela a été un vrai plaisir de travailler avec vous ; ce n'était pas très bien parti mais l'air de Gap m'a fait le plus grand bien!

Enfin, je tiens à remercier tous **les techniciens et les secrétaires** pour le généreux partage de leur expérience ces cinq dernières années.

L'Université n'entend donner aucune approbation, ni improbation aux opinions émises dans les thèses. Ces opinions doivent être considérées comme propres à leurs auteurs.

TABLE DES MATIERES

LISTE DES ABREVIATIONS.....	3
LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX.....	6
I. L'ALLOGREFFE DE CELLULES SOUCHES HEMATOPOIETIQUES DANS LES HEMOPATHIES : UN « MODELE » D'IMMUNOTHERAPIE.....	7
1. Principe de l'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques.....	7
2. Les indications de l'allogreffe de CSH.....	7
3. Aspects immunologiques et sélection du donneur	8
a. Le système HLA.....	9
b. Les différents types d'allogreffes de CSH.....	9
4. Les complications de l'allogreffe de CSH.....	10
a. La période d'aplasie	10
b. Les risques de la greffe	11
c. Les risques à long terme	12
5. Enjeu actuel de l'allogreffe de CSH.....	12
II. LES CELLULES NK : CELLULES ANTI-LEUCEMIQUES IDEALES ?.....	14
1. Introduction	14
a. Phénotype des cellules NK.....	14
b. Différenciation et maturation des cellules NK.....	15
2. Les fonctions des cellules NK.....	16
a. Activation des cellules NK.....	16
b. Cytotoxicité et activité immunorégulatrice des cellules NK	17
3. Les récepteurs des cellules NK	17
a. Les récepteurs inhibiteurs	17
b. Les récepteurs activateurs	18
4. L'immunosurveillance anti-tumorale par les cellules NK	20
a. Place des cellules NK en oncologie	20
b. Les cellules NK en contexte d'allogreffe de CSH	23
Objectifs du travail de thèse.....	25
III. 1 ^{ère} PARTIE : ACTIVATION ET EXPANSION <i>EX-VIVO</i> DE CELLULES NK	26
1. Différentes approches d'immunothérapies anticancéreuses par les cellules NK.....	26
a. Cytokines.....	27
b. Anticorps monoclonaux	28

c. Transfert adoptif de cellules NK	29
2. Comparaison de méthodes d'expansion de cellules NK	33
a. Matériels et méthodes	33
b. Résultats	36
c. Discussion et perspectives	38
d. Conclusion	40
IV. 2 ^{ème} PARTIE : NOUVELLE APPROCHE DE COMBINAISON D'UNE THERAPIE CELLULAIRE ET PHARMACOLOGIQUE DANS LE TRAITEMENT PROPHYLACTIQUE DE RECHUTES POST ALLOGREFFE DE CSH.....	41
1. Découverte de molécules de « points de contrôle immunitaires » sur les cellules NK....	41
a. Récepteurs KIR et anticorps monoclonaux anti-KIR	41
b. Récepteur NKG2A et anticorps monoclonaux anti-NKG2A.....	42
c. Récepteur PD-1 et anticorps monoclonaux anti-PD-1	43
d. Récepteur TIM-3 et anticorps monoclonaux anti-TIM-3	43
2. Etude de la combinaison d'un produit de cellules NK expandues avec différents anticorps monoclonaux.	44
a. Matériels et méthodes	44
b. Résultats	45
c. Discussion.....	46
d. Conclusion et perspectives.....	48
V. CONCLUSION GENERALE	49
BIBLIOGRAPHIE	50
ANNEXES	

LISTE DES ABREVIATIONS

CSH: Cellules souches hématopoïétiques

CFU-L: Colony Forming Unit Lymphocyte

CFU-GEMM: Colony Forming Unit Granulocyte Erythrocyte Megakaryocyte Monocyte

CFU-Eo: Colony Forming Unit Granulocyte Eosinocyte

CFU-MK: Colony Forming Unit Megakaryocyte

BFU-E: Burst Forming Unit Erythroid

HLA : Human Leukocyte Antigen

LAM : Leucémie aigüe myéloïde

LMC: Leucémie myéloïde chronique

NMP: Néoplasie myéloproliférative

LLC: Leucémie lymphoïde chronique

SMD: Syndrome myélodysplasique

LAL: Leucémie aiguë lymphoïde

LH: Lymphome hodgkinien

LNH: Lymphome non hodgkinien

RC: Rémission complète

G-CSF: Granulocyte Colony Stimulating Factor

GVL: Graft Versus Leukemia

GVH: Graft Versus Host

CMH : Complexe majeur d'histocompatibilité

CD : Cluster de différenciation

IL: Interleukine

TNF- α : Tumor Necrosis Factor

APC: Antigen Presenting Cell

NK: Natural Killer

ILC: Innate Lymphoid Cell

IFN- γ : Interféron γ

KIR: Killer-Cell Immunoglobulin-Like Receptor

JAK: Janus Kinase

STAT: Signal transducer and activator of transcription 3

PI3K: Phosphoinositide 3-kinase

NF κ B: Nuclear factor-kappa B

TRAIL: Tumor-necrosis-factor related apoptosis inducing ligand

ADCC: Cytotoxicité à médiation Cellulaire Dépendante des Anticorps

MIP-1: Macrophage inflammatory protein 1

RANTES: Regulated on Activation, Normal T Cell Expressed and Secreted

ILT-2: Human inhibitory receptors Ig-like transcript 2

LAIR-1: Leukocyte-associated immunoglobulin-like receptor 1

PD-1: Programmed cell death 1

PDL-1: Programmed cell death ligand 1

TIM-3: T-cell Immunoglobulin and Mucin-domain containing-3

TIGIT: T cell Immunoreceptor with Ig and ITIM domains

LAG-3: Lymphocyte-Activation Gene 3

CEACAM1: Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1

ITIM: Immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif

SH2: Src Homology 2

NCR: Natural Cytotoxicity Receptors

DNAM-1: DNAX accessory molecule-1

MIC: Major-histocompatibility-complex class I-related chain

ULBPs: UL16-Binding Proteins

BAT-3: HLA-B-Associated Transcript 3

BAG6: BCL2 Associated Athanogene 6

PCNA: Proliferating Cell Nuclear Antigen

MLL5: Histone-Lysine N-Methyltransferase

PVR: Polio Virus Receptor

MFI: Moyenne des intensités de fluorescence

MDSC: Myeloid-Derived Suppressor Cells

CRCM: Centre de Recherche en Cancérologie de Marseille

IPC: Institut Paoli Calmettes

TGFβ: Transforming Growth Factor beta

ANSM: Agence nationale de sécurité du médicament

PBMC: Peripheral Blood Mononuclear Cell

ESCs: Embryonic Stem Cells

iPSCs: Induced Pluripotent Stem Cells

FDA: Food and Drug Administration

CAR: Chimeric Antigen Receptor

NCT: National Clinical Trials

EBV-LCL: Epstein-Barr Virus-Lymphoblastoid Cell Lines

EDTA: Ethylène Diamine Tétra Acétique

RPMI: Roswell Park Memorial Institute medium

SVF: Sérum de Veau Fœtal

DMSO: Diméthylsulfoxyde

PBS: Phosphate-buffered saline

LAMP1: Lysosomal-associated membrane protein 1

EFS: Etablissement Français du Sang

CLP: Common Lymphocyte Progenitor

GMP: Good Manufacturing Practice

SLAMF7: SLAM family member 7

ns: Non significatif

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

Figure 1 : Principales étapes de l'hématopoïèse.

Figure 2: Répartition des indications pour les patients ayant eu une allogreffe de CSH en Europe en 2016.

Figure 3 : Stratégie de prise en charge des patients atteints de LAM selon les recommandations de l'European Leukemia Network.

Figure 4: Schéma des principaux effets et complications d'une allogreffe de CSH.

Figure 5: Physiopathologie de la réaction aigüe du greffon contre l'hôte.

Figure 6: Les différentes populations de l'immunité innée et adaptative.

Figure 7: Etapes de différenciation et maturation des cellules NK.

Figure 8: Mécanismes d'activation des lymphocytes NK.

Figure 9: Fonctions des cellules NK et interactions avec les autres cellules immunitaires.

Figure 10 : Ensemble des récepteurs des cellules NK.

Figure 11 : Caractéristiques des cellules cancéreuses.

Figure 12: Altérations du phénotype et de la fonction des cellules NK du sang périphérique de patientes atteintes de cancers du sein de différents stades au diagnostic.

Figure 13: Courbe de survie en fonction du phénotype des NCR des cellules NK au diagnostic.

Figure 14: Stratification pronostique des patients des cohortes GOELAMS et IPC selon l'ELN et le statut NKp30.

Figure 15: Exploration des stratégies d'expansion de cellules NK.

Figure 16 : Profil de maturation des cellules NK expandues.

Figure 17 : Fonctionnalité des cellules NK expandues.

Figure 18 : Congélation/ décongélation de cellules NK expandues.

Figure 19 : Sevrage des cellules NK expandues.

Figure 20 : Expression de molécules de co-stimulation sur les cellules NK expandues.

Figure 21 : Manipulation pharmacologique des cellules NK expandues par blocage du récepteur NKG2A.

Figure 22 : Manipulation pharmacologique des cellules NK expandues par blocage du récepteur TIM-3.

Tableau 1 : Principales cytokines régulant la différenciation et les fonctions des cellules NK.

Tableau 2 : Essais cliniques français d'infusion de cellules NK.

Tableau 3 : Récepteurs inhibiteurs des cellules NK qui font l'objet d'une thérapie ciblée.

I. L'ALLOGREFFE DE CELLULES SOUCHES HEMATOPOIETIQUES DANS LES HEMOPATHIES : UN « MODELE » D'IMMUNOTHERAPIE

1. Principe de l'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques

L'hématopoïèse représente l'ensemble des phénomènes qui assurent la production et le remplacement continu et régulé des cellules sanguines. Elle a lieu dans la moelle osseuse qui est présente dans les os plats et courts à l'âge adulte (bassin, sternum, vertèbres). Les cellules souches hématopoïétiques (CSH) constituent le point de départ de la production des cellules sanguines matures du sang circulant. Elles sont rares, représentant 0,1% des cellules médullaires, multipotentes et douées de capacités d'auto-renouvellement et de différenciation (**Figure 1**).

L'allogreffe de CSH consiste en l'infusion de CSH provenant d'un donneur sain HLA compatible afin de remplacer et réparer le système hématopoïétique et immunitaire d'un receveur. Les CSH proviennent de différentes sources: la moelle osseuse, le sang périphérique par cytophérèse après mobilisation ou le sang de cordon.

2. Les indications de l'allogreffe de CSH

En 2016, 17 641 allogreffes de CSH ont été réalisées en Europe, soit 68% de plus qu'en 2006 ¹. La principale indication concerne les hémopathies malignes qui représentent 81% des allogreffes de CSH. L'allogreffe de CSH pour des patients atteints de cancers solides concerne moins de 1% des indications. Enfin, le reste des situations nécessitant une allogreffe de CSH concerne des pathologies non malignes telles que des déficits immunitaires combinés sévères, des aplasies médullaires sévères, des hémoglobinopathies sévères...

Parmi les cancers hématologiques, 65% des allogreffes sont réalisées pour des hémopathies de la lignée myéloïde avec comme pathologies principales, les leucémies aigües myéloïdes (LAM). Il s'agit d'un ensemble hétérogène de pathologies défini par la prolifération maligne de progéniteurs des cellules sanguines. Ces cellules présentent un blocage de maturation ; elles n'ont plus de capacité de différenciation. Les autres hémopathies regroupent les pathologies malignes de la lignée lymphoïde (**Figure 2**).

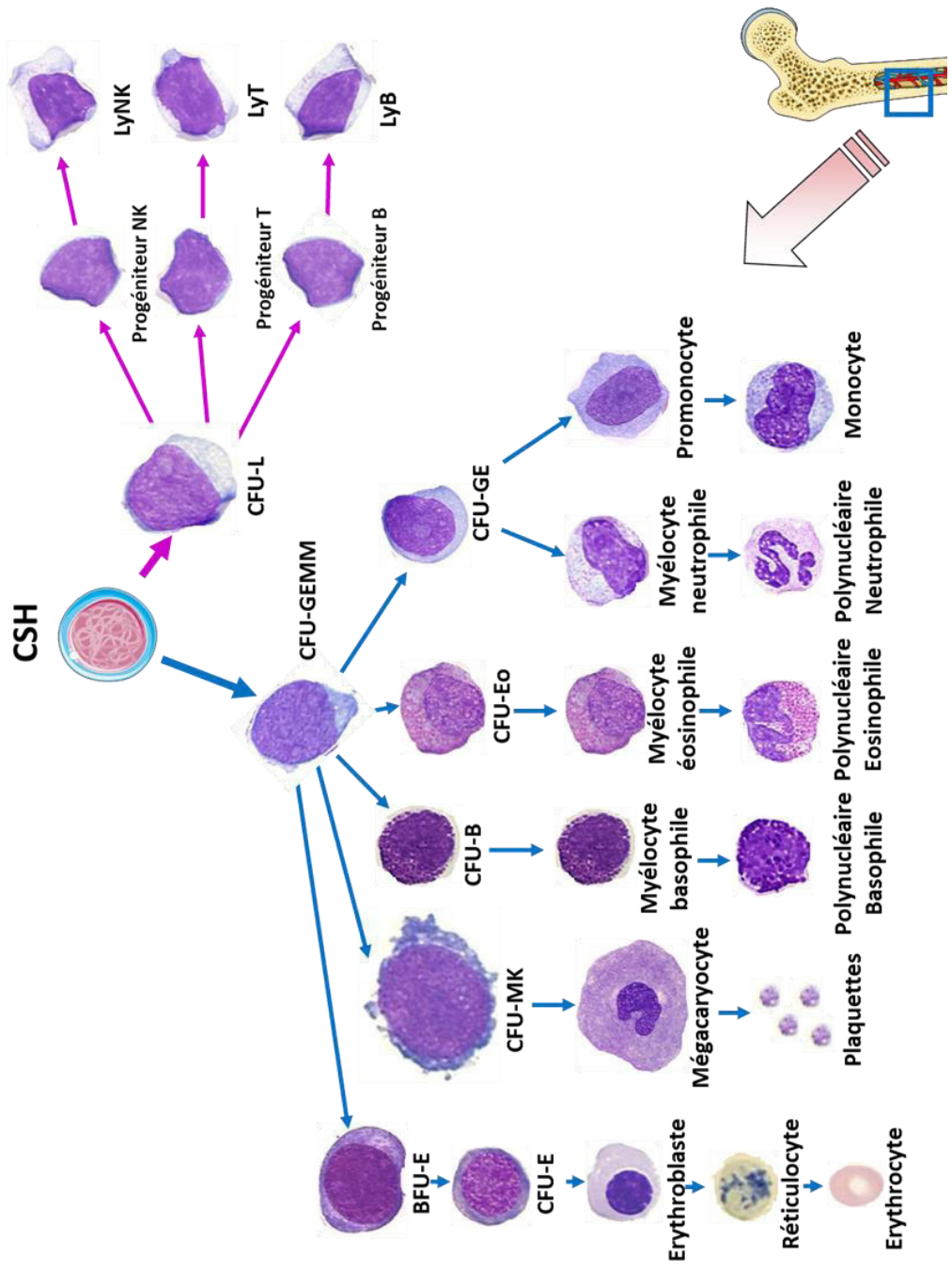


Figure 1 : Principales étapes de l'hématopoïèse (D'après Fuchs *et al.* 2016).

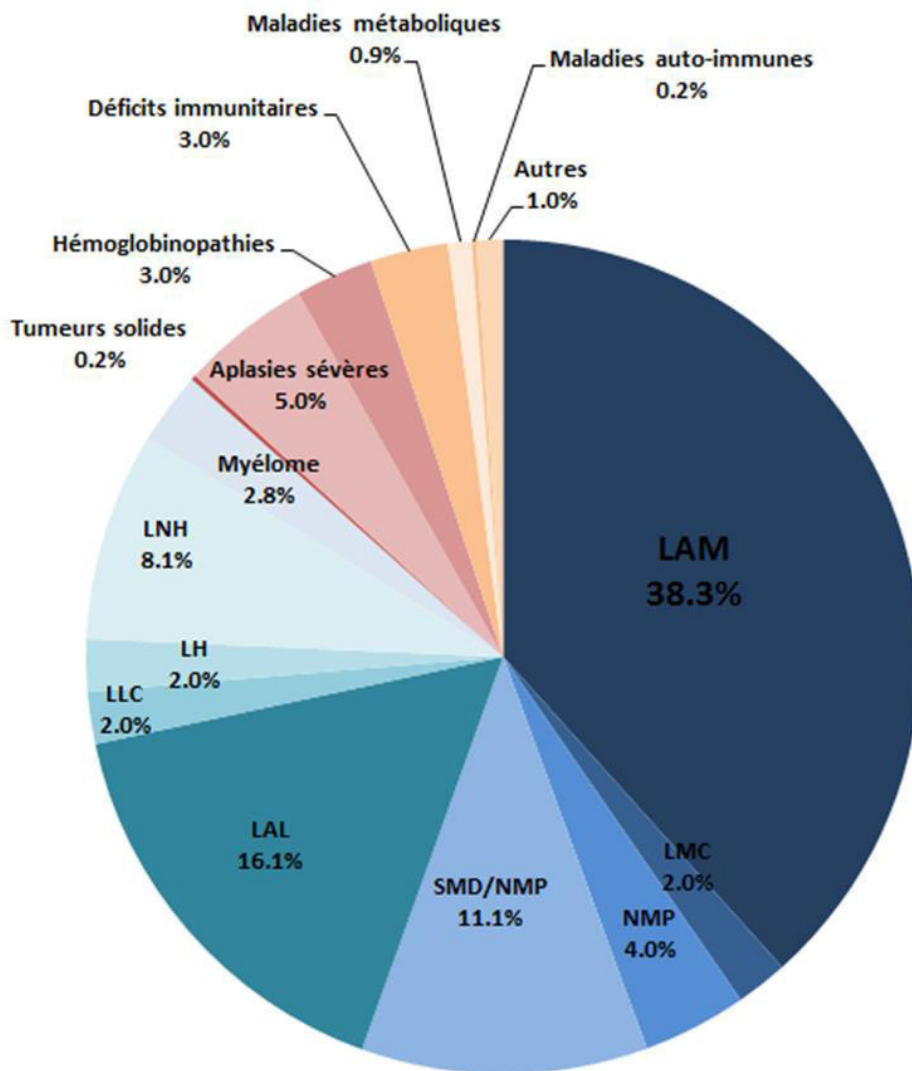


Figure 2: Répartition des indications pour les patients ayant eu une allogreffe de CSH en Europe en 2016. En bleu sont représentées les indications appartenant aux hémopathies malignes. (Passweg *et al.* 2018)

Concernant la prise en charge thérapeutique des LAM, première pathologie pour laquelle l'allogreffe de CSH est indiquée, celle-ci est fonction principalement de l'âge du patient au diagnostic et du pronostic de la maladie (établi notamment en fonction d'anomalies cytogénétiques des cellules malignes). Globalement, les patients sont traités par chimiothérapie, avec une première phase d'induction très agressive visant à obtenir une rémission complète (RC) rapidement. Si les patients ne peuvent pas être traités agressivement, d'autres alternatives sont proposées. La seconde phase du traitement est une phase de consolidation pour assurer une rémission prolongée. Durant cette période, les patients de mauvais pronostic sont considérés à haut risque de rechute, c'est pourquoi l'allogreffe de CSH est recommandée dès l'obtention de la rémission complète. Cette thérapeutique, non dénuée d'effets secondaires, ne peut être proposée à tous les patients et les patients âgés ou ayant des comorbidités ne sont pas éligibles. Concernant la prise en charge des patients de pronostic intermédiaire, celle-ci n'est pas encore consensuelle étant donné la rechute précoce de certains et le maintien d'une rémission complète prolongée pour d'autres. Pour les patients de bon pronostic, la greffe n'apporte pas de bénéfice en terme de survie et la chimiothérapie est suffisante pour induire une rémission complète prolongée (**Figure 3**)².

3. Aspects immunologiques et sélection du donneur

Un greffon de CSH est prélevé chez un donneur compatible et administré au receveur après un traitement par chimio-radiothérapie dit de « conditionnement ». L'allogreffe a une triple action:

- l'éradication tumorale par la chimio-radiothérapie de conditionnement;
- la reconstitution hématopoïétique à partir d'un greffon sain;
- la reconstitution immunologique ayant un effet anti-leucémique "direct" par réaction allogénique du greffon contre les cellules malignes du receveur (effet GVL "Graft Versus Leukemia" ou "greffon contre la leucémie"); on parle d'immunothérapie anti-leucémique, médiée principalement par les lymphocytes effecteurs T et NK.

Cette efficacité est contre balancée par la morbi-mortalité associée au conditionnement intensif et au revers de la réaction de GVL lors de la reconstitution immunologique: la maladie du greffon contre l'hôte (effet GVH "Graft versus Host »).

Patients éligibles à la chimiothérapie intensive	
Thérapie d'induction (tous âges)	3 jours d'anthracycline IV: daunorubicine; idarubicine, ou mitoxantrone, et 7 jours d'IV continue de cytarabine.
Thérapie de consolidation pour les patients jeunes (18-60/65 ans)	
• anomalies génétiques favorables	2-4 cycles de cytarabine à dose intermédiaire (IDAC)
• anomalies génétiques intermédiaires	Grefe allogénique de CSH 2-4 cycles d'IDAC Thérapie forte dose et autogrefe de CSH
• anomalies génétiques défavorables	Grefe allogénique de CSH
Thérapie de consolidation pour les patients âgés (>60/65 ans)	
• anomalies génétiques favorables	2-4 cycles d'IDAC
• anomalies génétiques intermédiaires et défavorables	Efficacité non établie de la thérapie de consolidation intensive; considérer la greffe allogénique de CSH chez les patients ayant de faibles comorbidités, ou proposer des études cliniques expérimentales.
Patients non candidats à la chimiothérapie intensive	
Azacitidine, ou Décitabine, ou cytarabine faible dose, hydroxyurée, soins de support	
Patients non répondeurs au premier cycle d'induction ou en rechute, éligibles à la chimiothérapie intensive	
IDAC	Cytarabine à dose intermédiaire avec ou sans Idarubicine, Daunorubicine, Mitoxantrone
FLAG-IDA	Fludarabine, Cytarabine, Idarubicine, et G-CSF
MEC	Mitoxantrone, Etoposide, Cytarabine
Grefe allogénique de CSH	A considérer pour les patients réfractaires primaires ou en 2 ^{ème} rémission complète.

Figure 3 : Stratégie de prise en charge des patients atteints de LAM selon les recommandations de l'European Leukemia Network (D'après Döhner *et al.* 2017).

a. Le système HLA

La compatibilité HLA entre le donneur et le receveur est indispensable pour éviter ou limiter les complications. Les antigènes du système HLA (pour "Human Leukocyte Antigen") correspondent au Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH). Il s'agit du groupe de marqueurs génétiques de la compatibilité tissulaire humaine. L'extrême diversité (polymorphisme génétique) du CMH en fait également le déterminant principal de l'acceptation du greffon appelée « histocompatibilité » ou du rejet du greffon entre donneur et receveur différents (**Figure 4**).

Les cellules d'un organisme portent un marqueur à leur surface qui leur permet d'être reconnues comme appartenant à ce même organisme, c'est le CMH de classe I. C'est ce qui permet au système immunitaire de distinguer ses propres tissus de ce qu'il considère comme étranger (virus, bactéries, cellules tumorales transformées...). Certains leucocytes, comme les monocytes dans le sang ou les macrophages dans les tissus possèdent en plus une molécule de présentation d'éléments extérieurs au corps ou antigènes, c'est le CMH de classe II. Les gènes du système HLA sont situés sur le bras court du chromosome 6 et les locus les plus particulièrement étudiés sont HLA-A, HLA-B et HLA-C (appartenant au CMH de classe I) et HLA-DP, HLA-DQ et HLA-DR (appartenant au CMH de classe II). Pour qu'une greffe classique prenne, et éviter le rejet entre les CSH du donneur et l'organisme du receveur, il est préférable de trouver la plus grande compatibilité HLA possible.

b. Les différents types d'allogreffes de CSH

Les greffons HLA compatibles

Tout d'abord, on cherche à réaliser une **greffe génoidentique** chez un donneur apparenté au sein de la fratrie. On réalise pour cela un génotypage des locus d'intérêt HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DQ et HLA-DR chez le receveur et ses frères et sœurs et l'on cherche à avoir une compatibilité de 10/10, soit deux allèles identiques pour chaque gène par rapport au receveur. Pour 70% des patients, ce donneur n'existe pas ³. Jusqu'à récemment, la recherche s'effectuait alors dans le Registre International de Donneurs de Moelle Osseuse mais pour un patient d'origine européenne, il n'y a que 30 à 50% de chance de trouver un donneur HLA compatible non apparenté 10/10 ou 9/10 ⁴. On appelle cela un « **donneur phénoïdentique** », c'est-à-dire dont le génotype n'est pas identique mais le phénotype des allèles des gènes d'intérêt permet qu'au moins 9 allèles sur 10 soient identiques au receveur.

ALLOREACTIVITE ciblant les antigenes d'histocompatibilité

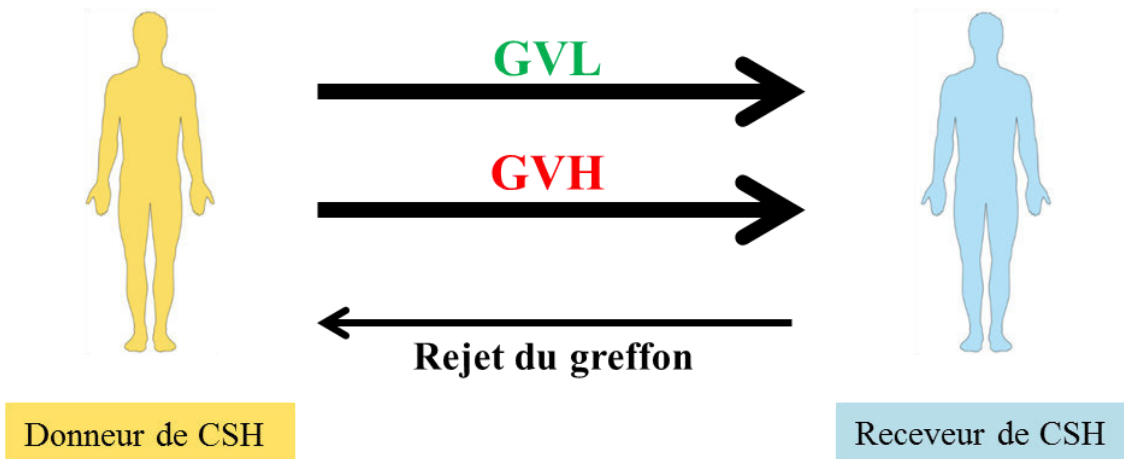


Figure 4: Schéma des principaux effets et complications d'une allogreffe de CSH.

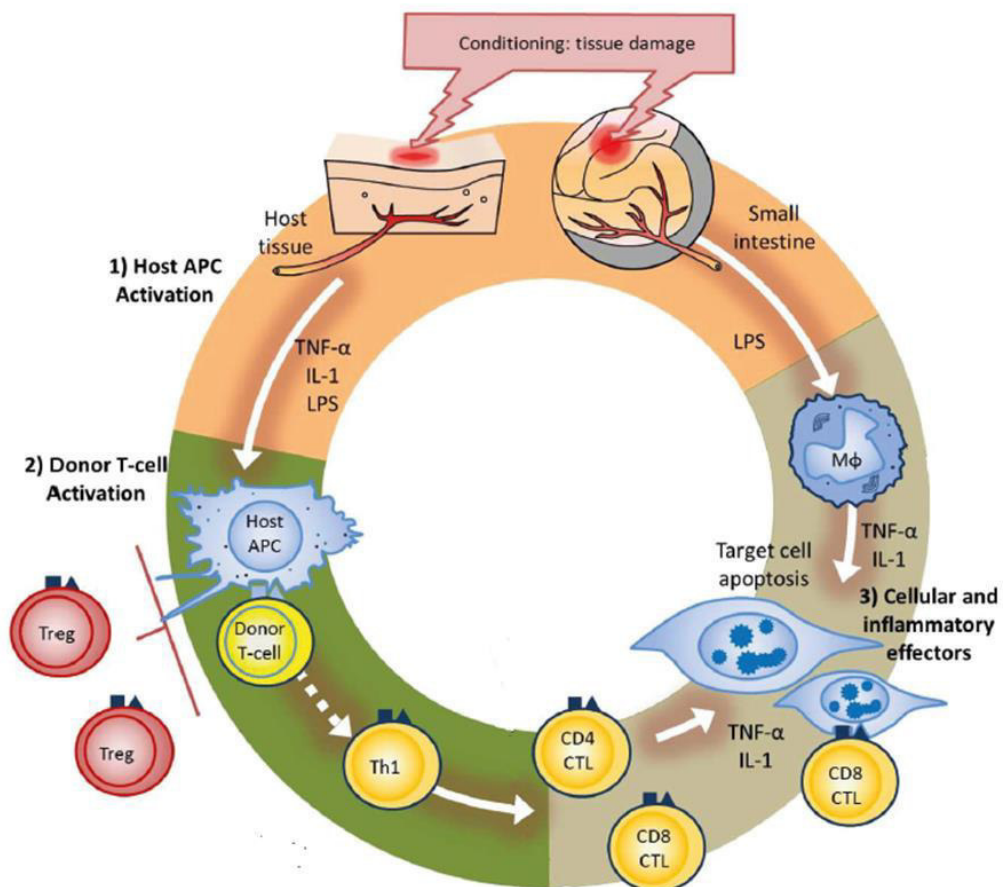


Figure 5: Physiopathologie de la réaction aigüe du greffon contre l'hôte (Ferrara *et al.* 2009).

Cette procédure demande souvent plusieurs mois d'attente durant lesquels le patient peut rechuter ou même décéder.

Les greffons HLA partiellement compatibles

Aujourd'hui, il est devenu possible de réaliser une greffe allogénique sans provoquer de rejet, avec seulement un seul haplotype (ensemble de gènes liés situés sur un chromosome) commun entre le donneur et le receveur de CSH, soit une compatibilité $\geq 5/10$ allèles. La première greffe dite « haplo-identique » ou « haplo-mismatch » a été réalisée il y a plus de 30 ans par l'équipe de Powles⁵. Depuis, ce type de greffe permet d'élargir le champ de donneurs au sein de l'ensemble de la famille et facilite l'accès au donneur pour d'éventuelles thérapies cellulaires supports de l'allogreffe ou bien une éventuelle seconde greffe dans des cas de rechutes. De plus, il semblerait que ces greffes HLA partiellement compatibles aient un effet GVL majoré⁶. En effet, l'intérêt immunologique de ce type de greffe réside, entre autre, dans une meilleure exploitation du caractère alloréactif des effecteurs cytotoxiques T et NK du greffon (voir chapitre II.4.c).

4. Les complications de l'allogreffe de CSH

Bien que l'allogreffe de CSH reste le seul traitement capable d'induire une rémission complète prolongée chez une partie des patients atteints d'hémopathies malignes, elle n'en est pas moins une procédure difficile non dénuée de risques. Un taux de rechute de 30% et une survie globale variant entre 15 et 50% à 2 ans rendent compte des limites dans la compréhension des mécanismes liés à l'allogreffe⁷. Les risques peuvent être séparés en trois périodes: la période d'aplasie, les risques de la greffe elle-même et les risques à long terme.

a. La période d'aplasie

Cette période est liée au traitement de conditionnement en pré greffe qui induit une immunosuppression forte afin d'éviter, notamment, le rejet du greffon⁸.

Le conditionnement standard ou myéloablatif repose sur des protocoles combinant de la chimiothérapie à haute dose plus ou moins une irradiation corporelle totale et du sérum anti-lymphocytaire. Il a pour but de détruire toutes les cellules de la moelle osseuse afin de favoriser la prise de greffe et de prévenir le rejet par les cellules immunes du receveur mais aussi d'éradiquer les cellules tumorales résiduelles pour éviter la rechute. En revanche, il

induit de fortes toxicités liées à cette période d'aplasie médullaire profonde, notamment des complications infectieuses.

Afin de diminuer ces contraintes toxiques majeures et permettre un conditionnement chez des patients de plus de 55 ans, des protocoles de conditionnement atténué ou d'intensité réduite ont été mis au point avec des doses de chimiothérapie moins fortes^{9,10}. Ce traitement provoque moins de complications infectieuses, de GVH aiguës et de mortalités liées au traitement. En revanche, la GVH chronique reste une des limites de ce conditionnement¹¹.

b. Les risques de la greffe

Le rejet

Il s'agit de la réaction immunitaire du receveur contre les CSH de son donneur qui empêche la prise de greffe. Cet évènement peut très rarement survenir après un conditionnement à intensité réduite après une greffe de cordon ou une greffe non HLA identique. Le rejet nécessite généralement une seconde administration de CSH après un nouveau traitement d'intensité réduite.

La GVH

Il s'agit de la réaction liée à la reconnaissance par les lymphocytes T du greffon des antigènes mineurs d'histocompatibilité du receveur suivie de l'activation d'une réponse cytotoxique (lymphocytes T et NK) et inflammatoire (macrophages et cytokines) lésant les tissus du receveur. Cette activation doit d'abord être considérée comme bénéfique puisqu'elle permet de détruire les cellules tumorales résiduelles: c'est ce que l'on appelle l'effet GVL. Cependant, il est très difficile de séparer cette réaction bénéfique GVL de la réaction dangereuse de GVH.

En général, la GVH se manifeste de deux manières différentes:

- la GVH aiguë: elle peut survenir dès la prise de greffe et dans les trois mois qui suivent la greffe. Elle attaque à des degrés divers la peau, le tube digestif et le foie et se décompose en trois phases mettant en jeu l'immunité innée et adaptative. La première étape correspond à l'agression du tissu du receveur par le conditionnement. Il y a libération de cytokines pro inflammatoires et recrutement des cellules présentatrices d'antigènes qui vont stimuler les lymphocytes T allogéniques et initier la réaction¹². La seconde phase est marquée par la prolifération et la différenciation des lymphocytes T du donneur en populations T CD4+ et

CD8+ effectrices. L'IL-2 augmente l'alloréactivité des lymphocytes T et stimule les macrophages pour produire du TNF- α et ainsi favoriser la réaction inflammatoire. La dernière étape correspond à l'apoptose des cellules cibles par les lymphocytes T cytotoxiques via la voie de Fas/ Fas-L et de la perforine et granzymes¹³ (**Figure 5**).

- la GVH chronique: elle peut survenir à partir du 4^{ème} mois avec ou sans GVH aigüe préalable. Elle correspond à la stimulation chronique des lymphocytes T du donneur contre différents organes du receveur. Son mécanisme est moins bien décrit.

c. Les risques à long terme

Les complications diverses

Des complications, liées principalement aux chimiothérapies, peuvent survenir après la greffe, telles que des troubles de la fertilité ou des troubles endocriniens, des tumeurs secondaires...

La rechute

Le risque de rechute varie avec le type de greffe, le type d'hémopathie initiale, le type de conditionnement et la survenue ou non de GVH. Il est décrit qu'environ 40% des receveurs de greffes HLA identiques et 35% des receveurs de greffes non HLA identiques ont un risque de rechute de leur pathologie initiale¹⁴. La rechute peut être liée à plusieurs facteurs: un conditionnement insuffisamment puissant pour détruire les cellules leucémiques résiduelles, une faiblesse du système immunitaire à produire un effet GVL efficace et/ou un échappement des cellules tumorales au système immunitaire.

5. Enjeu actuel de l'allogreffe de CSH

De nombreux efforts ont été réalisés ces dernières années afin de faciliter l'accès à l'allogreffe de CSH à un plus grand nombre de patients chez qui ce traitement augmente les chances de survie.

Pour les hématologues, l'enjeu actuel est d'améliorer l'accessibilité à des procédures standardisées optimisant l'effet anti-leucémique du greffon pour diminuer les rechutes tout en limitant la maladie du greffon contre l'hôte. Dans ce but, diverses stratégies de modulation pharmacologique et cellulaire des effecteurs immuns d'intérêt ont été élaborées. Historiquement, des protocoles d'allogreffe de CSH avec manipulation des lymphocytes T

cytotoxiques, impliqués dans l'immunité adaptative, ont été étudiés, mais le renforcement de l'effet GVL n'a pu être dissocié d'une aggravation des effets GVH. Parmi les autres effecteurs immuns d'intérêt, les cellules Natural Killer (NK) ont la capacité de tuer les cellules cancéreuses sans sensibilisation primaire et tout en respectant les cellules saines. Cette distinction très intéressante ouvre la voie à l'étude plus approfondie de ces cellules NK dans le but de les utiliser comme outil thérapeutique dans les hémopathies malignes.

Accès au donneur ↑

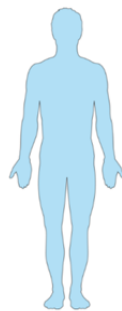
- Greffes haplo-identiques
- Age ≥ 65 ans possible

Indications de l'allogreffe ↑

- Hémopathies réfractaires
- Patients avec comorbidités

Sources du greffon ↑

- CSH du sang périphérique
- Cellules de sang de cordon



PERSISTANCE DES RECHUTES

Solutions

- « Donor Lymphocyte Infusion »?
- Nouvelles immunothérapies?



Toxicités de l'allogreffe ↓

- Conditionnement à intensité réduite

Schéma présentant les améliorations et les enjeux de l'allogreffe de CSH

II. LES CELLULES NATURAL KILLER : CELLULES ANTI-LEUCEMIQUES IDEALES ?

A l'interface entre immunité innée et adaptative, les cellules NK représentent environ 10% des lymphocytes totaux circulants et ont été récemment regroupées au sein des « cellules lymphoïdes innées » (Innate Lymphoid Cells ou ILCs), des effecteurs principalement tissulaires de l'immunité innée.

L'immunité innée est la première ligne de défense de l'organisme constituée d'un ensemble de cellules myéloïdes et lymphoïdes qui mettent en place des mécanismes de défense non spécifiques rapides, immédiatement ou dans les premières heures après l'apparition d'un corps étranger. Dans un second temps, l'immunité adaptative va exercer, grâce aux lymphocytes T et B, une réponse immune « antigène » spécifique. Celle-ci requiert une présentation antigénique plus complexe et plus longue par la reconnaissance d'antigènes spécifiques du « non soi ». Il y a production de lymphocytes « mémoires » qui assurent des réponses futures plus efficaces contre un antigène spécifique (**Figure 6**).

1. Introduction

Les cellules NK ont la particularité d'avoir une morphologie semblable aux lymphocytes sans posséder de récepteur spécifique d'antigène. Elles ont été identifiées en 1975 comme « lymphocytes effecteurs » de par leur capacité à lyser certaines cellules tumorales tout en épargnant les cellules saines¹⁵. Généralement, les cellules NK circulantes vont aller infiltrer les tissus envahis par les cellules malignes après activation par des cytokines¹⁶. Ces cellules activées vont être capables de tuer les cellules cibles par cytotoxicité directe par relargage de granules contenant des enzymes cytotoxiques (perforine et granzymes) et/ou par sécrétion de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IFN- γ ou le TNF- α ³.

a. Phénotype des cellules NK

Phénotypiquement, les cellules NK se définissent par l'absence d'expression du CD3, marqueur de lymphocyte T, et par l'expression du CD56 (CD3- CD56+). De plus, les cellules NK peuvent être divisées en plusieurs sous-groupes ayant des fonctions diverses en fonction de l'expression des marqueurs de surface CD56 et CD16 ou de récepteurs activateurs et

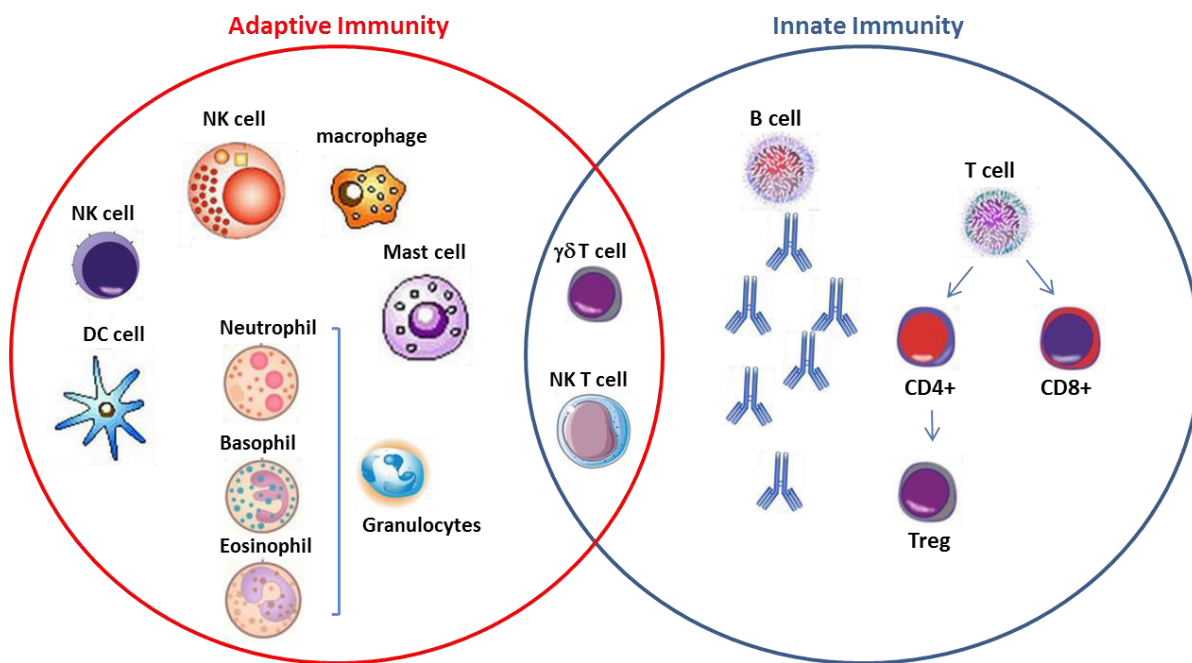


Figure 6: Les différentes populations de l'immunité innée et adaptative.
 (D'après Dranoff *et al.* 2004)

inhibiteurs¹⁷. Initialement, deux populations majoritaires circulantes ont été décrites en fonction de l'expression des marqueurs CD56 et CD16 : les cellules CD56^{bright} CD16- et celles CD56^{dim} CD16+¹⁸. Les cellules NK exprimant fortement le CD56 (CD56^{bright}) et n'exprimant pas le CD16 sont les plus immatures ; elles ont une forte capacité proliférative et sécrétrice de cytokines suite à une stimulation. Phénotypiquement, elles expriment fortement le récepteur inhibiteur NKG2A et ont une faible voire absente expression des récepteurs Killer cell Immunoglobulin-like (KIRs)^{18,19}. La maturation NK est corrélée à une diminution d'expression du CD56, ce qui aboutit à la population circulante majoritaire des cellules NK CD56^{dim}. Au cours de la maturation, les cellules NK perdent leur capacité sécrétrice et proliférative au profit du développement de leurs fonctions cytotoxiques, tout en restant activables par des cytokines^{18,20}. La maturation terminale des cellules NK s'accompagne de l'expression des marqueurs CD57 et Natural Killer Group 2, Member C (NKG2C)²¹.

b. Différenciation et maturation des cellules NK

Depuis leur découverte, il est admis que les cellules NK circulantes CD56^{bright} et CD56^{dim} représentent deux étapes consécutives lors de la différenciation des cellules NK. Plusieurs explications appuient cette hypothèse : tout d'abord, seulement les cellules CD56^{bright} expriment CD117 (c-kit) qui est un marqueur typiquement exprimé sur les cellules hématopoïétiques progénitrices immatures²² ; de plus, la culture de cellules CD34+ en présence d'IL-2 et d'IL-15 favorise le développement *in vitro* de cellules CD56^{bright} CD16-KIR+²³ ; enfin, les premières cellules à se reconstituer en post allogreffe de cellules CD34+ sont les cellules CD56^{bright}²⁴.

Différentes étapes dans la différenciation des cellules NK ont été mises en évidence grâce à l'analyse phénotypique de plusieurs marqueurs de surface incluant CD34, CD45RA, CD117, CD94/NKG2A, CD56, KIR, CD16 et CD57²⁵ (**Figure 7**).

La différenciation des cellules NK est sous la dépendance d'un ensemble de facteurs de transcription et de cytokines dont les principales sont l'IL-2, l'IL-7, l'IL-15 et l'IL-21. Après fixation sur leurs récepteurs, elles vont activer des voies de signalisation intracellulaires telles que la voie Janus tyrosine Kinase (JAK)-STAT, la voie Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K)-Akt ou encore la voie Mitogen Activated Protein Kinase (MAPK)²⁶ (**Tableau 1**).

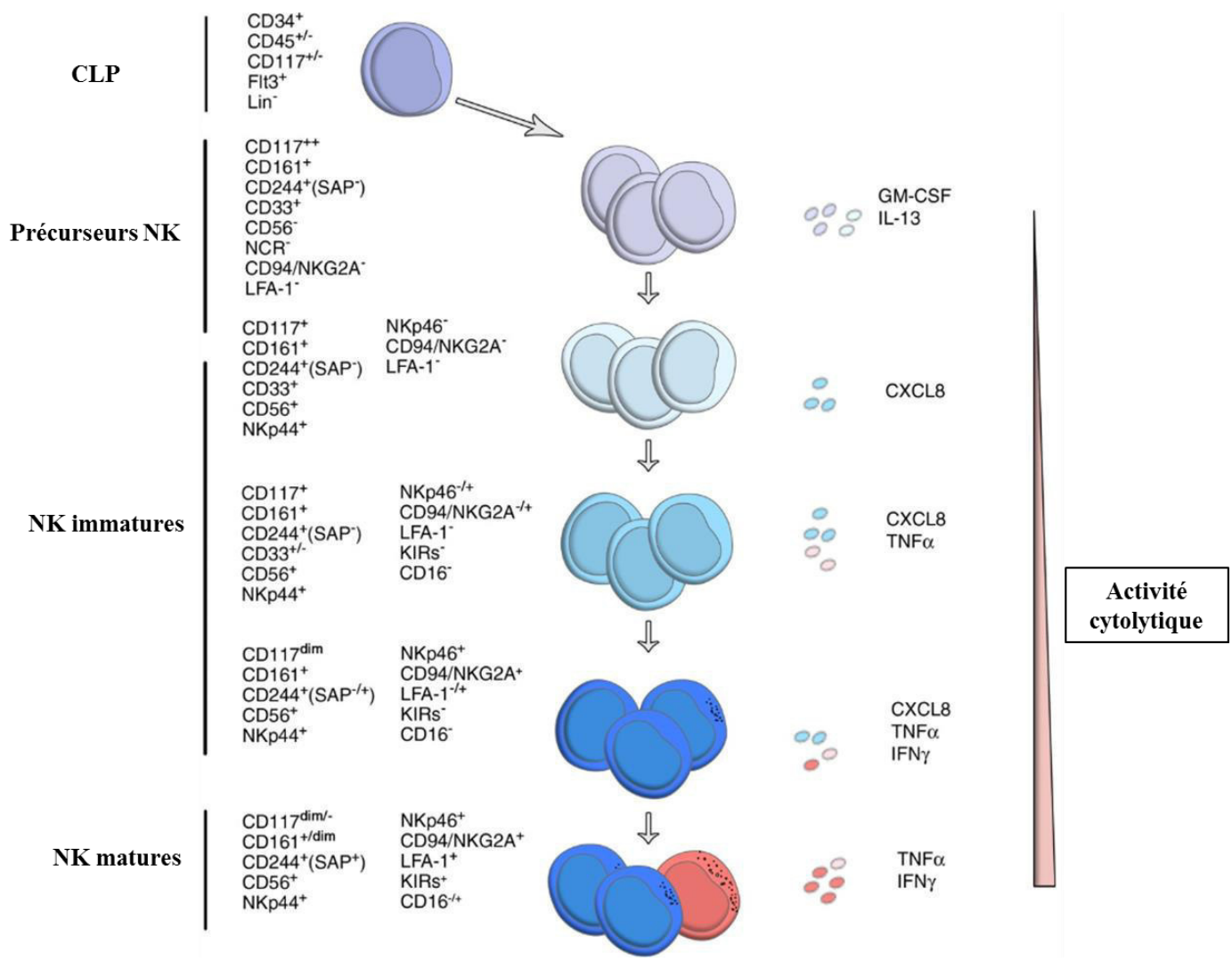


Figure 7: Etapes de différenciation et maturation des cellules NK.

(Montaldo *et al.* 2013)

Cytokine	Source	Voie de signalisation	Fonction
IL-2	Lymphocytes T	JAK 1/3 STAT 3/5 MAPK	Production de cytokines Prolifération Survie Renforcement cytotoxicité
IL-7	Cellules stromales	JAK 1/3 STAT 5	Développement de cellules NK Prolifération
IL-12	Cellules dendritiques Macrophages	JAK2 / TYK2 STAT 3/4/5	Différenciation Prolifération Survie Renforcement cytotoxicité
IL-15	Cellules dendritiques Macrophages Cellules stromales	JAK 1/3 STAT 3/5 MAPK	Production de cytokines Prolifération Survie Renforcement cytotoxicité
IL-18	Cellules dendritiques Macrophages	MyD88 MAPK NF-KB	Production de cytokines Prolifération
IL-21	Lymphocytes T	JAK 1/3 STAT 1/3/5	Différenciation Production de cytokines (IFN- γ) Renforcement cytotoxicité Limite la prolifération

Tableau 1 : Principales cytokines régulant la différenciation et les fonctions des cellules NK. (D'après Marçais *et al.* 2013)

2. Les fonctions des cellules NK

a. Activation des cellules NK

Les cellules NK jouent un rôle clé dans l'immunosurveillance contre des cellules cibles infectées ou tumorales par cytolyse directe via la sécrétion de perforine et granzymes, les récepteurs de mort cellulaire (Fas, TRAIL) et/ou la cytotoxicité dépendante des anticorps (ADCC)²⁷. Pour être capable de reconnaître ces cellules cibles à éliminer, les cellules NK doivent d'abord être "éduquées" par le soi puis activées et "primées" par les cytokines de l'environnement. L'éducation passe par l'interaction entre les récepteurs inhibiteurs présents à la surface des cellules NK avec des molécules du CMH de classe I. Ce contact avec le "soi" est déterminant pour permettre à la cellule NK d'être fonctionnelle face à des cellules n'exprimant pas de molécules du CMH de classe I. De plus, la capacité des cellules NK à être activées et à tuer des cellules cibles est déterminée par une balance entre les récepteurs activateurs et les récepteurs inhibiteurs exprimés à leur surface²⁸. En condition physiologique, les cellules NK reconnaissent les molécules du soi par leurs récepteurs inhibiteurs, ce qui empêche la lyse de la cellule normale et l'auto réactivité. Dans des conditions pathologiques (stress, infection, transformation tumorale), la cellule cible peut sous-exprimer le CMH («missing-self»), et sur-exprimer des ligands activateurs («induced-self»), entraînant une diminution des signaux inhibiteurs relativement aux signaux activateurs reçus par la cellule NK (**Figure 8**). Ce mécanisme d'activation des cellules NK en fait un outil thérapeutique très intéressant en contexte de greffe allogénique de CSH. En effet, la levée d'inhibition liée au mésappariement entre les récepteurs inhibiteurs et leurs ligands du système CMH de classe I est pleinement exploitée dans les greffes dites « KIR-mismatch » (voir chapitre II.4.c).

En dehors de l'activation par les cellules tumorales, les cellules NK peuvent aussi recevoir des signaux de la part d'autres cellules immunes comme les cellules dendritiques, les monocytes et macrophages, les lymphocytes T... En effet, les cellules dendritiques, par la sécrétion d'IL-12, d'IL-15 et d'IFN de type I, régulent la prolifération et l'activation des cellules NK. De plus, les lymphocytes T CD4+ contribuent à la survie et à la prolifération des cellules NK grâce à la sécrétion d'IL-2, cytokine essentielle à la fonctionnalité de ces cellules²⁹.

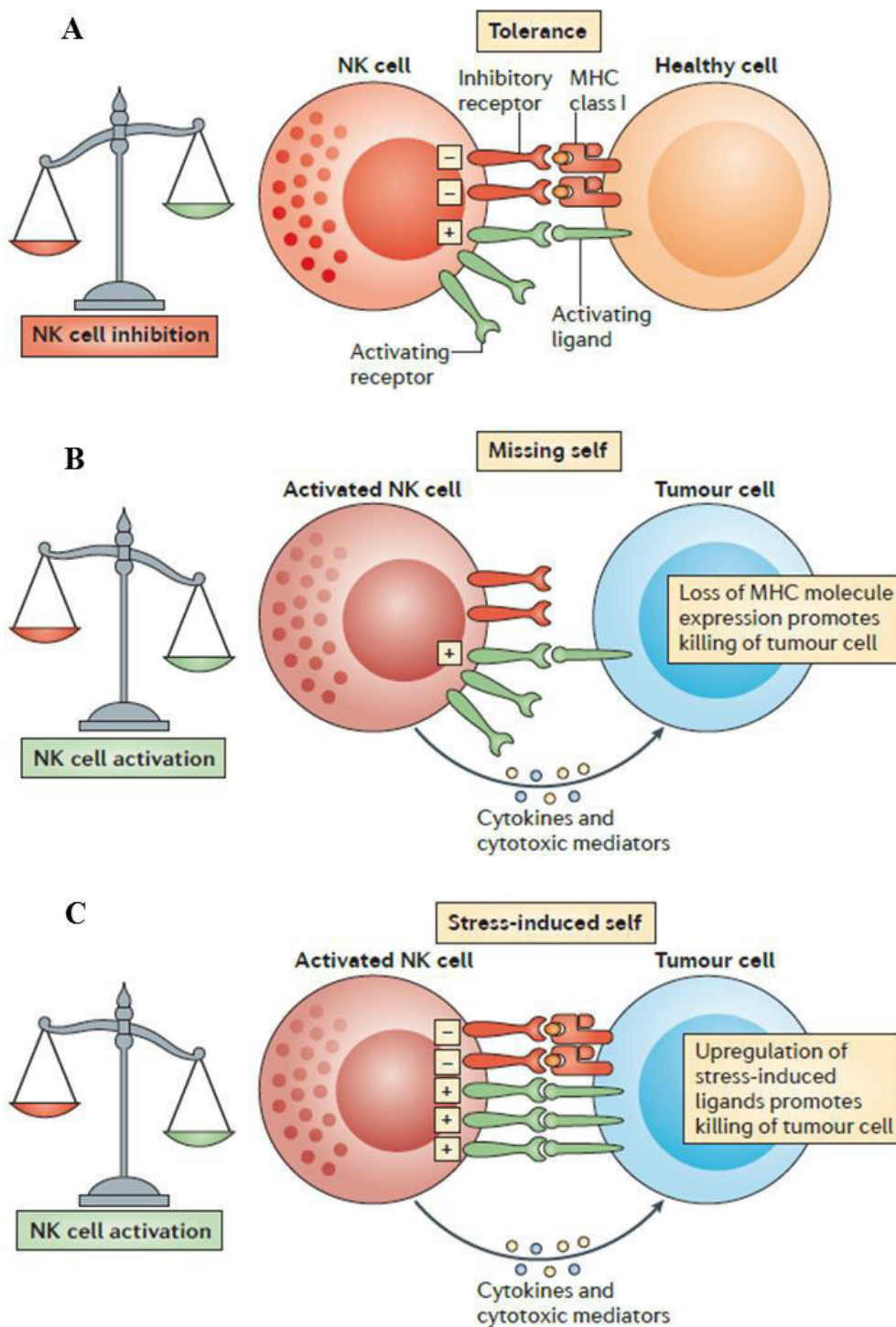


Figure 8: Mécanismes d'activation des lymphocytes NK.

(Morvan et Lanier 2016; Vivier *et al.* 2012)

(A) La balance de signaux délivrés par les récepteurs activateurs et inhibiteurs régule la reconnaissance des cellules saines par les NK.

(B) Les cellules tumorales qui sous expriment le complexe majeur d'histocompatibilité CMH de classe I sont détectées comme « non soi » et lysées par les NK.

(C) Les cellules tumorales peuvent sur exprimer des ligands induits par le stress, qui sont reconnus par les récepteurs activateurs NK, et qui surpassent les signaux inhibiteurs, entraînant la lyse de la cellule cible.

b. Cytotoxicité et activité immunorégulatrice des cellules NK

Une fois activée, la cellule NK va pouvoir tuer directement la cellule tumorale dans un processus appelé "apoptose" médié par divers mécanismes dont l'exocytose de granules cytotoxiques contenant de la perforine et des granzymes, la voie de signalisation des récepteurs de mort de la famille du TNF comme FAS (CD95) ou TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand (TRAIL), la sécrétion de cytokines IFN- γ et TNF- α et l'ADCC via le récepteur CD16³⁰. L'expression du CD107a à la surface des cellules NK a été décrite comme un signe de dégranulation et ce marqueur est surexprimé après stimulation des cellules³¹. A côté de cet effet direct, les cellules NK sont capables d'initier une réponse immune anti-tumorale, et d'agir à leur tour comme des cellules régulatrices, via la sécrétion de cytokines (IFN- γ , TNF- α , IL-10, GM-CSF...) et chimiokines (MIP-1a, MIP-1b, IL-8, RANTES)^{32,33} (**Figure 9**).

L'IFN- γ a surtout une action régulatrice sur la réponse immunitaire³⁴ alors que le TNF- α présente une double action de cytotoxicité directe par le biais de l'apoptose médiée par la caspase-8 et de régulation immune par activation de la maturation des cellules dendritiques³⁵.

3. Les récepteurs des cellules NK

La maturation des cellules NK passe par l'acquisition d'un certain nombre de ces récepteurs permettant de réguler les fonctions effectrices des cellules NK. Ces molécules peuvent être classées en plusieurs groupes : les récepteurs inhibiteurs, les récepteurs activateurs, les molécules d'adhésion et les récepteurs aux chimiokines et cytokines³⁶ (**Figure 10**). C'est l'intégration de l'ensemble de ces signaux par la cellule NK qui va déterminer son état d'activation.

a. Les récepteurs inhibiteurs

Les cellules NK présentent à leur surface plusieurs récepteurs inhibiteurs dont l'hétérodimère CD94/NKG2A, les récepteurs KIR inhibiteurs, le récepteur Lymphocyte-Activation Gene 3 (LAG3), T cell Immunoglobulin ITIM domain (TIGIT), T-cell Immunoglobulin and Mucin-domain containing-3 (TIM-3), Programmed cell Death 1 (PD-1), Immunoglobulin-Like Transcript-2 (ILT-2), Leukocyte-Associated Immunoglobulin-like Receptor 1 (LAIR-1) et Carcinoembryonic Antigen-related Cell Adhesion Molecule 1

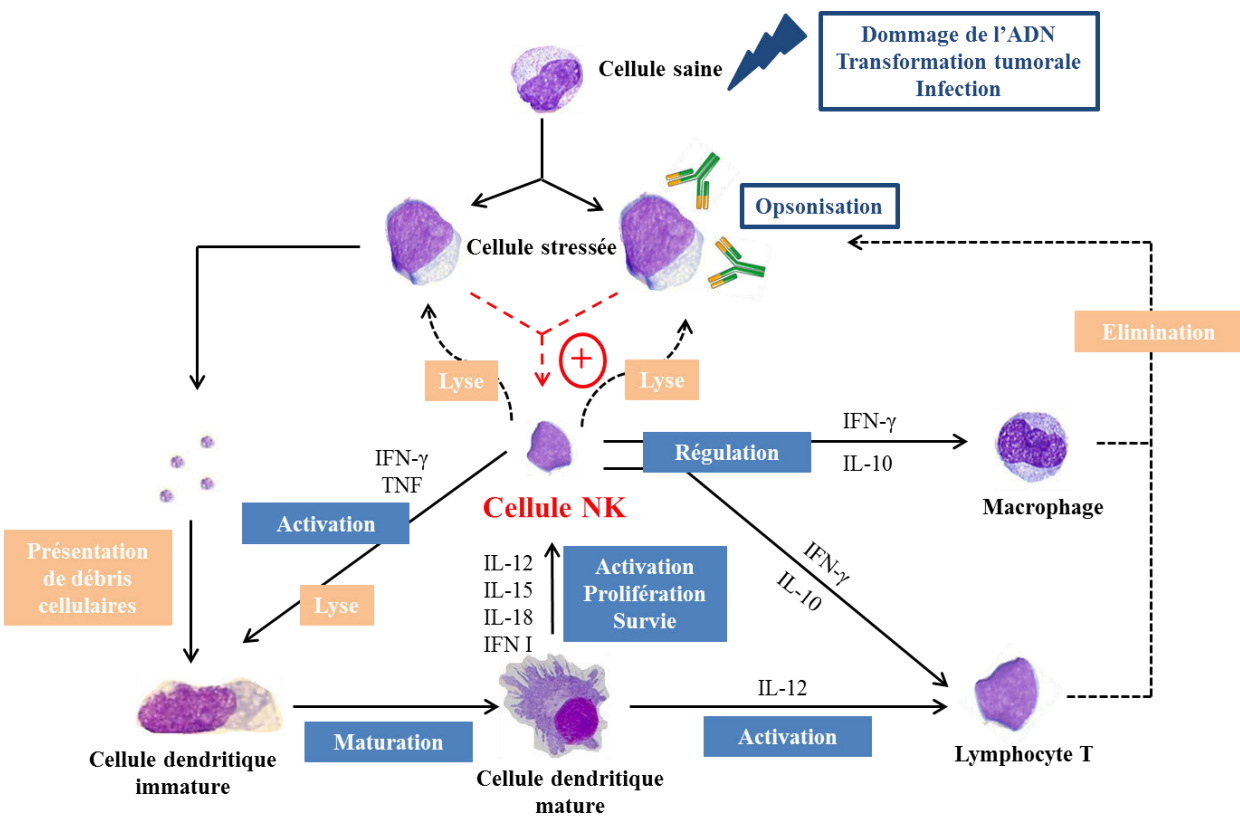


Figure 9: Fonctions des cellules NK et interactions avec les autres cellules immunitaires.
 (D'après Vivier et Ugolini, 2010)

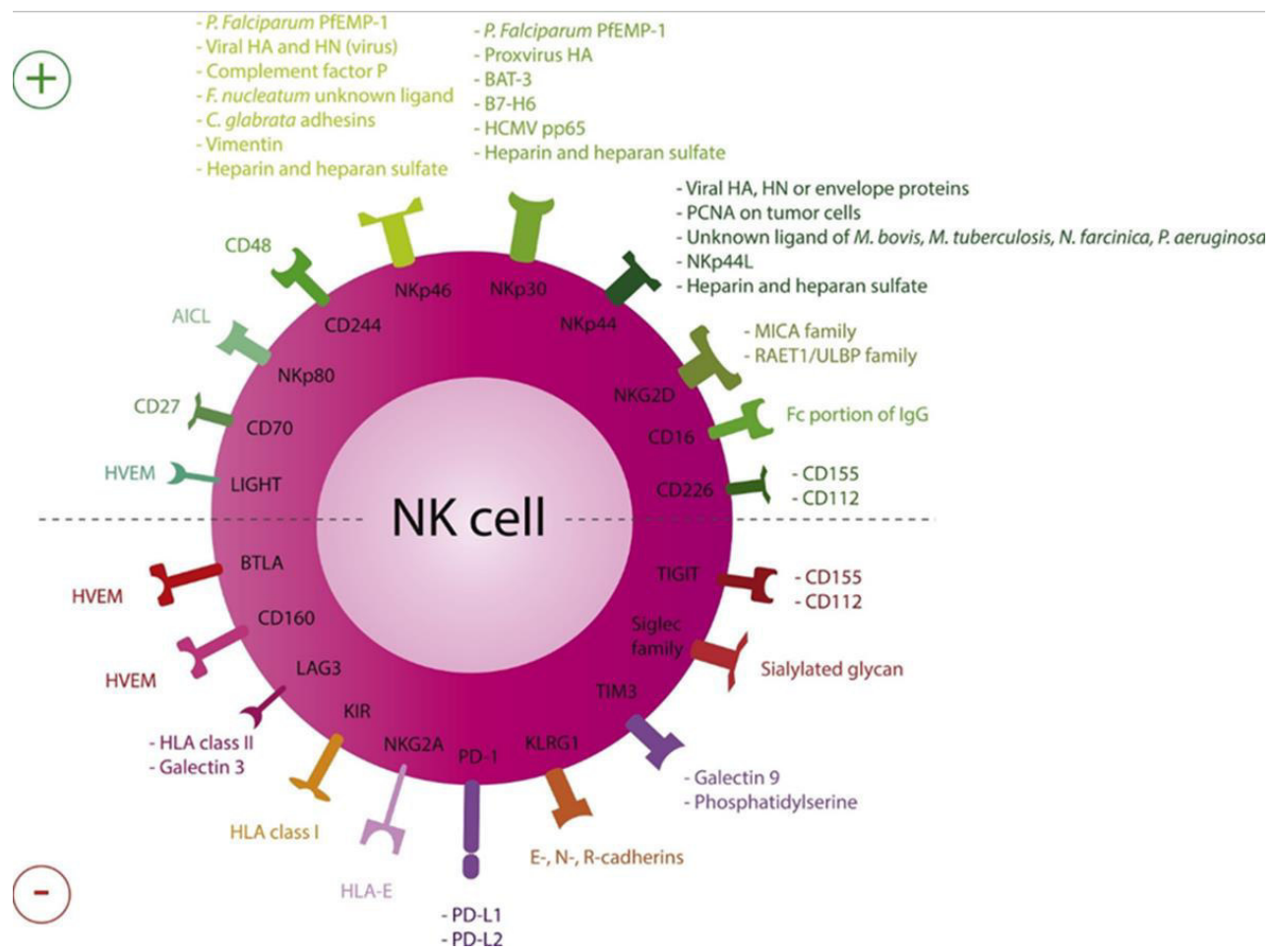


Figure 10 : Ensemble des récepteurs des cellules NK (Chiossone et al. 2017).

(CEACAM1)³⁶ (description détaillée au chapitre IV.1.a). Parmi eux, les récepteurs NKG2A et KIR sont les récepteurs inhibiteurs principaux ayant comme ligands des molécules du CMH³⁷. L'activation des récepteurs inhibiteurs est responsable d'un rétrocontrôle négatif de l'activité cellulaire NK. En effet, la reconnaissance par le récepteur de son ligand sur une cellule cible va entraîner la phosphorylation des résidus tyrosines présents sur les motifs Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibitory Motifs (ITIMs) de la partie intracytoplasmique des récepteurs. Cette phosphorylation permet le recrutement et l'activation des domaines Src Homology 2 (SH2) des phosphatases intracytoplasmiques SHP-1 et SHP-2. Ces phosphatases vont alors déphosphoryler certaines molécules spécifiques de la cascade de signalisation en aval des récepteurs et inhiber l'activation cellulaire NK³⁸.

b. Les récepteurs activateurs

Les cellules NK expriment un nombre important de récepteurs activateurs, souvent non spécifiques, dont la liaison à leurs ligands engendre un signal d'activation intracellulaire et initie les fonctions effectrices des cellules NK. Les principaux récepteurs activateurs sont les Natural Cytotoxicity Receptors (NCRs), Natural Killer Group 2 member D (NKG2D), DNAX Accessory Molecule-1 (DNAM-1), CD16 (Fcγ RIII), 2B4 et les récepteurs activateurs KIR³⁷.

NCRs

Les NCRs sont des récepteurs activateurs appartenant à la superfamille des immunoglobulines et exprimés quasiment exclusivement par les cellules NK. Chez l'homme, trois NCRs ont été décrits : NKp46 (NCR1 ou CD335) et NKp30 (NCR3 ou CD337) sont exprimés par l'ensemble des cellules NK du sang périphérique alors que NKp44 (NCR2 ou CD336) est surtout exprimé sur les cellules NK après stimulation par de l'IL-2²⁴. Contrairement aux ligands d'origine infectieuse, les ligands tumoraux des NCRs restent encore mal connus. Bien que l'implication directe de NKp46 dans l'éradication de cellules tumorales soit prouvée, les ligands tumoraux de ce récepteur activateur restent, à ce jour, indéterminés.

Concernant NKp30, il initie l'activité cytotoxique des cellules NK par liaison avec l'antigène tumoral B7-H6⁴¹ et HLA-B Associated Transcript 3 (BAT3), également appelé Bcl-2 Associated Athanogene 6 (BAG6)⁴². Quant au récepteur NKp44, il reconnaît l'antigène Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA), un ligand intracellulaire surexprimé par les

cellules tumorales et qui a étonnamment un effet inhibiteur⁴³. Un autre ligand de NKp44, appelé NKp44-L, qui correspond partiellement à la séquence de la protéine Mixed-Lineage Leukemia (MLL5), a été identifié principalement sur des blastes de LAM⁴⁴. Les NCRs constituent le mode d'activation principal des cellules NK leur permettant de tuer les cellules cibles. Par conséquent, l'altération par les cellules tumorales des NCRs ou de leurs ligands est un mécanisme bien décrit d'échappement à l'immunosurveillance des cellules NK (voir chapitre II.4.b)⁴⁵⁻⁴⁷.

NKG2D

NKG2D est un des récepteurs activateurs le plus important des cellules NK qui va reconnaître des ligands activateurs dont les molécules MICA et MICB (MHC class-I-Chain-related proteins A et B) et jusqu'à six protéines ULBPs (UL16-Proteins). Ces ligands ne sont pas ou très peu exprimés par les cellules normales mais sont surexprimés par des cellules malignes, infectées ou en situation de stress cellulaire important³⁹. Ce récepteur de type lectine C est aussi présent à la surface des lymphocytes T CD8+ et T $\gamma\delta$ et joue un rôle important pour ces cellules⁴⁰.

CD16

Le CD16 est un récepteur de faible affinité au fragment Fc des IgG et est exprimé à la surface des cellules NK, des polynucléaires neutrophiles, des cellules dendritiques, des monocytes et des macrophages. Une autre forme de cytotoxicité, nommée ADCC, est dépendante des anticorps fixés à des antigènes sur la cellule cible et met en jeu le récepteur CD16 sur la cellule NK qui reconnaît la partie constante de l'anticorps⁴⁸.

DNAM-1

DNAM-1 (CD226) est un récepteur activateur de la superfamille des immunoglobulines exprimé, entre autre, par les cellules NK et les lymphocytes T CD8+. DNAM-1 reconnaît deux ligands appartenant à la famille des nectines: le récepteur au poliovirus (PVR) et la nectine-2 présents sur différents tissus sains et cellules tumorales⁴⁹.

4. L'immunosurveillance anti-tumorale par les cellules NK

a. Place des cellules NK en oncologie

Depuis quelques années, les connaissances sur la biologie du cancer ont été révolutionnées. Les cellules tumorales développent des caractéristiques particulières en faveur de leur prolifération, de leur survie et de leur dissémination, mais aussi d'échappement au système immunitaire⁵⁰ (**Figure 11**). Cette dernière particularité a été plus largement décrite dans les cancers solides avec la théorie des « 3E ». L'immunoediting est un processus dynamique pouvant être décomposé en trois phases : l'élimination, l'équilibre et l'échappement⁵¹. Durant la phase d'élimination, les cellules NK de l'immunité innée et les lymphocytes T CD8+ et $\gamma\delta$ de l'immunité adaptative agissent en synergie pour détruire les cellules transformées. L'élimination est ainsi un processus continu empêchant le développement de cancer. En revanche, de rares clones peuvent échapper à l'élimination et entrent alors en phase d'équilibre. Lors de cette phase, les interactions entre cellules immunes lymphocytaires T et cellules tumorales en dormance induisent une modification de l'immunogénicité des cellules tumorales. La pression de sélection aboutit à l'émergence de clones tumoraux ayant acquis des mutations leur permettant d'échapper à l'immunosurveillance. Devenus insensibles aux effecteurs immuns, ces clones peuvent alors induire un état d'immunosuppression au sein du microenvironnement tumoral. Il s'agit de la phase d'échappement, avec une forte progression tumorale et qui implique certaines populations immunosuppressives, comme les lymphocytes T régulateurs (T reg) ou les cellules myéloïdes suppressives (MDSC)⁵².

Chez l'homme, les cas de déficiences sélectives des cellules NK sont rares et il est difficile d'évaluer le rôle de ces cellules sur l'incidence des cancers. Néanmoins, plusieurs études ont montré un lien entre une faible activité des cellules NK dans le sang périphérique et une augmentation du risque de cancer⁵³.

A l'inverse, l'équipe Immunité et Cancer (Pr D. Olive) ainsi que la plateforme d'Immunomonitoring du Centre de Recherche en Cancérologie de Marseille (CRCM) ont mis en évidence des altérations phénotypiques et fonctionnelles de ces cellules NK chez des patients de l'Institut Paoli Calmettes (IPC) atteints de différents types de cancers.

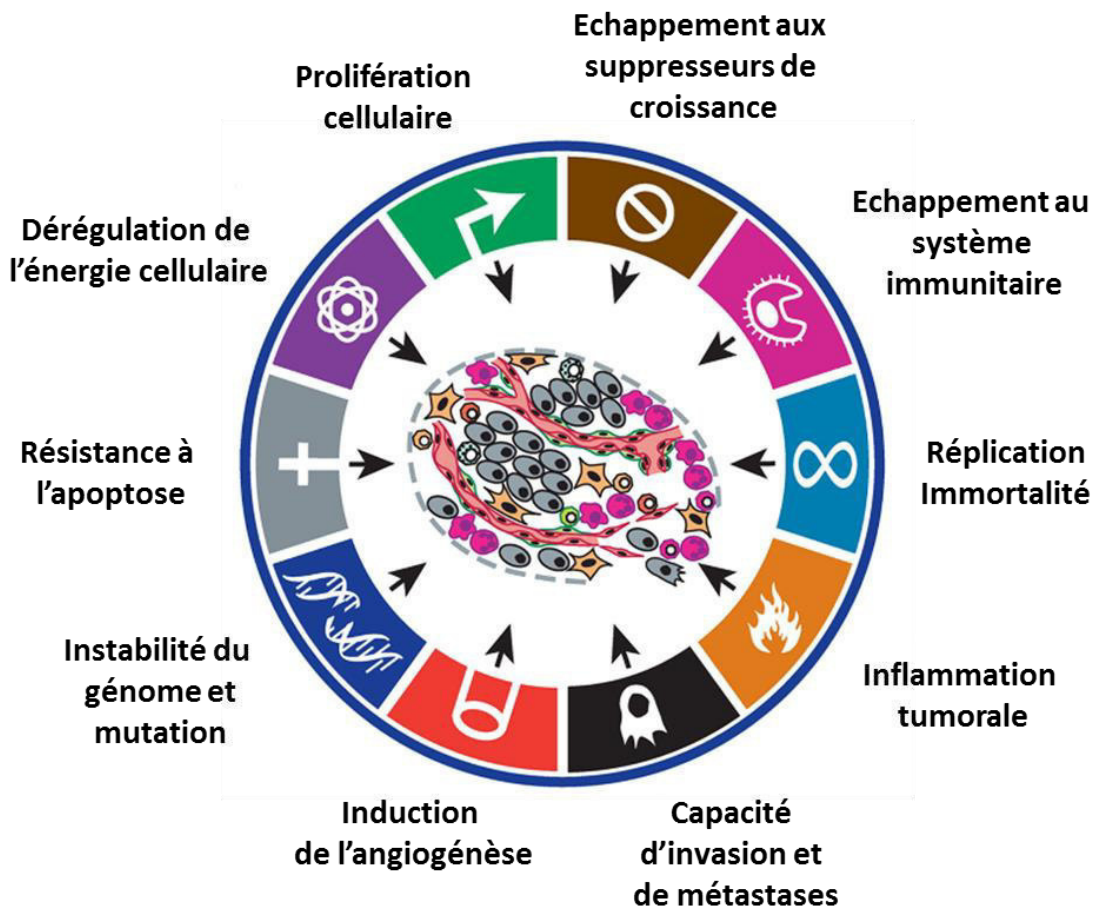


Figure 11 : Caractéristiques des cellules cancéreuses (D'après Hanahan et Weinberg 2011).

En oncologie solide

Mamessier *et al* s'intéressent à la relation entre les cellules NK et la progression tumorale dans le cancer du sein. En 2011, ils étudient le phénotype et la fonction de cellules NK du sang périphérique et infiltrant la tumeur dans trois groupes de patients : un groupe contrôle formé de donneurs sains (nommé « HD ») ou de patientes ayant une tumeur bénigne (nommé « B »), un groupe de patientes atteintes de tumeurs non invasives (nommé « Tis ») et un groupe de patientes atteintes de tumeurs invasives allant du stade localisé (nommé « LOC »), localisé avancé (nommé « LA »), jusqu'au stade métastatique (nommé « M »). Ils mettent en évidence, dans le groupe des tumeurs invasives, une diminution des récepteurs activateurs des cellules NK NKp30, NKG2D, DNAM-1, 2B4 et CD16 et une augmentation du récepteur inhibiteur NKG2A, par rapport au groupe de tumeurs non invasives et contrôle. De plus, ce degré d'altération des cellules NK progresse avec le stade de la tumeur et corrèle avec une baisse des fonctions de ces cellules, notamment leur cytotoxicité ⁵⁴ (**Figure 12**). D'autres travaux font le lien entre la sécrétion par le microenvironnement tumoral de facteurs inhibiteurs tels que TGFβ1 et les défauts des cellules NK, afin d'échapper à l'immunité innée NK ⁵⁵.

En parallèle, l'étude d'autres cancers a montré des défauts des cellules NK, notamment chez des patients atteints de cancers de la prostate. En effet, Pasero *et al* mettent en évidence une expression plus importante de NKp30 et NKp46, associée à une meilleure cytotoxicité des cellules NK, chez les patients ayant une plus grande période de résistance à la castration et une meilleure survie globale ⁵⁶.

En onco-hématologie

Depuis 2002, l'étude des cellules NK de plusieurs cohortes successives de patients atteints de LAM a mis en évidence des altérations immunes profondes, à la fois phénotypiques et fonctionnelles. En 2002, Costello *et al* exposaient leurs résultats sur 18 patients atteints de LAM et montraient que 16 patients présentaient un phénotype NCR^{dull} avec une faible expression de NKp46, NKp30 et NKp44, comparé aux volontaires sains, tous NCR^{bright}. Ils confirment que ces altérations d'expression des NCR se traduisent par un défaut de cytotoxicité NK contre les blastes leucémiques ⁵⁷. En 2007, Fauriat *et al* montrent que ces altérations sont induites par les cellules leucémiques. Un des mécanismes d'échappement au système immunitaire pourrait être une induction du phénotype NCR^{dull} par les cellules leucémiques, mais il en existe probablement d'autres, notamment chez les patients n'ayant

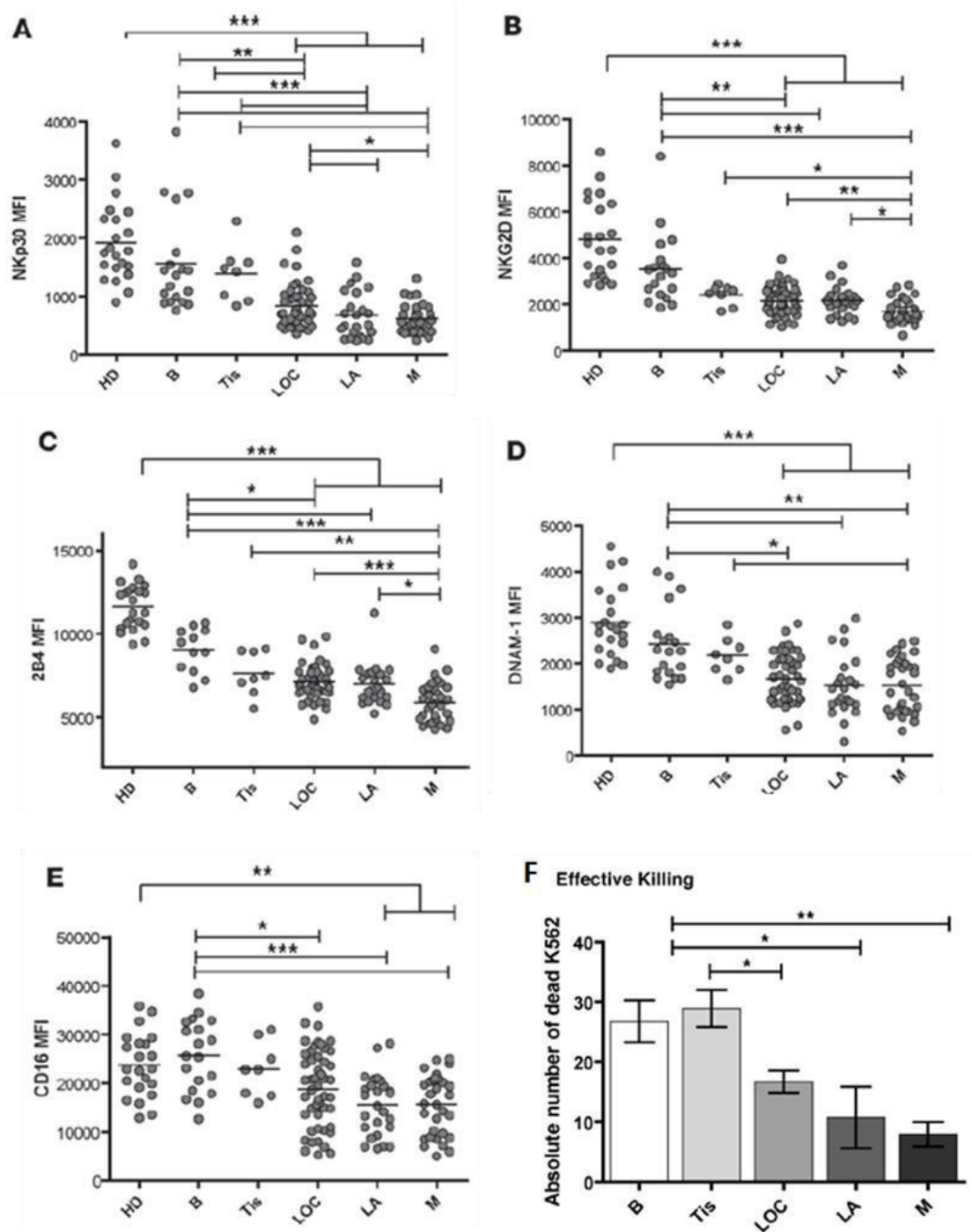


Figure 12: Altérations du phénotype et de la fonction des cellules NK du sang périphérique de patientes atteintes de cancers du sein de différents stades au diagnostic.

Les graphes A à E comparent l'intensité de la médiane de fluorescence (MFI) de l'expression de différents récepteurs activateurs des cellules NK entre les stades de cancer et un groupe contrôle. Récepteurs activateurs: (A) NKp30 (MFI); (B) NKG2D (MFI); (C) 2B4 (MFI); (D) DNAM-1 (MFI); (E) CD16 (MFI). Groupes: **HD** Donneurs sains; **B** Tumeurs bénignes; **Tis** Tumeurs non invasives; **LOC** Tumeurs invasives localisées; **LA** Tumeurs invasives localisées au stade avancé; **M** Tumeurs invasives métastatiques. Pour chaque nuage de points, la barre horizontale représente la valeur moyenne. Le graphique F montre le nombre de cellules cibles K562 mortes suite à l'interaction avec les cellules NK de patients des groupes indiqués.

Les analyses statistiques utilisent un test non paramétrique non apparié de Mann-Whitney $*P < 0.05$; $**P \leq 0.005$; $***P \leq 0.0005$ (Mamessier *et al.* 2011).

pas d'altération des NCR. Afin de confirmer les résultats de Costello *et al*, Fauriat *et al* réalisent en 2007 une étude prospective du phénotype NK de 71 autres patients atteints de LAM et suivis à l'IPC entre 2002 et 2005⁴⁶. La survie de ces 71 patients et de ceux présentés dans l'étude de Costello *et al*. a été analysée en fonction de leur phénotype NKp30 ou NKp46 au diagnostic. L'analyse multivariée a permis d'établir une association significative entre l'expression des NCR et la survie, indépendante de l'âge, du sexe, de la formule leucocytaire, de la rechute, et des anomalies cytogénétiques. La probabilité de survie à 5 ans des patients ayant un phénotype NKp30^{bright} est de 60%, et chute à 33% pour le phénotype NKp30^{dull}. Les patients ayant un phénotype NKp46^{bright} ont une probabilité de survie à 5 ans de 72%, contre 28% seulement avec un phénotype NKp46^{dull} (**Figure 13**). Une faible expression des NCR au diagnostic est donc associée à une moins bonne survie des patients. Ces résultats prometteurs ont fait l'objet d'une validation ultérieure, d'une part sur une cohorte prospective de 2007 à 2012 à l'IPC incluant 115 patients tous groupes pronostiques confondus, et d'autre part dans le cadre de l'essai clinique prospectif multicentrique randomisé LAM2006IR du Groupe Ouest Est d'Etude des Leucémies Aiguës et autres Maladies du Sang (GOELAMS), sur une cohorte de 86 patients, tous classés dans le groupe cytogénétique de pronostic intermédiaire^{47,58}. Chrétien *et al*. ont mis en évidence l'utilité du NCR NKp30 comme marqueur immun pronostique au diagnostic. En effet, chez les patients du groupe intermédiaire de l'European Leukemia Net², la présence d'un phénotype NKp30^{high} est significativement associée à une amélioration de la survie globale et de la survie sans rechute, indépendamment des autres facteurs, et même du traitement par allogreffe post-rémission (**Figure 14**).

Ce travail robuste, réalisé sur plusieurs années, a confirmé le rôle clé des cellules NK dans l'immunosurveillance des hémopathies malignes. En parallèle de ces travaux, d'autres équipes se sont plus particulièrement intéressées à l'étude des cellules NK en contexte d'allogreffe de CSH. La découverte de cellules NK alloréactives, présentes au sein de greffons provenant de donneurs HLA identiques et déplétés en lymphocytes T, a soulevé la notion de cellules « KIR-mismatch »⁵⁹. Le développement de greffes KIR-mismatch favorise l'alloréactivité des cellules NK du greffon. Cela se traduit par un pouvoir GVL plus fort permettant de réduire les rechutes en post allogreffe. Simultanément, d'autres études ont été menées sur la reconstitution des cellules NK en post allogreffe de CSH et sur l'impact de leurs anomalies qualitatives et/ou quantitatives sur la survie des patients.

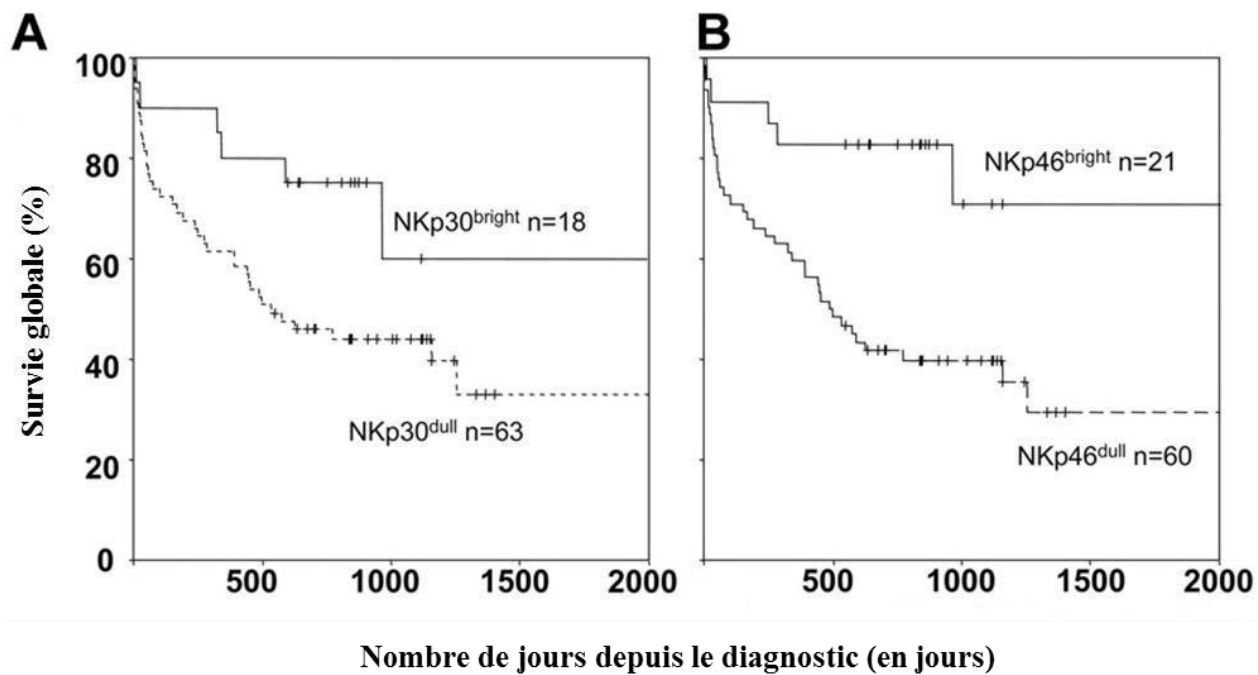


Figure 13: Courbe de survie en fonction du phénotype des NCR des cellules NK au diagnostic.

Survie globale en fonction du phénotype NKp30 (NKp30^{bright}/NKp30^{dull}) (A) et survie globale en fonction du phénotype NKp46 (NKp46^{bright}/NKp46^{dull}) (B). n correspond au nombre de patients dans chaque branche (Fauriat *et al.* 2007).

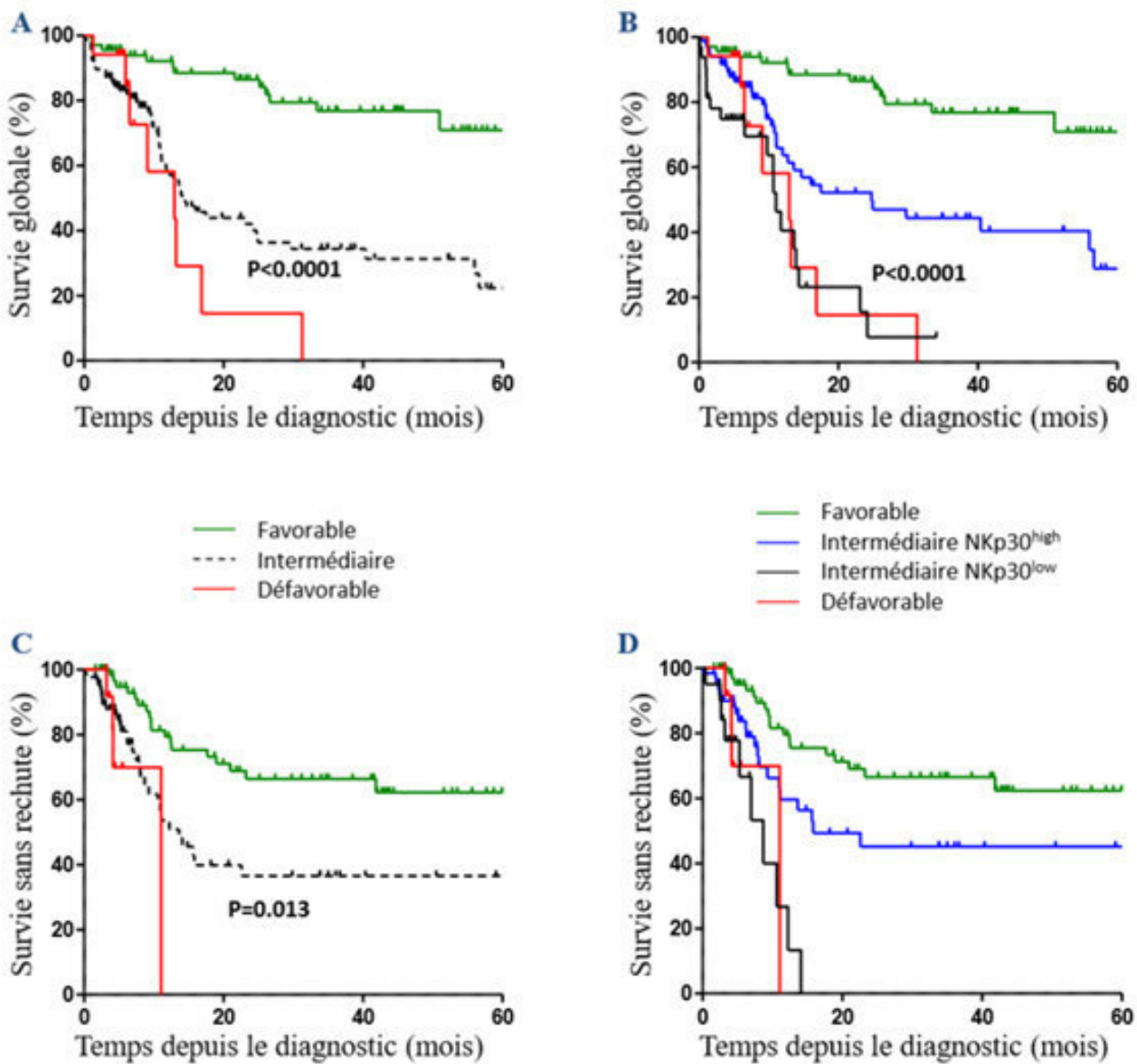


Figure 14: Stratification pronostique des patients des cohortes GOELAMS et IPC selon l'ELN et le statut NKp30.

Courbes de survie globale (A) et de survie sans rechute (C) des les trois groupes pronostiques, favorable, intermédiaire et défavorable, selon l'ELN 2017. Courbes de survie globale (B) et de survie sans rechute (D) des groupes favorable et défavorable selon l'ELN, avec une stratification du groupe intermédiaire en deux sous-groupes selon le statut NKp30^{high} ou NKp30^{low} (Chretien, Devillier, *et al.* 2017; Chretien, Fauriat, *et al.* 2017).

b. Les cellules NK en contexte d'allogreffe de CSH

Les allogreffes « KIR-mismatch »

Les modèles d'alloréactivité NK reposent sur le principe qu'une sous-population de cellules NK, chez un donneur donné, exprime un récepteur inhibiteur KIR ne reconnaissant aucune molécule HLA de classe I sur les cellules tumorales cibles du receveur. L'absence de reconnaissance du KIR entraîne une levée de l'inhibition de la cytotoxicité NK et permet de tuer la cellule cible. Les gènes codant pour les KIR (localisés sur le chromosome 19) et les gènes codant pour le HLA (sur le chromosome 6) ont une ségrégation indépendante et le répertoire phénotypique KIR d'un individu est régulé par le génotype KIR et non HLA. Il est donc possible pour un individu de ne pas exprimer de KIR spécifique de ses propres molécules HLA, ou à l'inverse de manquer de ligand HLA spécifique de ses propres récepteurs KIR. Le modèle du « ligand manquant » chez le receveur/ « KIR présent » chez le donneur est donc également applicable, en théorie, en situation d'allogreffe HLA identique. C'est ainsi qu'a été décrite une alloréactivité NK, après allogreffe géno-identique T déplétée chez des patients atteints de LAM et dont le typage HLA révélait l'absence d'au moins un ligand C ou B pour les KIR du donneur⁶⁰.

En 2002, l'équipe de Ruggeri montre une meilleure survie sans progression pour des patients atteints de LAM et greffés avec un greffon HLA haplo-identique d'un donneur exprimant des récepteurs KIR dont les ligands CMH de classe I sont absents chez le receveur. De plus, ils présentent une baisse de l'incidence de GVH. La probabilité de survie à 5 ans est de 65% chez ces patients greffés en KIR-mismatch, alors que celle-ci est réduite à 5% pour des patients recevant des CSH indépendamment de leur statut KIR⁶¹. Ce n'est que plus récemment qu'il a été mis en évidence l'impact de l'expression des récepteurs KIR activateurs des cellules NK du greffon sur l'évolution de l'allogreffe. Par exemple, l'existence chez le donneur de CSH d'un génotype KIR2DS1 et KIR2DS2 positifs est associé à une baisse du taux de rechute chez un receveur HLA identique⁶². Les greffons de donneurs KIR3DS1 positif sont quant à eux caractérisés par une moindre mortalité et incidence de GVH de grade II-IV chez leurs receveurs⁶³.

La plus grande efficacité clinique de ces greffes KIR-mismatch a fait prendre conscience non seulement, de l'importance de l'alloréactivité NK du greffon, mais aussi de la quantité de cellules NK alloréactives au sein de ce greffon.

La reconstitution des cellules NK suite à l'allogreffe de CSH

Après allogreffe de CSH, les fonctions du système immunitaire sont assurées, à la fois par les cellules immunes matures directement présentes au sein du greffon, mais aussi par de nouvelles cellules reconstituées à partir de la nouvelle moelle osseuse greffée. La restitution d'un système immunitaire mature et compétent est un processus lent qui se déroule en plusieurs temps ; l'immunité innée est la première à se reconstituer, dans les premières semaines après la greffe, suivie par l'immunité adaptative dont la reconstitution complète et efficace peut prendre jusqu'à deux années ⁶⁴.

Les cellules NK sont les premières cellules lymphocytaires à se reconstituer à partir du greffon et la rapidité de cette reconstitution est corrélée à une meilleure réponse post greffe ⁶⁵. Cependant, bien que la quantité optimale de cellules NK soit atteinte au bout d'environ un mois, la maturation et la fonctionnalité de ces cellules ne sont complètes que 6 mois à 1 an suivant la greffe. La reconstitution qualitative des cellules NK dépend du type de donneur, de la pathologie responsable de l'indication d'allogreffe et de la présence ou non de GVH. De plus, il est difficile de faire la part des choses entre la fonctionnalité issue des cellules NK matures présentes au départ dans le greffon et celle des cellules NK produites secondairement à partir des CSH greffées ⁶⁶.

En résumé, la reconstitution précoce du compartiment NK est caractérisée par un fort pourcentage de cellules CD56^{bright} (40 à 60% des cellules dans les premiers mois suivant la greffe), une expression forte de NKG2A (environ 90%), une expression faible des KIR et variable des récepteurs NCR, et une fonction cytotoxique diminuée. Après les six premiers mois post greffe, le répertoire des récepteurs et les fonctions sont progressivement restaurés par différenciation des cellules NK CD56^{bright} en cellules matures CD56^{dim}. Celles-ci sont caractérisées par la décroissance de l'expression de NKG2A et l'augmentation des NCR, des KIR, du CD16 et du CD57 ⁶⁷. Par conséquent, l'acquisition de ces fonctions effectrices favorise l'effet GVL, ce qui permet de diminuer le contingent de cellules malignes résiduelles, et minimise l'effet GVH grâce à la lyse des cellules présentatrices d'antigènes et des lymphocytes T cytotoxiques ⁶⁸.

Devant l'impact pronostique non négligeable d'une reconstitution rapide et efficace du compartiment NK en post allogreffe de CSH, des traitements ciblant les cellules NK ont été étudiés comme solution d'immunothérapie adoptive en soutien des procédures de greffe (voir partie III).

Objectifs du travail de thèse

Devant le constat d'un nombre encore trop conséquent de patients en rechute après une allogreffe de CSH et face à la preuve de concept clinique que les cellules NK sont dotées d'un pouvoir GVL puissant, il reste toujours à savoir comment l'alloréactivité de ces cellules peut être pleinement exploitée. Une des alternatives est d'infuser chez ces patients des cellules NK d'un donneur sain reconnaissant les cellules leucémiques du receveur. Ainsi l'objectif général de notre étude est d'explorer des stratégies de modulation de l'activité des cellules NK après allogreffe de CSH par manipulation cellulaire et pharmacologique. Dans un premier temps, nous avons travaillé à obtenir des cellules NK fonctionnelles et en nombre conséquent par des techniques de manipulation cellulaire NK par expansion et/ou activation *in vitro*. Une fois ces cellules disponibles, nous avons évalué l'utilisation d'anticorps monoclonaux bloquants dans le contrôle et la restauration des fonctions cytotoxiques NK face à des cellules cibles mimant les cellules leucémiques.

L'ensemble du projet s'inscrit dans le cadre d'une recherche translationnelle impliquant les services de l'IPC et les laboratoires du CRCM et vise à établir des bases précliniques pour le développement de futurs essais cliniques d'immunothérapie adoptive par cellules NK après allogreffe de CSH.

III. 1^{ère} PARTIE :

ACTIVATION ET EXPANSION *EX-VIVO* DE CELLULES NK

1. Différentes approches d'immunothérapies anticancéreuses par les cellules NK

Les connaissances scientifiques sur le système immunitaire ont récemment abouti à des percées sans précédent en immunothérapie. Au XXI^e siècle, les médicaments et les thérapies cellulaires développées pour renforcer l'immunité humorale représentent une composante établie et croissante de la thérapeutique du cancer. Bien que les cellules NK aient longtemps été connues pour avoir des avantages par rapport aux lymphocytes T en terme de capacité à induire des réponses immunitaires de l'hôte indépendantes de l'antigène contre les cellules malignes, leur potentiel thérapeutique a été largement inexploré. La découverte de voies activant et supprimant la fonction des cellules NK, ainsi que de moyens pour sensibiliser les tumeurs à leur cytotoxicité, a conduit au développement de nombreuses méthodes pharmacologiques et génétiques pour améliorer l'action anti-tumorale des cellules NK. Les premières approches thérapeutiques utilisant ces cellules impliquent l'injection de cytokines, d'anticorps monoclonaux et le transfert adoptif de cellules NK manipulées *ex-vivo*. Cela a pour objectif d'améliorer la persistance, l'activation, le nombre de cellules NK ou le ciblage des cellules tumorales par celles-ci.

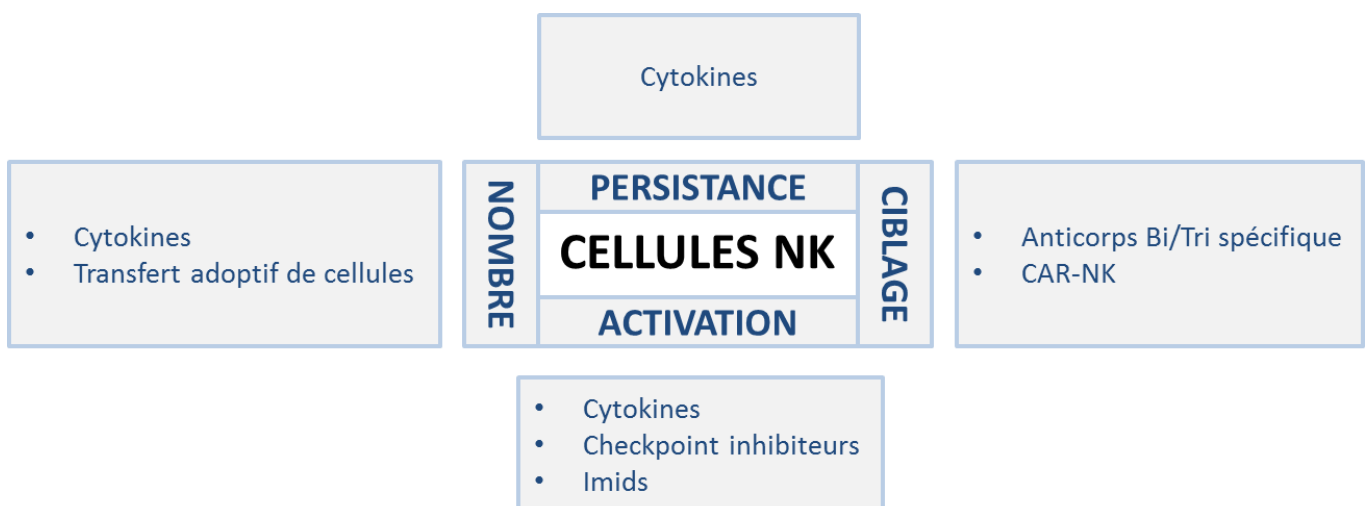


Schéma présentant les différentes immunothérapies anticancéreuses par les cellules NK

a. Cytokines

Plusieurs cytokines ont la capacité de stimuler la prolifération et la fonction des cellules NK de deux façons différentes. Le moyen direct consiste en l'injection *in vivo* de cytokines qui vont alors stimuler les cellules NK autologues. Le second moyen correspond le plus souvent à une étape préliminaire au transfert adoptif de cellules NK. *In vitro*, ces cellules sont incubées avec une ou plusieurs cytokines ayant chacune sa spécificité et favorisant leur activation et/ou expansion.

IL-2

L'IL-2, dont l'utilisation est la première approuvée par l'Agence National de Sécurité des Médicaments (ANSM), est un immunostimulateur capable d'augmenter l'expression des récepteurs activateurs NKp46 et NKG2D via sa liaison à son récepteur présent sur les cellules NK⁶⁹. Celui-ci est composé de deux sous-unités : IL-2R α et IL-2R β . Initialement, l'IL-2 était utilisée pour produire des « Lymphokine-Activated Killer » qui étaient transférés chez le patient accompagnés d'IL-2. Très peu d'effet avait été observé et une des explications à ce manque d'efficacité serait que l'IL-2 active aussi les cellules T dont les lymphocytes T régulateurs exprimant eux aussi le récepteur CD25 (IL-2R α) de haute affinité pour l'IL-2 et ayant un fort pouvoir immunosuppresseur. De plus, une dose élevée d'IL-2 peut provoquer de sévères effets secondaires d'hyperperméabilité capillaire liés à l'activation de l'endothélium vasculaire⁷⁰. Pour pallier à ces inconvénients, diverses stratégies sont étudiées afin de diminuer l'affinité de l'IL-2 pour la sous unité α de son récepteur et ainsi augmenter la sélectivité de l'IL-2 pour les cellules NK. Des modifications sont apportées dans la conformation de l'IL-2 (voir plus loin : l'IL-2 « superkine ») ou bien des protéines de fusion combinant l'IL-2 et un ligand de récepteur activateur des cellules NK, comme NKG2D, sont mises au point⁷¹.

IL-15

L'IL-15 reconnaît un récepteur formé de trois sous-unités α , β et γ et cette cytokine peut être présentée aux cellules NK par l'intermédiaire de monocytes, de macrophages ou de cellules dendritiques. L'IL-15 joue quant à elle un rôle dans la prolifération, la différenciation, la survie et la fonction des cellules T et NK. A faible dose, elle augmente également l'expression de NKp46, NKG2D mais aussi NKp30 et NKG2C⁶⁹. Contrairement à l'IL-2,

l'IL-15 n'active pas les lymphocytes T régulateurs ; elle est en outre utilisée dans de nombreux essais cliniques en phase précoce.

IL-12

L'IL-12 est un hétérodimère ayant une activité pro-inflammatoire en activant la cytotoxicité des cellules NK par sécrétion majorée d'IFN- γ , en favorisant la polarisation des lymphocytes TCD4+ en Th1 et en augmentant l'activité cytolytique des lymphocytes TCD8+⁷². Malgré un effet immunomodulateur intéressant lors des premiers essais cliniques, l'apparition d'une toxicité responsable du décès d'un patient en phase II d'un essai dans le mélanome a entraîné la suspension de l'utilisation de cette cytokine. Des études sont réalisées pour améliorer la pharmacocinétique de l'IL-12 afin de rallonger sa demi-vie pour diminuer les effets secondaires reconnus lors d'administrations répétées⁷².

Autres cytokines

D'autres cytokines dont l'IL-18 et l'IL-21 promeuvent les fonctions des cellules NK lors d'essais précliniques. L'IL-21 possède une homologie de structure avec l'IL-2 et l'IL-15 et augmente principalement la fonction des cellules NK en stimulant la synthèse d'IFN- γ et la cytotoxicité⁷³.

Etant donné l'effet toxique des thérapies par injection de cytokines à doses élevées ou répétées, la recherche se focalise sur des protocoles de combinaison de faibles doses de plusieurs cytokines.

b. Anticorps monoclonaux

Il existe 3 types d'anticorps monoclonaux agissant sur les cellules NK :

- Des anticorps ciblant des antigènes présents sur la tumeur et entraînant un phénomène d'ADCC par les cellules NK.

Un certain nombre d'anticorps thérapeutiques disponibles ciblant les antigènes associés aux hémopathies, comme le Rituximab (anti-CD20) ou le Daratumumab (anti-CD38), vont initier cette ADCC. Des approches de modification de la glycosylation de la partie constante de ces anticorps visent à augmenter l'affinité avec le récepteur CD16 présent sur les cellules NK. Ainsi, l'obinutuzumab, un anti-CD20 faiblement fucosylé a été mis au point pour le traitement de la leucémie lymphoïde chronique⁷⁴.

- Des anticorps bloquants certains récepteurs inhibiteurs de points de contrôle (ou « checkpoints ») immunitaires entraînant la levée de l'inhibition des cellules NK (voir partie V).
- Des anticorps bi ou tri spécifiques permettant à la fois de rediriger et de concentrer la cytotoxicité des cellules NK au niveau des cellules tumorales.

Cette ingénierie permet un lien entre les antigènes associés aux tumeurs et les récepteurs des cellules effectrices. Il existe, par exemple, un anticorps bispécifique CD16 x CD19 qui concentre l'activation des cellules NK au niveau des cellules lymphoïdes B.

c. Transfert adoptif de cellules NK

En situation de post allogreffe de CSH, même si les cellules NK sont les premières cellules lymphocytaires à se reconstituer à partir du greffon, leurs phénotypes et fonctions sont immatures. Les cellules NK retrouvent leur fonctionnalité optimale environ six mois après la greffe⁷⁵. Cette reconstitution précoce suboptimale du compartiment NK semble être responsable d'un effet GVL peu efficace. Dans ce contexte, des protocoles d'activation et d'expansion *ex-vivo* des cellules NK ont été étudiés comme solution d'immunothérapie adoptive en soutien des procédures de greffe lors de la phase de reconstitution immunitaire.

Différentes sources permettant d'obtenir des cellules NK ont été étudiées : à partir de cellules mononuclées du sang périphérique (PBMC), dérivées de cellules souches ou bien directement des lignées cellulaires NK ou des cellules NK génétiquement modifiées.

⇒ Cellules NK issues du sang périphérique

Les PBMC ont l'avantage d'être facilement récoltées par prélèvement sanguin veineux au pli du coude puis séparation sur gradient de ficoll. Les cellules NK représentent 5 à 20% des PBMC; c'est pourquoi il est intéressant d'isoler ces cellules primaires NK afin d'augmenter la pureté. Le principe commun de ces méthodes de séparation consiste en deux étapes utilisant des billes immunomagnétiques : une étape de déplétion des cellules T grâce à des billes cotées par de l'anti-CD3 puis une étape de sélection et d'enrichissement des cellules NK avec des billes cotées par de l'anti-CD56. La déplétion unique en cellules CD3+ aboutit à la présence d'environ 20% de lymphocytes B et monocytes. A l'inverse, une simple sélection par les billes CD56+ engendre la persistance d'un pourcentage de 5% de cellules CD3+ CD56+⁷⁶.

Des premières études de transfert adoptif de cellules NK purifiées autologues, en association à de fortes doses d'IL-2, dans le cadre de patients atteints de cancers métastasés, avaient montré une réponse clinique limitée et de sévères effets secondaires. Les raisons principales de cette faible efficacité étaient l'inhibition des cellules NK infusées par les molécules du CMH de classe I présentes sur les cellules tumorales ainsi que le développement et la fonction non optimales des cellules autologues infusées⁷⁷.

Depuis les nombreux travaux du groupe de Miller sur l'impact de l'alloréactivité NK sur la réponse anti-tumorale et l'avènement des allogreffes KIR-mismatch, des protocoles de transfert adoptif de cellules NK allogéniques ont été mis au point⁷⁸. Ces protocoles consistent à prélever par cytophérèse les cellules NK d'un donneur sain, de les stimuler en culture, puis de les infuser au patient receveur pour favoriser l'effet GVL.

⇒ Cellules NK issues de cellules souches

Grâce à la pluripotence des cellules souches, elles représentent une source intéressante de production de cellules NK. Ces cellules proviennent soit du sang de cordons, soit de cellules souches embryonnaires (ESCs), soit de cellules souches pluripotentes induites (iPSCs). Concernant les unités de sang placentaires, elles ont l'avantage d'être facilement disponibles et de contenir un grand nombre de CSH. En revanche, les cellules NK dérivées de sang placentaire sont immatures et expriment peu de récepteurs inhibiteurs KIR, importants pour l'éducation des NK et l'acquisition de leur pouvoir cytotoxique. De plus, ces cellules NK perdent l'expression du marqueur activateur CD57⁷⁹.

La génération de cellules NK à partir d'ESCs ou d'iPSCs requiert en principe deux étapes : premièrement, les progéniteurs hématopoïétiques CD34+ doivent être générés puis ils sont différenciés en cellules NK (grâce à des cytokines et des cellules stromales murines). Un des avantages majeurs de cette technique est de permettre l'obtention d'un produit cellulaire NK homogène et bien caractérisé. Cette dernière approche très sophistiquée d'expansion cellulaire NK est en cours d'optimisation et semble intéressante principalement dans les cancers solides^{80,81}.

⇒ Lignées cellulaires NK

Les lignées cellulaires NK, telles que KHYG-1, NK-92, NKL, NKG et YT, sont issues de clones cellulaires NK malins. NK-92 est la seule lignée approuvée par la Federation Drug and Administration (FDA) en essai clinique. Ces lignées sont plus faciles à expandre mais

présentent comme limitations cliniques la perte d'expression du CD16 et la persistance *in vivo* longtemps après infusion.

⇒ Cellules NK génétiquement modifiées

Les lignées NK et les cellules NK primaires issues du sang périphérique ou de cellules souches servent de cibles aux modifications génétiques. Ces modifications sont variées et visent à optimiser la persistance *in vivo*, la cytotoxicité ou le « homing » des cellules NK au site tumoral. Suite au succès des cellules T exprimant un récepteur chimérique à l'antigène (CAR), cette technologie a été développée pour les cellules NK afin de favoriser la lyse ciblée de cellules tumorales. Les CAR comprennent un récepteur à l'antigène, un domaine transmembranaire et des domaines intracellulaires de co-stimulation. Contrairement aux cellules T, les cellules primaires NK sont très difficiles à modifier génétiquement par infection par des rétrovirus. Récemment, l'électroporation d'ARNm offre une stratégie alternative efficace. Cette méthode présente l'avantage de ne pas utiliser de vecteurs viraux, ce qui évite des contrôles de biosécurité de haut niveau, des coûts considérables et des délais importants. Les lignées cellulaires NK sont, quant à elles, plus faciles à transfecter par un rétrovirus de type adénovirus ou lentivirus, et cela permet une expression plus stable dans le temps du transgène⁸². Les premiers essais cliniques en cours évaluent pour l'instant des CAR, désignés pour les cellules T, sur des cellules NK issues de PBMC ou de la lignée NK-92. Par exemple, un essai d'infusion de cellules NK haplo-identiques, issues de PBMC, et modifiées grâce à un CAR anti-CD19-41BB ζ est en évaluation dans le traitement de leucémies aiguës lymphoblastiques B réfractaires ou en rechute (NCT 01974479). Une publication très récente présente les avantages de cellules NK issues d'iPSCs présentant un CAR optimisé pour les cellules NK. Il s'agit d'un CAR dirigé contre un antigène de cancer ovarien, contenant le domaine transmembranaire NKG2D et les domaines de co-stimulation 2B4 et ζ CD3. Dans un modèle préclinique, ces cellules survivent et prolifèrent mieux *in vivo* par rapport aux mêmes cellules ne présentant pas de CAR ou à des cellules NK issues de PBMC. L'activité anti-tumorale est aussi améliorée grâce à l'activation de voies intracellulaires effectrices complexes⁸¹.

Protocoles d'activation et d'expansion cellulaire des cellules NK

Les conditions de culture de cellules NK avec une ou plusieurs cytokines comme l'IL-2, l'IL-15 ou l'IL-21 permettent une activation rapide des cellules NK et augmentent leur cytotoxicité *ex-vivo* contre les cellules tumorales⁷⁸. Néanmoins, ces conditions de culture en

présence de cytokines, simples à mettre en œuvre, ont des résultats très modestes en terme d'expansion de cellules. Ainsi, en France, les rares essais cliniques d'infusion de cellules NK activées à partir d'aphérese de donneurs se sont heurtés à des difficultés, notamment l'impossibilité d'évaluer la relation dose/effet en raison de l'insuffisance des cellules NK expansées, et ont conduit à l'arrêt précoce de ces essais (**Tableau 2**). Les récents travaux de thèse d'un étudiant du laboratoire « Immunologie des Tumeurs » du Pr.Olive, concernant la reconstitution immunitaire après infusion de cellules NK en post allogreffe de CSH, dans le cadre d'un essai clinique de phase I mené à l'IPC, suggèrent un manque d'efficacité notable sous le seuil de 5 millions de NK infusées par kg et une augmentation croissante de l'effet des NK avec la quantité infusée (NCT01853358 : données non encore publiées). Dans cet essai débuté en 2013 et incluant 16 patients, les techniques d'activation et d'expansion des cellules NK, prélevées chez le donneur, reposaient sur l'ajout *ex-vivo* d'IL-2 pendant 7 jours. Le ratio d'expansion moyen était de x1,2 et la dose maximale de NK infusées était de 10 millions de NK par kg, atteinte pour seulement un patient. Les résultats d'un essai de phase II réalisé aux USA, d'infusion de cellules NK d'un donneur haplo-identique apparenté, ont montré cette même limite. 8 patients atteints de LAM réfractaires ont été allogreffés par un greffon HLA compatible et reçoivent, environ 7 mois après la greffe, une infusion de cellules NK suivie de 5 doses d'IL-2. La dose moyenne infusée est de $10,6 \times 10^6$ cellules/kg (4,3-22,4). Aucune cellule CD3⁻ CD56⁺ haplo-identique n'a été détectée dans la circulation sanguine d'aucun patient après l'infusion⁸³. Dans un autre essai clinique italien d'infusion de cellules NK alloréactives haplo-identiques KIR ligand mismatch, chez 13 patients atteints de LAM, la dose moyenne infusée était de $2,74 \times 10^6$ cellules/kg⁸⁴.

L'expansion de cellules NK est difficile à maîtriser et requiert de multiples signaux de survie, de prolifération et d'activation. Ainsi, de nombreuses équipes tentent d'optimiser ces méthodes d'expansion, notamment grâce à l'utilisation de cellules supportrices irradiées (appelées en anglais « feeders ») telles que des PBMC allogéniques, des cellules Epstein-Barr Virus-Lymphoblastoid Cell Lines «EBV-LCL» ou la lignée K562 de leucémie myéloïde chronique acutisée déficiente en molécules HLA-I plus ou moins génétiquement modifiée par des ligands activant les cellules NK comme le 4-1 BB (CD137) ou le récepteur membranaire à l'IL-15 ou l'IL-21¹⁷. L'usage de ces cellules de support, en complément de cytokines, augmente considérablement le facteur d'expansion des cellules NK⁸⁵. En revanche, le phénotype et la fonction de ces cellules NK fortement expansées sont peu décrits.

Type d'essai	Titre de l'essai	Pathologie	Intervention thérapeutique
<p>NCT 01853358 Phase I 16 patients inclus Débute en: 04/2013 Statut: complet Sponsor: IPC Investigateur: Pr Blaise</p>	<p>Phase I of Infusion of Selected Donor NK Cells After HLA Identical Allogeneic Stem Cell Transplantation Prepared With Reduced Intensity Conditioning</p>	<p>Hémopathies, de risque intermédiaire à très élevé, allogreffées HLA identique apparentée ou non</p>	<p>Allogreffe HLA identique puis infusion de cellules NK: - Déplétion CD3/ Sélection CD56 (Miltenyi) - Activation ex-vivo IL-2 1000 UI/mL 7J 37°C RPMI 10% SVF GMP 0.5x10⁶ cellules/mL - Infusion 60 à 90J post allogreffe => 3 paliers: 1-5->5 et ≤ 50 x10⁶ NK/kg</p>
<p>NCT 01947322 Phase I/II 10 patients inclus Débute en: 05/2011 Statut: complet Sponsor: AP-HP Investigateur: Dr Dhedin</p>	<p>Haploidentical NK-cell Infusion in Bad Prognosis AML Patients: Evaluation of Feasibility and Antitumoral Effect</p>	<p>LAM de novo, de mauvais pronostic</p>	<p>Fludarabine, cytosine arabinoside et cyclophosphamide puis infusion de cellules NK: - HLA haploidentique apparentée, KIR mismatch - Déplétion CD3/ Sélection CD56 - Dose infusée: 1x10⁷ NK/kg</p>
<p>NCT 02845999 Phase I 9 patients inclus Débute en: 11/2009 Statut: complet Sponsor: CHU Besançon</p>	<p>Allogenic Immunotherapy Based on Natural Killer Cell Adoptive Transfer in Metastatic Gastrointestinal Carcinoma Treated With Cetuximab : a Phase I Trial</p>	<p>Cancer gastro-intestinal avec métastases hépatiques, EGFR+. Donneur de cellules NK ≥ 1 KIR mismatch</p>	<p>Cyclophosphamide (60mg/kg) à J-6, Fludarabine (25 mg/m²) J-6 à J-2+ Cetuximab (400 mg/m²) J-8 et (250 mg/m²) J-1 et 1x/sem 7 sem puis infusion de cellules NK: - HLA haploidentique apparentée, KIR mismatch - Déplétion CD3 - 3 paliers dans l'artère intrahépatique: 3-8-12x10⁶/kg. activées ex-vivo par IL-2 1000UI/mL 24h - + injection IL-2 in-vivo 10 mUI à J0, H+12, puis 2x/sem 3 sem</p>

Tableau 2 : Essais cliniques français d'infusion de cellules NK (D'après Clinicaltrial.gov).

Mon projet de thèse a consisté, dans un premier temps, à évaluer certaines méthodes d'activation et d'expansion de cellules NK en comparant des protocoles en cours d'essai avec des protocoles un peu plus complexes. J'ai étudié une partie du phénotype et de la fonction de ces cellules NK au fur et à mesure de leur expansion afin de mieux appréhender leur utilisation dans des essais cliniques futurs, que ce soit en post allogreffe de CSH ou en soutien d'autres traitements de cancers hématologiques ou solides.

2. Comparaison de méthodes d'expansion de cellules NK

a. Matériels et méthodes

Echantillons

J'ai travaillé à partir de concentrés leuco plaquettaires (CLP) de volontaires sains de l'Etablissement Français du Sang (EFS). A la réception des échantillons de sang, les PBMC ont été récoltées à l'aide d'un gradient de densité (Lymphoprep separation media®). J'ai ensuite réalisé un tri cellulaire NK par sélection négative à l'aide de billes magnétiques afin d'éliminer les lymphocytes T et B (EasySep™ Human NK Cell Enrichment Kit, STEMCELL™). Pour certaines expansions, la plateforme de thérapie cellulaire du Pr. Chabannon à l'IPC nous a fourni des cellules NK à partir de PBMC de volontaires sains soumis à un tri négatif à l'aide de la technologie CliniMACS Prodigy® de Miltenyi Biotec (**Annexe 1**). Pour la dernière expansion, j'ai seulement déplété en lymphocytes T (noté « T-») à l'aide de billes magnétiques (Miltenyi).

Milieux de culture et cytokines

La plupart des expansions NK ont été réalisées dans du RPMI (Life Technologies) supplémenté de 10% de SVF. Afin de s'affranchir du SVF, les dernières expansions ont été faites dans du RPMI 10% sérum humain AB ou dans un milieu NK MACS® (Miltenyi Biotec lot : 130-113-102) optimisé pour la culture, l'activation et l'expansion des cellules NK, sans composants dérivés d'animaux et supplémenté de 5% de sérum humain AB.

Les cytokines principalement utilisées sont l'IL-2, l'IL-15 et l'IL-21, fournies par Novartis, Miltenyi et Biolegend, utilisées à des concentrations de 500 UI/mL, 10 ng/mL et 10 ng/mL respectivement. L'IL-2 Superkine (Fc) (AdipoGen® lot : P22631211) a été testée lors d'une expansion sur les cellules d'un seul donneur, à la concentration de 10 ng/mL et 1 ng/mL. Il s'agit d'un variant artificiel de l'IL-2 contenant des mutations sur le domaine

extracellulaire aux positions L80F, R81D, L85V, I86V et I92F et donnant à l'IL-2 une conformation semblable à celle de l'IL-2 couplée au récepteur IL-2R α (CD25). Cette nouvelle conformation permet une meilleure sensibilité des lymphocytes T naïfs à l'IL-2 et semble améliorer l'expansion de lymphocytes T cytotoxiques⁸⁶.

Lignées cellulaires

La lignée ayant servi de support pour les expansions de cellules NK est une lignée cellulaire d'érythroleucémie (K562) avec pour caractéristique de ne pas exprimer le HLA-I, qui a été préalablement cultivée dans du RPMI 10% SVF et irradiée à 50 Gy. Pour la dernière expansion, j'ai utilisé, à la place de la lignée supportrice K562, la fraction négative des PBMC autologues récoltée après le tri cellulaire NK.

Les lignées cellulaires cibles utilisées pour les tests fonctionnels de cytotoxicité sont à nouveau des cellules K562 non irradiées.

Protocoles d'expansion et d'activation NK

A J0, les cellules NK sont mises en culture avec des cellules supportrices irradiées à un ratio de 400000 : 800000 avec différentes combinaisons de cytokines ou avec des cytokines seules, dans des plaques 12 puits de 2 mL.

La moitié du milieu et les cytokines sont renouvelées tous les 2 jours. Les cellules supportrices irradiées sont ajoutées tous les 7 jours au ratio 2:1. Les cellules NK sont maintenues en culture de 14 à 21 jours selon l'expansion et comptées au microscope optique dans des cellules KOVA (Hycor®) à partir du 7^{ème} jour tous les 2-3 jours. Le taux d'expansion est déterminé en rapportant le nombre de cellules NK totales au nombre de cellules NK mises en culture initialement. Le phénotype et l'analyse de la fonction de ces cellules sont étudiés principalement au 14^{ème} jour de culture.

Sevrage : à partir de J14, un sevrage en feeders et/ou en cytokines est réalisé pour certaines conditions d'expansion afin d'étudier leur fonctionnalité.

Congélation : certaines cellules NK ont été congelées après 14 jours d'expansion dans une solution de SVF 10% DMSO puis décongelées et lavées dans du RPMI 10% SVF afin d'étudier leur fonctionnalité.

Phénotype des cellules NK expansées

Pour l'analyse de leur phénotype, les cellules NK expansées sont comptées puis marquées par un réactif « aqua » (Invitrogen®), qui met en évidence les cellules vivantes, et différents mix d'anticorps monoclonaux (**Annexe 2**). 5×10^4 à 1×10^5 cellules sont incubées pendant 20 min dans l'obscurité à 4°C avec le mix d'anticorps dans du PBS 1x (Gibco®). Les cellules sont ensuite lavées dans du FACS buffer (PBS supplémenté avec 2% de SVF et 2mM d'EDTA) et analysées par cytométrie en flux en utilisant le LSRII (BD Biosciences®). Pour les mesures d'intensité d'expression de marqueurs, la calibration de l'automate grâce à des spherobeads (Beckman®) permet de s'affranchir des variations de voltage des lasers au cours du temps et de pouvoir ainsi comparer les résultats d'une expérience à l'autre. L'analyse des données est faite avec le programme FlowJo version 10.

Tests fonctionnels

Les cellules NK expansées sont comptées en cellule KOVA pour être distribuées en plaque 96 puits fond V contenant du Golgi Plug (BD Bioscience®) et du CD107a-FITC, à raison de 100 000 cellules par puit.

L'activation des cellules NK se fait par coculture avec des cellules cibles K562 à un ratio 1:1. Les contrôles dans cette expérience sont les cellules NK cultivées seules. Après 4h d'incubation à 37°C, les cellules sont centrifugées à 2100 rpm pendant 2 minutes puis les culots sont resuspendus dans 50µL de FACS buffer additionné des anticorps conjugués pour le marquage de surface. Le marquage extracellulaire est réalisé à 4°C pendant 20 minutes et inclut les marqueurs cellulaires des NK (CD56, CD3), un marqueur de viabilité (aqua) et un marqueur de dégranulation. La molécule LAMP1 (CD107a) est retenue à l'intérieur des granules cytotoxiques et est libérée à la surface membranaire des cellules NK après le relargage, ce qui en fait un marqueur de dégranulation récente. Les cellules sont lavées puis perméabilisées avec une solution BD Cytotfix/ Cytoperm® pendant 20 minutes à 4°C. Après centrifugation à 2100 rpm pendant 2 minutes à 4°C, les cellules sont lavées avec une solution de BD PermWash® puis le marquage intracellulaire est réalisé pendant 20 minutes dans de la glace avec des anticorps fluorescents anti-IFN- γ et anti-TNF- α . Les cellules sont lavées puis resuspendues dans du FACS buffer et ensuite analysées par cytométrie en flux (BD FACS Canto II). Les données sont ensuite analysées avec le logiciel FlowJo version 10.

Analyses statistiques

Les données sont analysées avec le logiciel GraphPad Prism (GraphPad Software®, San Diego, CA, USA). Le test statistique non paramétrique non apparié et le niveau de significativité $p < 0.05$ sont utilisés pour toutes les analyses.

b. Résultats

Protocoles d'expansion de cellules NK

De nombreux protocoles d'expansion de cellules NK ont été décrits avec des taux d'expansion variables. Cependant, peu d'études se sont focalisées sur le phénotype et les fonctions des cellules NK résultantes. Nous avons exploré différentes stratégies d'expansion de cellules NK à partir de CLP de plusieurs donneurs de l'EFS. Comme illustré sur la **figure 15A**, la première stratégie sans cellule de support donne des expansions quasiment nulles pour l'ensemble des donneurs, quel que soit les combinaisons de cytokines. La deuxième stratégie utilisant des cellules feeders K562 ou des PBMC irradiées associées à une seule cytokine, l'IL-2, permet l'obtention de taux d'expansion modérés, inférieurs à 10. Enfin, la troisième stratégie avec des cellules feeders K562 ou PBMC irradiées et une combinaison de trois cytokines IL-2, IL-15 et IL-21 augmente significativement ($p < 0,01$) les taux d'expansion après 14 jours de culture. On obtient pour la majorité des donneurs un facteur d'expansion entre 10 et 200. Bien qu'il existe une variabilité entre les donneurs, la culture de cellules NK avec des cellules supportrices augmente de façon significative ($p < 0,01$) l'expansion NK (**Figure 15B**).

Pour la suite de mon travail, j'ai comparé les cellules NK expansées modérément avec la stratégie feeder+ IL-2 (nommée « expansion + ») avec celles expansées plus fortement avec la stratégie feeder+ IL-2+IL-15+IL-21 (nommée « expansion ++ ») (**Figure 15C et 15D**).

Caractérisation des cellules NK expansées

La stratégie de fenêtrage globale, utilisée en cytométrie en flux pour étudier la population de cellules NK expansées et ses sous-populations, est illustrée en **Annexe 3**.

→ Profil de maturation NK

In vivo, les cellules NK suivent un processus de maturation qui passe par différentes étapes. Initialement, les cellules NK immatures présentent un phénotype CD56^{bright} NKG2A+,

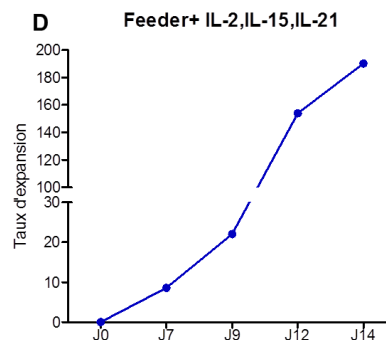
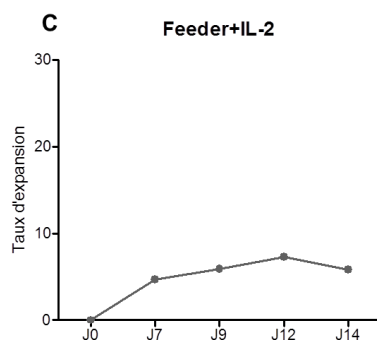
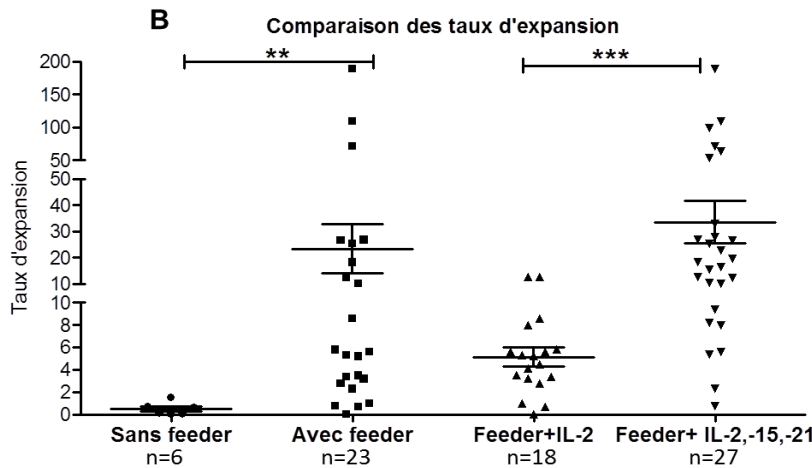
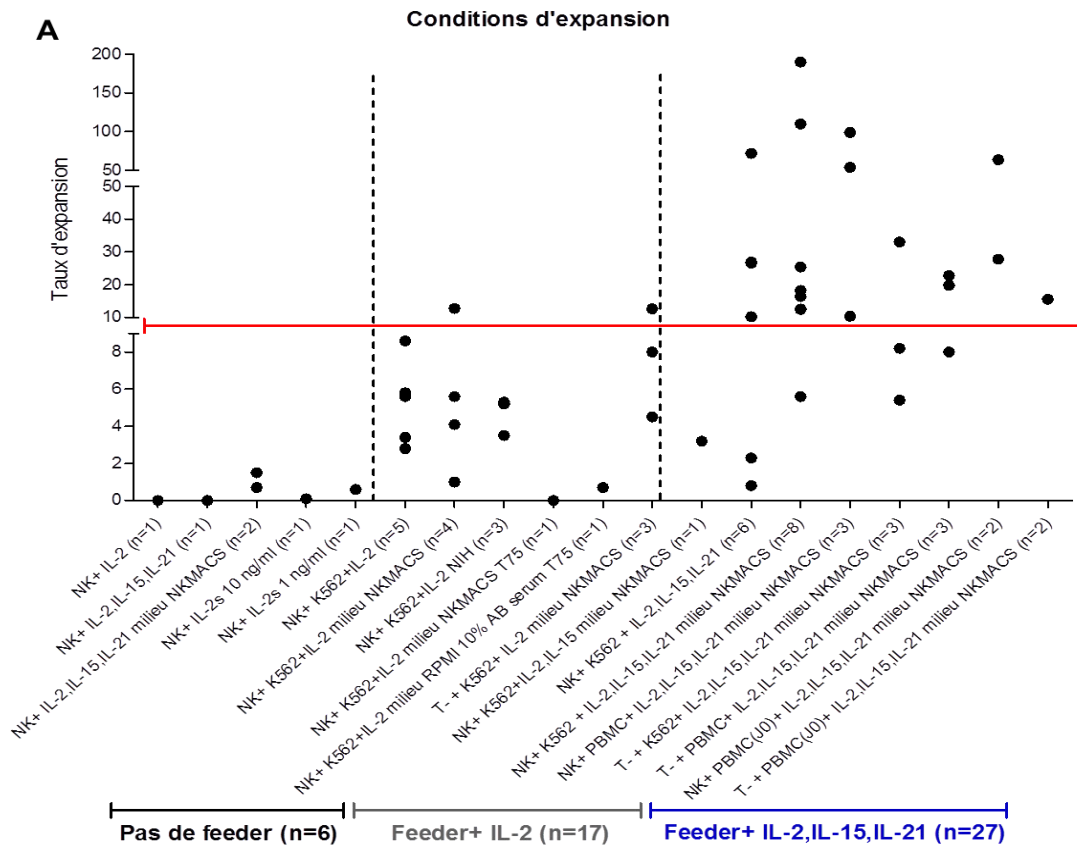


Figure 15: Exploration des stratégies d'expansion de cellules NK.

Graphique en nuage de points du taux d'expansion de cellules NK, évalué à 14 jours d'expansion cellulaire par rapport au jour 0 de mise en culture, dans différentes conditions. Ces conditions d'expansion sont divisées en trois groupes : sans feeder, avec feeder et IL-2, avec feeder et IL-2+IL-15+IL-21. Chaque point représente une expansion à partir d'un donneur de cellules NK (A).

Comparaison des taux d'expansion de cellules NK à J14 post expansion entre les groupes « sans feeder », « feeder+IL-2 » et « feeder+IL-2, IL-15, IL-21 ». Les valeurs obtenues sont représentées sous forme de moyenne plus ou moins les écarts-types; ** $p \leq 0.01$ (B).

Graphique représentant le profil d'expansion de cellules NK au cours du temps dans une condition d'expansion « modérée » du groupe « feeder+IL-2 » (C) et dans une condition de « bonne » expansion du groupe « feeder+IL-2, IL-15, IL-21 » (D).

qu'elles vont perdre pour devenir CD56^{dim}, et acquérir séquentiellement les marqueurs CD57 et KIR. Le récepteur CD16 permet de se fixer à la partie constante des anticorps potentiellement fixés sur les cellules cibles et d'induire une cytotoxicité dépendante des anticorps. Nos données mettent en évidence une augmentation significative ($p < 0,01$) de l'intensité d'expression du marqueur CD56 sur les cellules NK expansées, donc activées, par rapport aux cellules NK non expansées, donc au repos (**Figure 16A**). De ce fait, on observe une augmentation significative ($p < 0,01$) de la population NK CD56^{bright} et une diminution significative ($p < 0,01$) des NK CD56^{dim} sur les cellules NK expansées (**Annexe 4A et 4B**). Malgré cette activation, nous n'avons pas de différence significative quant au pourcentage de NK CD16+ entre les cellules NK non expansées et celles expansées quelle que soit la stratégie. Ce pourcentage reste fortement élevé après l'expansion des cellules (**Figure 16B**). Concernant la population NK CD57+, nous avons montré une baisse après expansion, d'autant plus significative que celle-ci est forte ($p < 0,001$) (**Figure 16C**). En effet, parmi les cellules NK expansées, on observe une diminution significative ($p < 0,05$) de la sous population mémoire CD57+ NKG2A- KIR+ par rapport à la sous population CD57- NKG2A+ KIR-. Cette diminution n'est pas significativement différente entre les deux méthodes d'expansion (**Figure 16D**).

→ Fonctionnalité

Nous nous sommes ensuite questionnés sur le pouvoir cytotoxique de ces cellules expansées ayant un profil de maturation différent des cellules NK non expansées. Concernant les cellules NK expansées, on observe une dégranulation et une sécrétion de cytokines IFN- γ et TNF- α avec une tendance non significative à l'augmentation par rapport aux cellules NK non expansées (**Figure 17A**). Comme illustré sur les **figures 17B et 17C**, nous ne voyons pas de différence significative quant à la fonctionnalité globale des cellules NK modérément et fortement expansées. La répartition des sous populations de NK fonctionnelles montre une plus forte proportion de cellules NK triple positives CD107a, IFN- γ et TNF- α pour les cellules NK faiblement expansées.

→ Congélation et décongélation de cellules NK expansées

Dans l'optique clinique de fractionner l'infusion des cellules NK expansées, nous nous sommes intéressés à l'impact de la congélation et de la décongélation sur la fonctionnalité du produit cellulaire expansé. Nos données préliminaires ne semblent pas

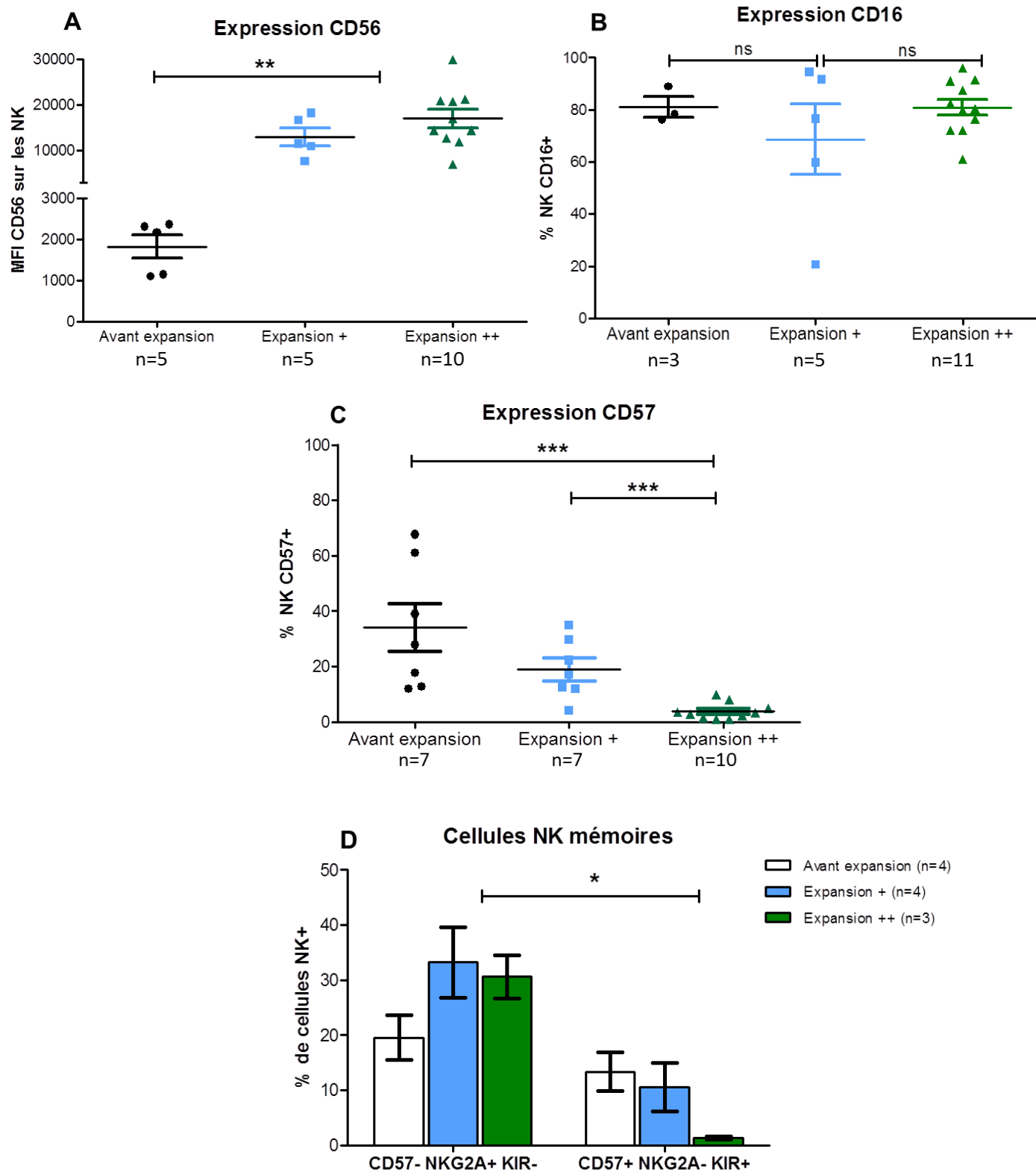


Figure 16 : Profil de maturation des cellules NK expansées.

Comparaison entre les populations de cellules NK plus ou moins expansées de l'intensité de fluorescence du marqueur CD56 (A) et du pourcentage de cellules NK CD16+ (B). Comparaison du pourcentage de cellules NK CD57+ entre les cellules NK expansées et non expansées puis des pourcentages des sous populations CD57-NKG2A+ KIR- et CD57+ NKG2A- KIR+ entre les cellules NK non expansées (blanc), modérément expansées (bleu) et fortement expansées (vert). Les valeurs obtenues sont représentées sous forme de moyennes plus ou moins les écarts-types; * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$.

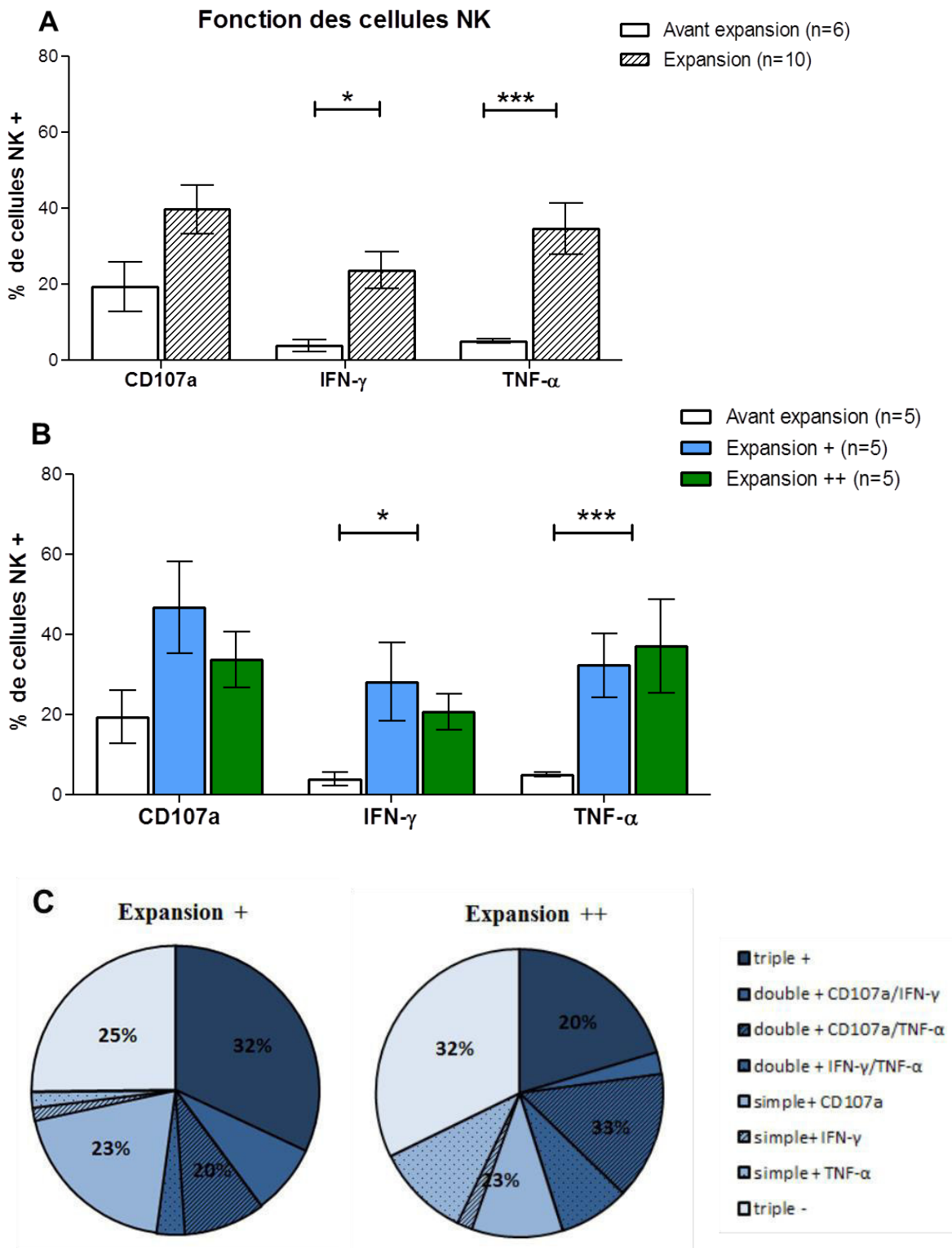


Figure 17 : Fonctionnalité des cellules NK expansées.

Analyse par cytométrie en flux et résultats cumulatifs de la dégranulation (cellules CD107a+) et de la production de cytokines (IFN- γ et TNF- α). Les cellules effectrices sont les cellules NK expansées pendant 14 jours avec des feeders K562, soit avec de l'IL-2 seule (expansion+, bleu), soit avec de l'IL-2, de l'IL-15 et de l'IL-21 (expansion++, vert). Les cellules cibles utilisées sont des K562WT et elles sont mises en coculture pendant 4h avec les effecteurs à un ratio 1:1. On compare la fonctionnalité entre les cellules NK non expansées (blanc) et expansées (rayé noir/blanc) quelque soit la méthode d'expansion (A) puis entre les deux méthodes d'expansion (B). Répartition des sous populations de cellules NK fonctionnelles dans les deux méthodes d'expansion, exprimée en pourcentage de cellules NK totales (C). Les valeurs obtenues sont représentées sous forme de moyenne plus ou moins les écarts-types; * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$.

montrer de différence entre la fonctionnalité des cellules NK après décongélation, lorsque celles-ci sont restimulées avec des cytokines pendant 24h, et avant congélation (**Figure 18**).

➔ Expériences de sevrage lors de l'expansion NK

En clinique, les cellules NK expansées *ex-vivo* sont ensuite infusées au patient. Il y a souvent un délai entre le moment de l'infusion et l'arrivée des cellules au site de la tumeur ; délai pendant lequel elles ne sont plus stimulées. Nous avons donc regardé l'impact du sevrage d'une semaine, en feeders et en feeders et cytokines, sur le maintien de la fonction des NK expansées. Nos données montrent une légère tendance à l'augmentation non significative de la dégranulation et sécrétion de cytokines des cellules NK sevrées en feeders à partir du 14^{ème} jour de culture. En revanche, par rapport aux cellules expansées non sevrées, nous mettons en évidence une diminution non significative de la sécrétion d'IFN- γ et de TNF- α des cellules NK sevrées en feeders et cytokines à partir du 14^{ème} jour de culture (**Figure 19**).

c. Discussion et perspectives

Depuis l'émergence du concept d'immunosurveillance en oncologie, le transfert adoptif de cellules immunitaires a pris toute sa place dans la stratégie thérapeutique de lutte contre le cancer, notamment les hémopathies malignes. L'infusion de cellules NK représente une immunothérapie prometteuse de par la cytotoxicité naturelle de ces cellules contre les cellules leucémiques et l'innocuité prouvée de leur administration. En effet, les premiers essais cliniques n'ont pas rapporté de toxicités graves (pas de GVH, ni de syndrome de relargage de cytokines, ni de neurotoxicité)^{70,75}. De nombreux protocoles d'expansion de cellules NK ont été décrits avec des taux d'expansion variables. Cependant, peu d'études se sont focalisées sur le phénotype et la fonction des cellules NK résultantes.

Dans notre étude, nous avons montré l'efficacité, en terme d'expansion de cellules NK, de l'association d'une lignée de support irradiée K562 avec une combinaison de cytokines IL-2, IL-15 et IL-21. Ces cellules NK expansées se sont révélées très fonctionnelles et elles conservent cette qualité même après quelques jours sans apport de cellules feeders mais aussi après une étape de congélation puis décongélation.

Afin d'étudier l'impact de l'expansion cellulaire sur le phénotype et la fonction des cellules NK, nous avons comparé deux stratégies d'expansion avec des cellules feeders irradiées avec pour l'une de l'IL-2 seule et pour l'autre l'association d'IL-2, d'IL-15 et d'IL-21. Nous avons obtenu des taux d'expansion différents et le seul ajout d'IL-15 et d'IL-21 a

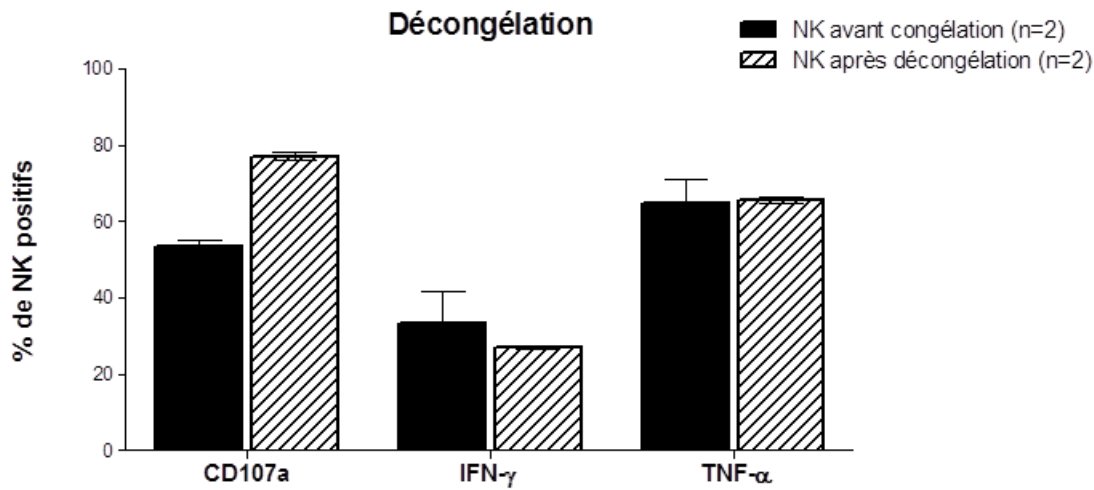


Figure 18 : Congélation/ décongélation de cellules NK expandues.

Essai fonctionnel de dégranulation (CD107a) et relargage de cytokines (IFN- γ et TNF- α). Les cellules effectrices sont les NK expandues de deux donneurs pendant 14 jours avec des feeders K562 WT et de l'IL-2, IL-15, IL-21 (barres noires), ou les mêmes cellules après congélation/décongélation (barres hachurées). Les cellules cibles utilisées sont des K562 WT et elles sont mises en coculture pendant 4h avec les effecteurs à un ratio 1:1. Les valeurs obtenues sont représentées sous forme de moyenne plus ou moins les écarts-types.

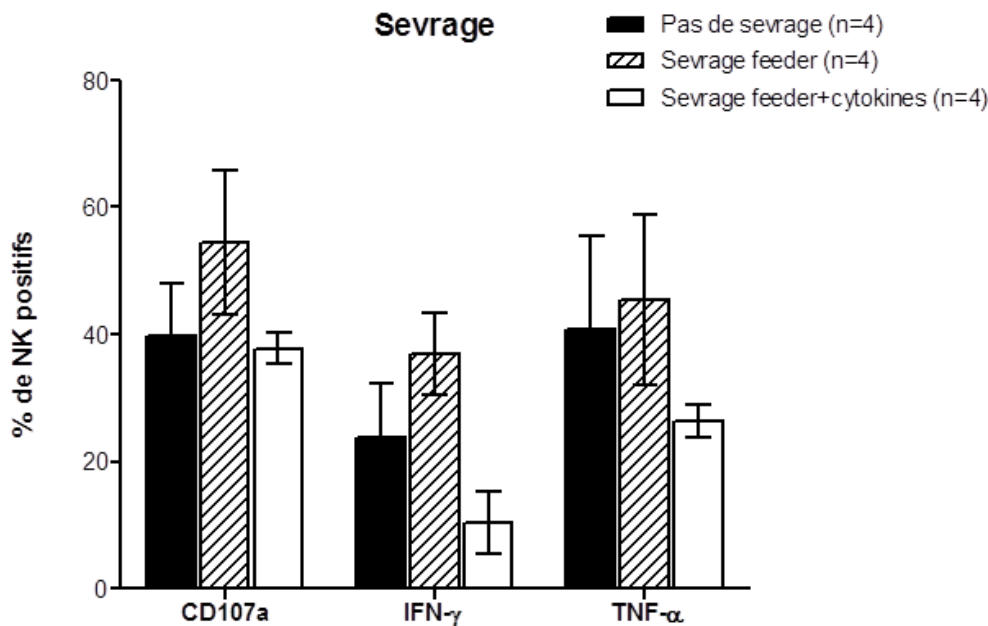


Figure 19 : Sevrage des cellules NK expandues.

Essai fonctionnel de dégranulation (CD107a) et relargage de cytokines (IFN- γ et TNF- α). Les cellules effectrices proviennent du même donneur et sont réparties en 3 groupes :

Groupe « sans sevrage » en noir : NK expandues pendant 21 jours avec des feeders irradiés K562 WT (ajoutés à J0, J7 et J14) et de l'IL-2, IL-15 et IL-21 (ajoutées tous les 2 jours).

Groupe « sevrage feeder » hachuré : NK expandues pendant 21 jours avec des feeders irradiés K562 WT (ajoutés à J0 et J7) et de l'IL-2, IL-15 et IL-21 (ajoutées tous les 2 jours).

Groupe « sevrage feeder et cytokines » pointillé : NK expandues pendant 21 jours avec des feeders irradiés K562 WT (ajoutés à J0 et J7) et de l'IL-2, IL-15 et IL-21 (ajoutées tous les 2 jours jusqu'à J12).

Les cellules cibles utilisées sont des K562 WT et elles sont mises en coculture pendant 4h avec les effecteurs à un ratio 1:1. Les valeurs obtenues sont représentées sous forme de moyenne plus ou moins les écarts-types.

permis de passer d'une expansion modérée voire faible (taux inférieurs à 10) à une bonne expansion avec des taux allant jusqu'à 200 au bout de 14 jours de culture. Il a été montré que l'IL-21 agit en synergie avec les cytokines pro-inflammatoires IL-2 et IL-15 sur la prolifération NK⁷³.

L'efficacité des cellules supportrices pour expandre de façon importante les cellules NK soulève la problématique de la réglementation française de ces cellules feeders issues de lignées tumorales. En effet, la manipulation de ces cellules n'est pas encore très répandue en France et aucun essai clinique les utilisant n'a encore vu le jour. Cependant, l'acceptation par l'ANSM de cellules feeders GMP (Good Manufacturing Practice) est en cours. La start up *EMERCell*, créé en 2013, et implantée à Montpellier, a eu l'accord des autorités françaises pour développer un produit de thérapie innovante basé sur des cellules NK expandues avec des feeders GMP à partir d'unités de sang de cordon et espère amener ce produit en essai clinique très prochainement. Aussi, une des perspectives de mon travail sera d'expandre de nouvelles cellules NK issues de volontaires sains avec une lignée feeder de grade clinique approuvée par la FDA et utilisée aux USA dans un essai clinique⁸⁷. Une des alternatives à la qualification de lignées tumorales comme cellules feeders consiste en l'utilisation de la fraction négative des PBMC du tri cellulaire NK irradiée et nos premiers résultats sont encourageants⁶⁹.

Une autre exigence GMP, assurant la sécurité du produit cellulaire, concerne la quantité de lymphocytes T résiduels. L'étape de déplétion en lymphocytes T est cruciale puisqu'un taux de cellules T <0,09% est exigé afin d'autoriser l'infusion de plus de 1.0×10^7 cellules NK/kg⁶⁹. Nos résultats confirment l'efficacité de la déplétion T automatique de Miltenyi par des billes immunomagnétiques.

Concernant la fonctionnalité du produit NK expandu, nous n'avons pas trouvé de différence significative entre les deux stratégies d'expansion ; les cellules NK restant très fonctionnelles dans les deux cas. Cette bonne fonction après expansion confirme les résultats de plusieurs autres études^{69,70,88}. De plus, la conservation de la fonctionnalité du produit NK expandu après congélation et décongélation est un atout pour une utilisation future en routine hospitalière (infusion fractionnée ou différée). Les résultats récents d'un essai de phase I mené aux USA, publiés par l'équipe de Ciurea, sont en faveur de l'efficacité d'une telle infusion fractionnée. En effet, 13 patients atteints d'hémopathies de haut risque ont été traités par allogreffe de CSH et ont reçu 3 doses de cellules NK à J-2, J+7 et J+28 de la greffe. 11/13

patients sont en réponse complète à 14,7 mois de suivi et seul 1 patient a rechuté. Les cellules NK étaient issues du même donneur que celui de l'allogreffe et étaient expandues 14 jours par des cellules feeders K562 irradiées exprimant à la membrane de l'IL-21. Les doses de cellules NK allaient de 1×10^5 à 1×10^8 /kg et étaient congelées⁷⁵.

Les quelques expériences de sevrage en feeders des cellules expandues sont en faveur de la persistance des fonctionnalités de dégranulation et de production d'IFN- γ et de TNF- α . Une des perspectives à moyen terme de ce projet serait de confirmer ces résultats *in vitro* par des tests *in vivo* de xéngreffe et d'infusion chez l'animal des cellules préalablement cultivées. Cela permettrait d'évaluer la persistance du produit *in vivo* et le « homing » des cellules NK dans la moelle osseuse.

d. Conclusion

En définitive, ces premières données suggèrent une amélioration significative de l'expansion cellulaire NK grâce à l'utilisation de cellules supportrices irradiées en complément de l'activation par une combinaison de cytokines IL-2, IL-15 et IL-21. Ces cellules obtenues présentent une bonne fonctionnalité, et ce même après une étape de congélation/décongélation. Dans un second temps, nous avons étudié l'expression de certains récepteurs inhibiteurs dont l'augmentation pourrait diminuer la fonction des cellules NK expandues face à des cibles exprimant les ligands correspondants.

IV. 2^{ème} PARTIE :

NOUVELLE APPROCHE DE COMBINAISON D'UNE THERAPIE CELLULAIRE ET PHARMACOLOGIQUE DANS LE TRAITEMENT PROPHYLACTIQUE DE RECHUTES POST ALLOGREFFE DE CSH

1. Découverte de molécules de « points de contrôle immunitaires » sur les cellules NK

Pendant plusieurs décennies, le rôle du système immunitaire contre le cancer n'a pas été pleinement apprécié car les tumeurs suppriment efficacement les réponses immunitaires par des voies qui contrôlent l'homéostasie immunitaire. La découverte, sur les lymphocytes T, de molécules fonctionnant comme des points de contrôle de la cytotoxicité (appelés en anglais « checkpoints immunitaires ») en activant des voies de signalisation négative, a permis une véritable révolution dans la thérapie des cancers. Le développement d'anticorps monoclonaux ciblant ces récepteurs inhibiteurs pour bloquer certaines interactions inhibitrices est en plein essor depuis l'avènement des anti-PD-1 et anti-PDL-1 ciblant les lymphocytes T^{70,89}. Même s'il n'existe pas de molécule véritablement spécifique des cellules NK, certains récepteurs de surface sont exprimés principalement par ces cellules et jouent un rôle majeur dans la régulation de leur fonction anti-tumorale. L'analyse bioinformatique du génome humain a révélé la présence d'environ 300 protéines possédant au moins un domaine intracytoplasmique ITIM et pouvant correspondre à ce type de récepteurs. Seulement quelques-uns de ces récepteurs sont actuellement ciblés en thérapeutique (**tableau 3**). J'ai choisi de présenter dans cette partie ceux les plus décrits dans la littérature.

a. Récepteurs KIR et anticorps monoclonaux anti-KIR

Les KIR sont des glycoprotéines transmembranaires appartenant à la superfamille des immunoglobulines (Ig). Les récepteurs KIR reconnaissent des ligands du CMH de classe I, notamment les allèles HLA-A, HLA-B et HLA-C. Ce sont des récepteurs monomériques très polymorphes, formés de 2 ou 3 domaines extracellulaires Ig-like identiques (KIR2D ou KIR3D) et d'un domaine intracellulaire court (S) ou long (L). Ces différences permettent de distinguer deux groupes fonctionnels: les KIR inhibiteurs (KIR2DL et KIR3DL dont la partie intracellulaire de grande taille génère un signal inhibiteur) et les KIR activateurs (KIR2DS et KIR3DS dont la partie intracellulaire de petite taille génère un signal activateur)³⁶. Suite à

Cible	Ligand	Médicament	Statut
KIR2DL1/2/3	HLA-C	IPH/BMS: Lirilumab	Phase II
NKG2A	HLA-E	IPH: Monalizumab	Phase II
PD-1	PD-L1/-L2	BMS/ONO: Nivolumab Merck: Pembrolizumab Regeneron/Sanofi: REGN2810 Novartis: PDR001 AZN: MEDI0680 Pfizer: PF-06801591 Agenus/Incyte: INCSHR1210 Janssen: JNJ-63723283	Disponible (Opdivo®) Disponible (Keytruda®) Phase II Phase II Phase II Phase I Phase I Phase I
PD-L1	PD-1	Roche: Atézolizumab AZN: Durvalumab Pfizer/ Merck: Avélumab	Disponible (Técentriq®) Disponible (Imfinzi®) Disponible (Bavencio®)
LAG-3	HLA-II	BMS: BMS-986016 Novartis: LAG525 Anaptys/Tesaro Merck Regeneron/Sanofi: REGN3767 MacroGenics (PD-1 bispecific)	Phase II Phase I Phase I Préclinique Préclinique Préclinique
TIM-3	Gal-9 CEACAM1 Phosphatidylsérine LILRB2	Novartis: MBG453 Anaptys/Tesaro: TSR-022 Jounce/Celgène Roche	Phase I Phase I Préclinique Préclinique
TIGIT	CD155, CD112	Roche OMP: OMP-313M32 Merck BMS	Phase I Phase I Phase I Préclinique

Tableau 3 : Récepteurs inhibiteurs des cellules NK qui font l'objet d'une thérapie ciblée

(D'après Chiossone *et al.* 2017).

l'efficacité démontrée des greffes KIR-mismatch, un anticorps bloquant KIR2DL1, KIR2DL2 et KIR2DL3 a été généré : 1-7F9 est une IgG4 humaine qui augmente la cytotoxicité des cellules NK contre les cellules tumorales exprimant HLA-C⁹⁰. Cela s'est poursuivi par le développement de l'IPH2101, testé dans plusieurs essais cliniques de phase I, et montrant que le blocage des récepteurs KIR n'engendre que des effets secondaires minimes. Ensuite, le lirilumab (IPH2102, BMS-986015), une IgG4 recombinante stabilisée, a été développé afin d'optimiser son emploi thérapeutique. Il est actuellement testé dans plusieurs essais cliniques de phase I et II en association avec l'élotuzumab (qui cible l'antigène SLAMF7 présent sur les cellules de myélome) dans le myélome multiple (NCT02252263), avec l'agent hypométhylant de l'ADN 5-azacytidine dans la LAM (NCT02399917) et les syndromes myélodysplasiques (NCT02599649) ou avec le rituximab dans la leucémie lymphoïde chronique (NCT02481297). Il est, par ailleurs, en cours d'étude de phase II pour tester son efficacité en monothérapie d'entretien chez des patients âgés atteints de leucémie aiguë lymphoïde (NCT01687387).

b. Récepteur NKG2A et anticorps monoclonaux anti-NKG2A

NKG2A est une protéine transmembranaire caractérisée par un domaine extracellulaire lectine de type C couplée de façon covalente à la sous-unité CD94. Le récepteur NKG2A/CD94 est un hétérodimère naturellement exprimé à la surface d'environ 50% des cellules NK et d'une partie des cellules T cytotoxiques. Il reconnaît la molécule du CMH de classe I non classique, HLA-E⁹¹ qui fixe et présente des peptides dérivés de séquences des molécules du CMH-I classiques (HLA-A, HLA-B, HLA-C) et non classiques (HLA-G). De ce fait, l'interaction entre NKG2A et HLA-E permet aux cellules NK de surveiller indirectement l'expression des autres molécules du CMH-I⁹². Contrairement à ce qui se passe pour les molécules HLA de classe I classiques, plusieurs études ont observé que l'expression de HLA-E est maintenue, voire augmentée, chez 50 à 80 % des patients qui ont des tumeurs solides, des leucémies ou des lymphomes^{93,94}. Cela explique la diminution marquée de l'activité anti-tumorale d'un grand nombre de cellules NK. L'anticorps monoclonal anti-NKG2A Monalizumab® trouve alors tout son intérêt dans la potentialisation de l'effet anti-leucémique des cellules NK. Il est actuellement testé dans des études de phase II en monothérapie des cancers gynécologiques (NCT02459301) et dans l'approche néoadjuvante des cancers oropharyngés (NCT02331875) ou en combinaison avec le cétuximab dans les cancers des voies aérodigestives supérieures (NCT02643550), avec l'ibrutinib dans la leucémie

lymphoïde chronique (NCT02557516) ou encore avec le durvalumab (anti-PDL1) dans plusieurs tumeurs solides (NCT02671435).

c. Récepteur PD-1 et anticorps monoclonaux anti-PD-1

Initialement décrit sur les lymphocytes T et B, les monocytes et les cellules dendritiques, une étude récente a montré que PD-1 est aussi exprimé par les cellules NK⁹⁵. PD-1 reconnaît ses ligands spécifiques, PD-L1 et PD-L2, exprimés par des cellules tumorales ou infectées par un virus ainsi que par des cellules présentatrices d'antigène situées autour de ces foyers de réponses immunitaires. Plusieurs anticorps anti-PD-1 ou anti-PDL-1 ont été mis au point ; parmi eux, le Nivolumab induit l'expression dans les lymphocytes T de gènes codant des protéines impliquées dans la fonctionnalité des cellules NK (comme l'IFN- γ et le granzyme B)⁹⁶. Cela suggère que le blocage de ce point de contrôle immunitaire permet de récupérer une réponse immunitaire anti-tumorale en agissant sur une voie moléculaire commune aux cellules T et NK.

d. Récepteur TIM-3 et anticorps monoclonaux anti-TIM-3

La molécule TIM-3 est une glycoprotéine de type I, originalement décrite sur les lymphocytes T CD4+ Th1 et T CD8+ cytotoxiques. Elle est aussi présente sur d'autres populations immunitaires notamment les cellules NK. TIM-3 est retrouvée sur les cellules T de patients atteints de mélanomes, de cancers bronchiques non à petites cellules et de lymphomes folliculaires à des stades avancés. Dans ces trois types de cancers, il a été décrit que toutes les cellules T TIM-3+ co-expriment PD-1 et présentent une cytotoxicité et une production de cytokines réduites⁹⁷. L'effet suppresseur de tumeur d'un blocage simultané de PD-1 et TIM-3 est supérieur au blocage de PD-1 seul dans des modèles précliniques de tumeurs solides et de cancers hématologiques⁹⁸. Des essais cliniques de phase I utilisant des anti-TIM-3 sont en cours et ce type d'association d'anticorps monoclonaux est étudié.

2. Etude de la combinaison d'un produit de cellules NK expandues avec différents anticorps monoclonaux.

a. Matériels et méthodes

Tests fonctionnels après blocage par des anticorps monoclonaux

Ces tests sont réalisés de la même manière que les tests fonctionnels classiques avec une étape de blocage avant la coculture entre les cellules NK et les cellules cibles ainsi qu'une étape de marquage supplémentaire. De plus, les cellules cibles utilisées sont des lignées de K562 modifiées pour exprimer les ligands des molécules inhibées.

Pour le blocage du récepteur NKG2A, on utilise le médicament IPH2201 (Innate Pharma®) à la concentration de 10 µg/mL. L'activation des cellules NK se fait par des cibles K562 exprimant HLA-E (Innate Pharma®). Les contrôles dans cette expérience sont les cellules NK cultivées seules et les cellules NK cultivées avec les cellules K562-HLA-E et un contrôle isotypique. Après l'étape de coculture, le marquage extracellulaire de tous les puits se fait en 2 étapes : une étape de marquage avec le médicament IPH2201 à la concentration de 20 µg/mL puis le marquage classique (aqua, CD3, CD56, CD107a cf. **Annexe 2**) avec un anticorps IgG4-Fc-PE secondaire permettant de révéler l'IPH2201. La suite du test est identique au test fonctionnel classique. La stratégie de fenêtrage en cytométrie en flux sur le logiciel FlowJo est présentée dans l'**annexe 5**.

Pour le blocage du récepteur TIM-3, on utilise le médicament anti-TIM-3 catégorie 345010 (Ozyme®) à la concentration de 10 µg/mL. L'activation des cellules NK se fait par des cibles K562 exprimant la Galectine-9. Les contrôles dans cette expérience sont les cellules NK cultivées seules et les cellules NK cultivées avec les cellules cibles et un contrôle isotypique. Après l'étape de coculture, le marquage extracellulaire de tous les puits se fait en 2 étapes : une étape de marquage avec un anti-TIM3-PE à la concentration de 20 µg/mL puis le marquage classique (aqua, CD3, CD56, CD107a). La suite du test est identique au test fonctionnel classique.

Analyses statistiques

Les données sont analysées avec le logiciel GraphPad Prism (GraphPad Software®, San Diego, CA, USA). Le test statistique non paramétrique non apparié et le niveau de significativité $p < 0.05$ sont utilisés pour toutes les analyses.

b. Résultats

Manipulation pharmacologique des cellules NK expansées

→ Expression de molécules de co-inhibition

In vivo, les cellules NK possèdent à leur surface différents récepteurs inhibiteurs comme KIR, NKG2A, TIM-3, LIGHT, PD-1 qui, en rentrant en contact avec leurs ligands respectifs à la surface d'autres cellules, vont transmettre un signal inhibiteur aux cellules NK. Cette inhibition résulte d'un déséquilibre en faveur de l'inhibition entre signaux activateurs et inhibiteurs. De plus, l'augmentation de ces molécules inhibitrices représente un marqueur d'épuisement cellulaire. L'impact de l'expansion et de l'activation cellulaire NK sur le niveau d'expression de récepteurs inhibiteurs est très peu décrit.

Nos données des **figures 20A, 20B et 20C** mettent en évidence une tendance à l'augmentation de PD-1, PDL-1 et TIGIT. L'expression des récepteurs TIM-3 et NKG2A à la surface des cellules NK expansées est significativement plus importante, indépendamment des stratégies d'expansion, comparé aux cellules NK non expansées ($p < 0,001$ et $p < 0,01$ respectivement). Nous observons une plus forte proportion de cellules NK doublement positives, TIM-3 fortement exprimé/NKG2A+, que de cellules seulement TIM-3 fortes ($p < 0,01$) (**Figure 20D**).

→ Blocage du récepteur NKG2A

Ayant mis en évidence une augmentation du récepteur NKG2A sur les cellules NK expansées, nous avons essayé de le bloquer et de mesurer l'impact sur la fonctionnalité des cellules NK face à une cible exprimant le ligand de NKG2A. Comme illustré sur les **figures 21A, 21B et 21C**, l'anticorps monoclonal bloquant anti-NKG2A IPH2201 augmente la fonctionnalité des cellules NK expansées face à une cellule cible exprimant le ligand HLA-E. Il y a une augmentation significative de la dégranulation (**Figure 21A**) et de la sécrétion d'IFN- γ (**Figure 21B**) et de TNF- α (**Figure 21C**) par les cellules NK expansées traitées par l'anti-NKG2A bloquant par rapport à celles non traitées ou marquées par un isotype contrôle ($p < 0,05$). Les **figures 21D et 21E** illustrent un exemple des profils de dégranulation et de sécrétion d'IFN- γ des sous populations NKG2A+ et NKG2A- en présence du médicament. On observe un profil différent entre les cellules NK expansées NKG2A+ et NKG2A-. En effet, les cellules NKG2A+ paraissent sensibles à la cible K562-HLA-E ; elles dégranulent et produisent moins d'IFN- γ que lorsqu'elles sont face à une cible K562. Ce n'est pas le cas

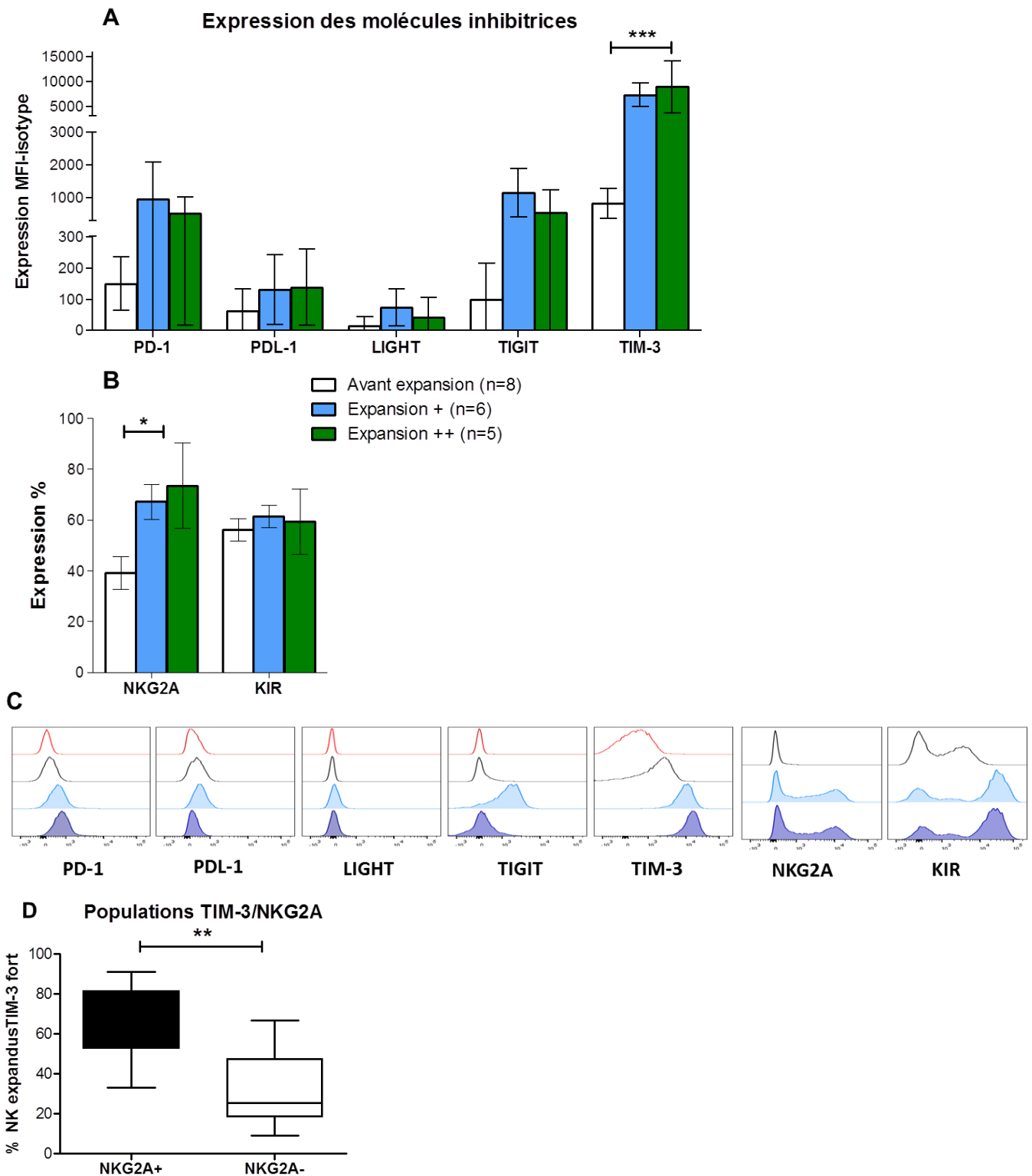


Figure 20 : Expression de molécules de co-stimulation sur les cellules NK expansées.

Analyse par cytométrie en flux et résultats cumulatifs de l'expression de différents récepteurs et ligands inhibiteurs à la surface de cellules NK avant expansion (blanc), modérément expansées (« expansion + » bleu) et fortement expansées (« expansion ++ » vert) (A et B). L'expression est calculée par la médiane d'intensité de fluorescence (MFI) pour certains marqueurs (A) et en pourcentage pour d'autres (B). Superposition en histogramme des MFI des différents récepteurs et ligands inhibiteurs à la surface des cellules NK. Le trait plein rouge correspond à la MFI de l'isotype et le trait plein noir à celle de cellules NK avant expansion. La courbe bleue claire correspond à la MFI de cellules NK modérément expansées et celle bleue foncée à celle de NK fortement expansées d'un même donneur (C).

Le graphique D représente le pourcentage de cellules NK expansées doublement positives, TIM-3 fortement exprimé et NKG2A+, par rapport à celles seulement TIM-3 fort.

Les valeurs obtenues sont représentées sous forme de moyenne plus ou moins les écarts-types ; * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$.

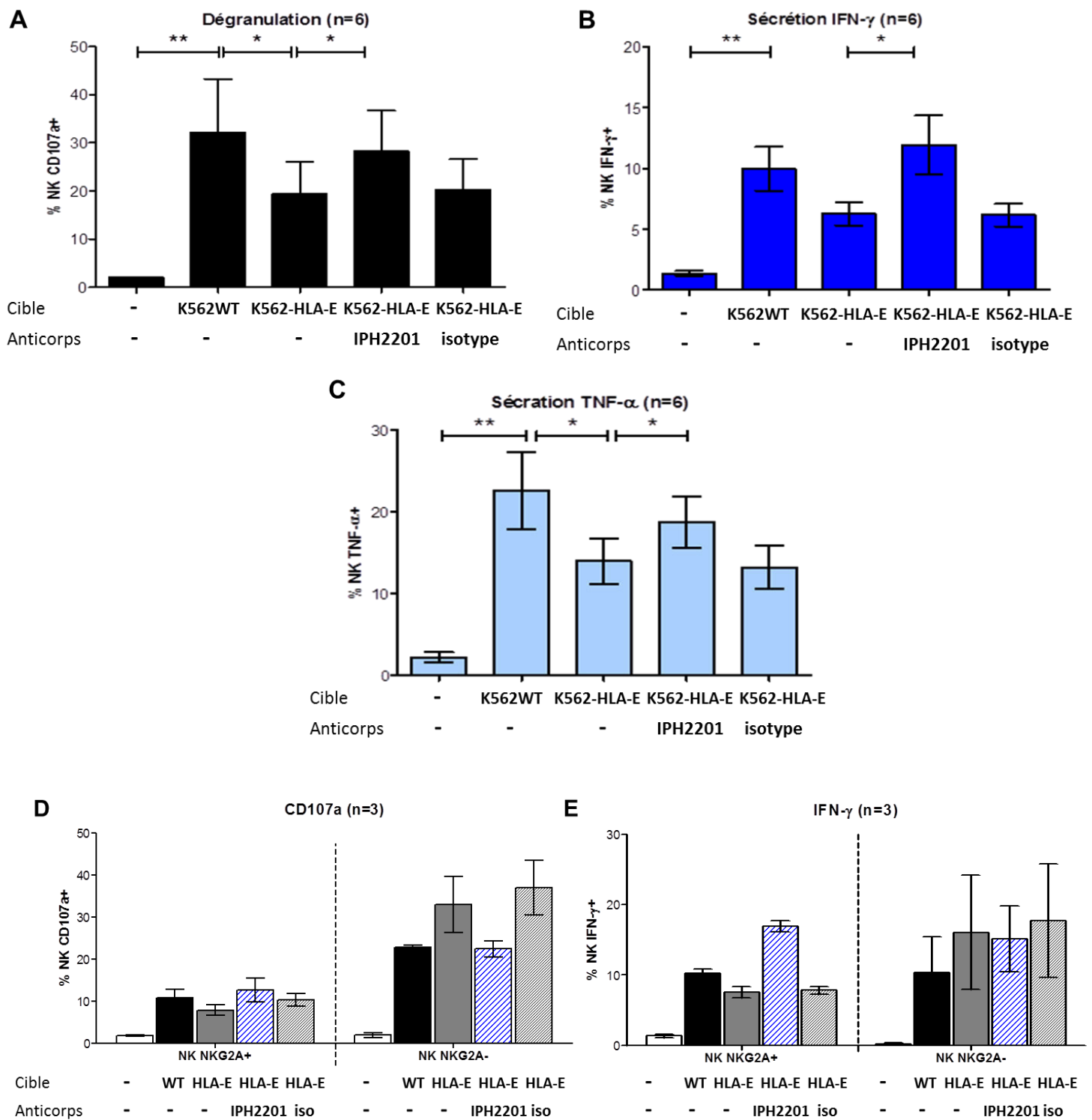


Figure 21 : Manipulation pharmacologique des cellules NK expandées par blocage du récepteur NKG2A.

Essai fonctionnel de dégranulation (CD107a) et relargage de cytokines (IFN- γ et TNF- α) après blocage par un anticorps bloquant anti-NKG2A (IPH2201 Innate Pharma®). Un isotype IgG1 de l'anticorps bloquant est utilisé comme contrôle. Les cellules effectrices sont les cellules NK expandées pendant 14 jours avec des feeders K562WT et des cytokines IL-2, IL-15, IL-21. Les cellules cibles utilisées sont soit des K562WT, soit des K562-HLA-E. Cibles et cellules effectrices sont mises en coculture pendant 4h à un ratio 1:1. Les valeurs obtenues sont représentées sous forme de moyenne plus ou moins les écarts-types (A, B, C);

* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$. Pour un des donneurs de cellules NK, on observe le profil de dégranulation et de sécrétion d'IFN- γ par les sous populations de cellules NK expandées NKG2A+ et NKG2A- (D, E).

pour les cellules NKG2A- qui dégranulent et sécrètent de l'IFN- γ en plus grande quantité face à la cible HLA-E. Enfin, les cellules NKG2A+ semblent sensibles à l'IPH2201 contrairement aux cellules NKG2A-. Effectivement, l'ajout du médicament sur les cellules expansées NKG2A+ permet de rétablir une fonction cytotoxique convenable.

→ Blocage du récepteur TIM-3

Contrairement à l'anticorps bloquant anti-NKG2A, nos données suggèrent une absence d'effet de l'anticorps bloquant anti-TIM-3 (Ozyme®) utilisé sur les cellules NK expansées. L'ajout de la molécule associée à la cible K562, exprimant la Galectine-9, n'entraîne pas de modification ni de la dégranulation ni de la sécrétion de cytokines IFN- γ et TNF- α par les NK comparé aux NK seulement en contact avec la cible (**Figure 22A, 22B, 22C**). Cela suggère soit une expression trop faible du ligand de TIM-3, la Galectine-9, sur les cibles K562, soit un manque d'efficacité de l'anticorps.

c. Discussion

Dans un second temps de notre travail, nous avons observé une up-régulation globale des récepteurs inhibiteurs après expansion cellulaire, et cela plus particulièrement pour NKG2A et TIM-3. Nous avons donc mis en contact les cellules NK expansées avec des cibles exprimant les ligands de l'un ou l'autre des récepteurs. Avec la cible exprimant HLA-E (ligand de NKG2A), nous avons observé une diminution de la dégranulation et de la sécrétion d'IFN- γ et de TNF- α par les cellules NK expansées par rapport au scénario avec la cible K562 (HLA-I négative). Cela n'a pas été le cas lors du contact des cellules NK avec la cible exprimant la Galectine-9 (ligand de TIM-3). Ayant accès facilement à un anticorps bloquant NKG2A en cours d'essai clinique à l'IPC, nous avons bloqué l'interaction du récepteur NKG2A des cellules NK expansées avec son ligand à la surface de la cellule K562-HLA-E. Cela a permis de restaurer la fonctionnalité des cellules NK.

Par la suite, nous avons montré une tendance à l'augmentation globale de plusieurs récepteurs inhibiteurs à la surface des NK comme PD-1, TIGIT... Cette augmentation s'est avérée statistiquement significative pour NKG2A et TIM-3. Cette significativité pourrait sans doute être atteinte pour les autres molécules en augmentant la taille de notre effectif, c'est-à-dire en faisant l'expérience sur un plus grand nombre de donneurs. A notre connaissance, il existe très peu de données concernant l'évolution de l'expression de ces récepteurs inhibiteurs suite à une forte expansion de cellules NK et l'impact que cela peut avoir sur leur fonction.

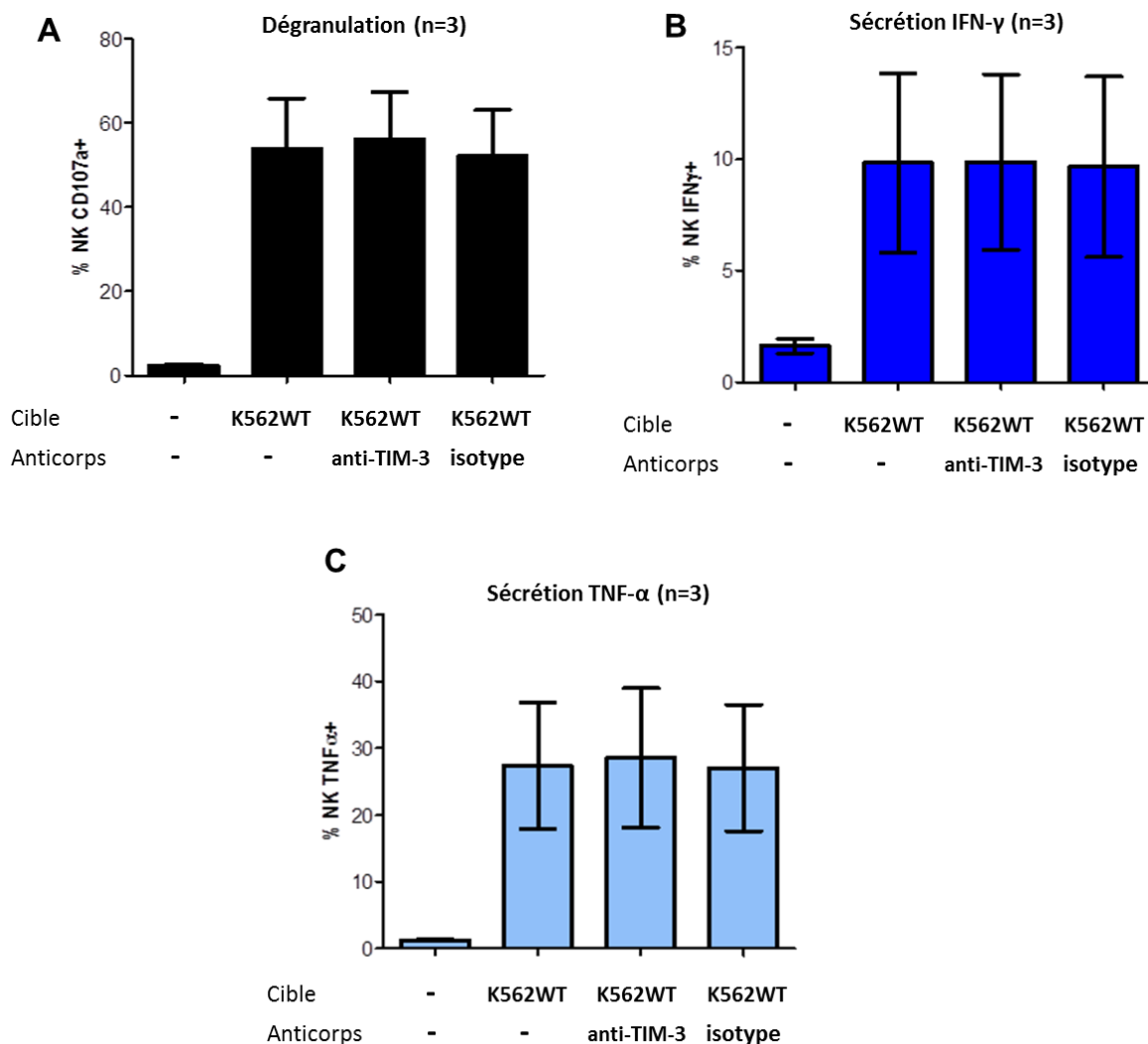


Figure 22 : Manipulation pharmacologique des cellules NK expansées par blocage du récepteur TIM-3.

Essai fonctionnel de dégranulation (CD107a) et relargage de cytokines (IFN- γ et TNF- α) après blocage par un anticorps bloquant anti-TIM-3 (Ozym®). Un isotype IgG1 de l'anticorps bloquant est utilisé comme contrôle. Les cellules effectrices sont les cellules NK expansées pendant 14 jours avec des feeders K562WT et des cytokines IL-2, IL-15, IL-21. Les cellules cibles utilisées sont des K562WT exprimant le ligand Galectine-9 de TIM-3. Cibles et cellules effectrices sont mises en coculture pendant 4h à un ratio 1:1. Les valeurs obtenues sont représentées sous forme de moyenne plus ou moins les écarts-types (A, B, C).

Concernant le récepteur NKG2A, nous avons mis en évidence une meilleure fonctionnalité du compartiment cellulaire NK NKG2A+ par rapport au contingent minoritaire NKG2A- (données non montrées). Ces données sont en accord avec de précédentes études, portant sur des cellules NK humaines non activées, montrant que l'expression de NKG2A seule par les cellules NK leur confère une réactivité plus importante face à une cellule cible ; c'est ce phénomène qui est nommé « Education des cellules NK »⁹⁹. De manière intéressante, *in vivo*, chez les patients en cours de reconstitution immunitaire après allogreffe de CSH où les cellules NK s'expandent très rapidement, bien qu'une forte expression de NKG2A ait été montrée, une population CD56^{dim}/CD16-/NKG2A+ a été identifiée et caractérisée comme étant hyporéactive¹⁰⁰. D'autre part, d'autres études ont identifié des cellules immatures 62L-KIR-NKG2A+ se reconstituant précocement mais semblant moins fonctionnelles¹⁰¹. Ceci suggère peut-être que l'expansion NK au cours de la reconstitution immunitaire post greffe n'est pas induite par les mêmes mécanismes que nous induisons au cours d'une expansion *in vitro* à l'aide de cellules feeders et cytokines.

Suite à l'observation de l'augmentation du pourcentage de cellules NK expandues NKG2A+ et étant donnée la présence du ligand de NKG2A, HLA-E, décrite sur les blastes de LAM^{93,102}, nous avons trouvé judicieux de mesurer la fonctionnalité des NK expandues face à une cible K562 exprimant HLA-E. Les résultats obtenus montrent une diminution de la dégranulation et de la production d'IFN- γ et de TNF- α des cellules NK face à la cible. La disponibilité d'un anticorps bloquant NKG2A utilisé en thérapeutique, le Monalizumab, nous a amené à le tester en combinaison au produit de cellules NK expandues face à cette même cible. La restauration de la fonction des cellules NK ouvre une voie encourageante quant à l'intérêt d'associer l'infusion de cellules NK expandues en grande quantité avec un anticorps bloquant une molécule de point de contrôle immunitaire⁷⁰. Additionnellement, nous avons montré au laboratoire que la synergie entre les cellules NK activées et l'utilisation de faibles doses de Rituximab permettait une meilleure clairance des cellules leucémiques dans un modèle de xéno greffe chez la souris de leucémie lymphoïde chronique¹⁰³. Dès lors, une approche d'expansion de cellules NK avant infusion chez les patients en complément d'anticorps thérapeutiques est peut-être une future stratégie thérapeutique intéressante.

d. Conclusion et perspectives

La vitesse dans la compréhension des mécanismes cellulaires d'interactions récepteurs-ligands amène au développement de stratégies thérapeutiques plus spécifiques utilisant les cellules NK.

Une des perspectives de l'expansion de cellules NK concerne le choix des donneurs de cellules à partir desquels est réalisée la culture *ex-vivo*, et cela en fonction de leur profil immunogénétique. La preuve de concept clinique des greffes KIR-mismatch ayant été apportée depuis plusieurs années par une étude pivot, l'alloréactivité des cellules NK pourrait être pleinement exploitée par la sélection de certaines cellules à expandre. En effet, la culture orientée d'une sous population de cellules NK, différente selon le phénotype des ligands KIR présents sur les cellules leucémiques résiduelles du receveur, serait intéressante. Ces stratégies se basent sur l'observation que, malgré un nombre fixe de gènes KIR hérités, chaque cellule NK exprime un nombre de KIR qui lui est propre à sa surface¹⁰⁴. Aussi, un immunophénotypage plus élargi des blastes leucémiques, dans une optique pré-thérapeutique, pourrait être envisagé. La recherche, par exemple, du degré d'expression du ligand HLA-E sur les blastes pourrait mieux prédire une réponse à l'utilisation d'anticorps inhibiteurs de NKG2A.

V. CONCLUSION GENERALE

Ce travail de thèse s'inscrit dans la continuité des programmes de recherche fondamentale et préclinique du laboratoire du Pr. Olive (facteurs clé de l'immunité anti-tumorale, implication dans la réponse aux traitements et la veille immune anti-tumorale) et constitue le support de prochains travaux de collaboration avec le laboratoire de thérapie cellulaire de l'IPC afin de mettre au point des produits de grade clinique dont l'activité anti-tumorale sera efficace et maintenue après infusion.

Ainsi, l'ensemble de mon travail a permis de mieux appréhender les techniques d'expansion de cellules NK à visée thérapeutique et a mis en place de nouvelles réflexions sur l'utilisation potentielle de ces cellules en combinaison avec des outils déjà ou bientôt disponibles sur le marché des immunothérapies.

L'avenir en oncologie réside dans l'association de plusieurs stratégies thérapeutiques complémentaires ciblant les cellules NK, les cellules tumorales et le microenvironnement tumorale. En effet, les approches plus anciennes de chimiothérapie ou radiothérapie peuvent, par exemple, aider à créer un espace pour l'expansion et l'intégration de cellules NK infusées. De plus, le stress génotoxique induit par ces thérapies pourrait promouvoir la sensibilité des cellules tumorales à la lyse par les cellules NK. Le challenge est de trouver des modèles d'essais cliniques pertinents permettant de travailler sur les schémas de combinaisons thérapeutiques, notamment l'ordre et l'intensité des traitements, et de pouvoir évaluer de façon précoce ces stratégies.

BIBLIOGRAPHIE

1. Passweg, J. R. *et al.* Is the use of unrelated donor transplantation leveling off in Europe? The 2016 European Society for Blood and Marrow Transplant activity survey report. *Bone Marrow Transplant.* **53**, 1139–1148 (2018).
2. Döhner, H. *et al.* Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. *Blood* **129**, 424–447 (2017).
3. Hatzimichael, E. & Tuthill, M. Hematopoietic stem cell transplantation. *Stem Cells Cloning* **3**, 105–117 (2010).
4. Tiercy, J.-M. How to select the best available related or unrelated donor of hematopoietic stem cells? *Haematologica* **101**, 680–687 (2016).
5. Powles, R. L. *et al.* Mismatched family donors for bone-marrow transplantation as treatment for acute leukaemia. *Lancet* **1**, 612–615 (1983).
6. Huang, X. Current status of haploidentical stem cell transplantation for leukemia. *J Hematol Oncol* **1**, 27 (2008).
7. Rowe, J. M. & Tallman, M. S. How I treat acute myeloid leukemia. *Blood* **116**, 3147–3156 (2010).
8. Vriesendorp, H. M. Aims of conditioning. *Exp. Hematol.* **31**, 844–854 (2003).
9. Alyea, E. P. *et al.* Impact of conditioning regimen intensity on outcome of allogeneic hematopoietic cell transplantation for advanced acute myelogenous leukemia and myelodysplastic syndrome. *Biol. Blood Marrow Transplant.* **12**, 1047–1055 (2006).
10. Diaconescu, R. *et al.* Morbidity and mortality with nonmyeloablative compared with myeloablative conditioning before hematopoietic cell transplantation from HLA-matched related donors. *Blood* **104**, 1550–1558 (2004).
11. Mielcarek, M. *et al.* Graft-versus-host disease after nonmyeloablative versus conventional hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* **102**, 756–762 (2003).
12. Ferrara, J. L. M., Levine, J. E., Reddy, P. & Holler, E. Graft-versus-host disease. *Lancet* **373**, 1550–1561 (2009).
13. Ghimire, S. *et al.* Pathophysiology of GvHD and Other HSCT-Related Major Complications. *Front Immunol* **8**, 79 (2017).
14. Barrett, A. J. & Battiwalla, M. Relapse after allogeneic stem cell transplantation. *Expert Rev Hematol* **3**, 429–441 (2010).
15. Kiessling, R., Klein, E. & Wigzell, H. ‘Natural’ killer cells in the mouse. I. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Specificity and distribution according to genotype. *Eur. J. Immunol.* **5**, 112–117 (1975).

16. 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).
17. Bryceson, Y. T. *et al.* Functional analysis of human NK cells by flow cytometry. *Methods Mol. Biol.* **612**, 335–352 (2010).
18. Jacobs, R. *et al.* CD56bright cells differ in their KIR repertoire and cytotoxic features from CD56dim NK cells. *Eur. J. Immunol.* **31**, 3121–3127 (2001).
19. Cooper, M. A., Fehniger, T. A. & Caligiuri, M. A. The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends Immunol.* **22**, 633–640 (2001).
20. Vivier, E. What is natural in natural killer cells? *Immunol. Lett.* **107**, 1–7 (2006).
21. Kared, H., Martelli, S., Ng, T. P., Pender, S. L. F. & Larbi, A. CD57 in human natural killer cells and T-lymphocytes. *Cancer Immunol. Immunother.* **65**, 441–452 (2016).
22. Matos, M. E. *et al.* Expression of a functional c-kit receptor on a subset of natural killer cells. *J. Exp. Med.* **178**, 1079–1084 (1993).
23. Jaleco, A. C. *et al.* Fetal liver contains committed NK progenitors, but is not a site for development of CD34+ cells into T cells. *J. Immunol.* **159**, 694–702 (1997).
24. Vitale, C. *et al.* Analysis of the activating receptors and cytolytic function of human natural killer cells undergoing in vivo differentiation after allogeneic bone marrow transplantation. *Eur. J. Immunol.* **34**, 455–460 (2004).
25. Montaldo, E. *et al.* Human NK cell receptors/markers: a tool to analyze NK cell development, subsets and function. *Cytometry A* **83**, 702–713 (2013).
26. Marçais, A. *et al.* Regulation of mouse NK cell development and function by cytokines. *Front Immunol* **4**, 450 (2013).
27. Smyth, M. J. *et al.* Activation of NK cell cytotoxicity. *Mol. Immunol.* **42**, 501–510 (2005).
28. Vivier, E., Nunès, J. A. & Vély, F. Natural killer cell signaling pathways. *Science* **306**, 1517–1519 (2004).
29. Fang, F., Xiao, W. & Tian, Z. NK cell-based immunotherapy for cancer. *Semin. Immunol.* **31**, 37–54 (2017).
30. Chávez-Galán, L., Arenas-Del Angel, M. C., Zenteno, E., Chávez, R. & Lascurain, R. Cell death mechanisms induced by cytotoxic lymphocytes. *Cell. Mol. Immunol.* **6**, 15–25 (2009).
31. Alter, G., Malenfant, J. M. & Altfeld, M. CD107a as a functional marker for the identification of natural killer cell activity. *J. Immunol. Methods* **294**, 15–22 (2004).
32. Fauriat, C., Long, E. O., Ljunggren, H.-G. & Bryceson, Y. T. Regulation of human NK-cell cytokine and chemokine production by target cell recognition. *Blood* **115**, 2167–2176 (2010).
33. Vivier, E., Tomasello, E., Baratin, M., Walzer, T. & Ugolini, S. Functions of natural killer cells. *Nat. Immunol.* **9**, 503–510 (2008).

34. Wang, R., Jaw, J. J., Stutzman, N. C., Zou, Z. & Sun, P. D. Natural killer cell-produced IFN- γ and TNF- α induce target cell cytolysis through up-regulation of ICAM-1. *J. Leukoc. Biol.* **91**, 299–309 (2012).
35. Wang, L., Du, F. & Wang, X. TNF-alpha induces two distinct caspase-8 activation pathways. *Cell* **133**, 693–703 (2008).
36. Chiossone, L., Vienne, M., Kerdiles, Y. M. & Vivier, E. Natural killer cell immunotherapies against cancer: checkpoint inhibitors and more. *Seminars in Immunology* **31**, 55–63 (2017).
37. Lanier, L. L. Natural killer cell receptor signaling. *Curr. Opin. Immunol.* **15**, 308–314 (2003).
38. 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).
39. Raulet, D. H. Roles of the NKG2D immunoreceptor and its ligands. *Nat. Rev. Immunol.* **3**, 781–790 (2003).
40. Bauer, S. *et al.* Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA. *Science* **285**, 727–729 (1999).
41. Brandt, C. S. *et al.* The B7 family member B7-H6 is a tumor cell ligand for the activating natural killer cell receptor NKp30 in humans. *J. Exp. Med.* **206**, 1495–1503 (2009).
42. Pogge von Strandmann, E. *et al.* Human leukocyte antigen-B-associated transcript 3 is released from tumor cells and engages the NKp30 receptor on natural killer cells. *Immunity* **27**, 965–974 (2007).
43. Rosental, B. *et al.* Proliferating cell nuclear antigen is a novel inhibitory ligand for the natural cytotoxicity receptor NKp44. *J. Immunol.* **187**, 5693–5702 (2011).
44. Baychelier, F. *et al.* Identification of a cellular ligand for the natural cytotoxicity receptor NKp44. *Blood* **122**, 2935–2942 (2013).
45. Costello, R. T. *et al.* Defective expression and function of natural killer cell-triggering receptors in patients with acute myeloid leukemia. *Blood* **99**, 3661–3667 (2002).
46. Fauriat, C. *et al.* Deficient expression of NCR in NK cells from acute myeloid leukemia: Evolution during leukemia treatment and impact of leukemia cells in NCR^{dull} phenotype induction. *Blood* **109**, 323–330 (2007).
47. Chretien, A.-S. *et al.* NKp46 expression on NK cells as a prognostic and predictive biomarker for response to allo-SCT in patients with AML. *Oncoimmunology* **6**, e1307491 (2017).
48. Morvan, M. G. & Lanier, L. L. NK cells and cancer: you can teach innate cells new tricks. *Nat. Rev. Cancer* **16**, 7–19 (2016).
49. Bottino, C. *et al.* Identification of PVR (CD155) and Nectin-2 (CD112) as cell surface ligands for the human DNAM-1 (CD226) activating molecule. *J. Exp. Med.* **198**, 557–567 (2003).
50. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **144**, 646–674 (2011).

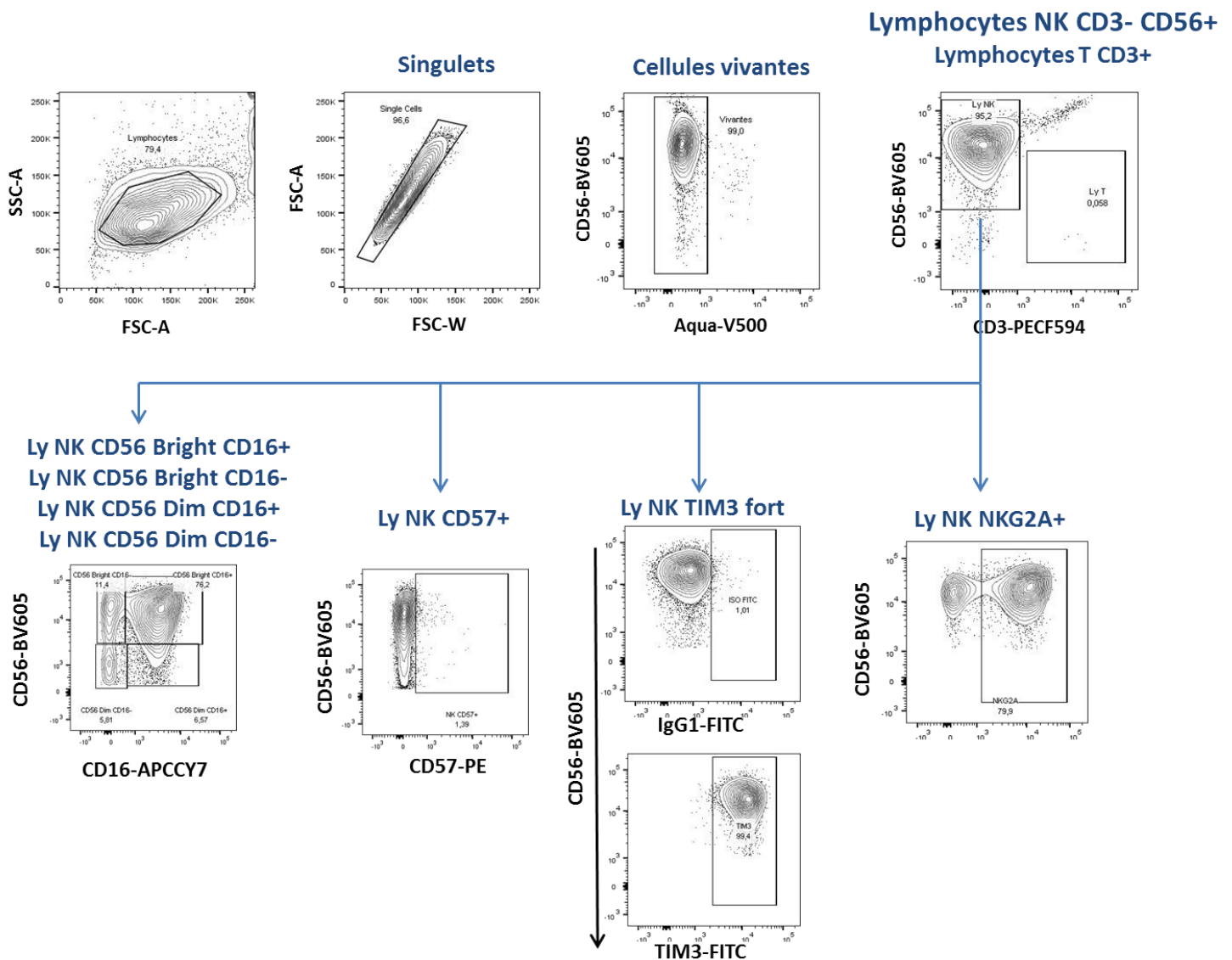
51. Schreiber, R. D., Old, L. J. & Smyth, M. J. Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science* **331**, 1565–1570 (2011).
52. Dranoff, G. Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer* **4**, 11–22 (2004).
53. Imai, K., Matsuyama, S., Miyake, S., Suga, K. & Nakachi, K. Natural cytotoxic activity of peripheral-blood lymphocytes and cancer incidence: an 11-year follow-up study of a general population. *Lancet* **356**, 1795–1799 (2000).
54. Mamessier, E. *et al.* Human breast cancer cells enhance self tolerance by promoting evasion from NK cell antitumor immunity. *J. Clin. Invest.* **121**, 3609–3622 (2011).
55. Castriconi, R. *et al.* Transforming growth factor beta 1 inhibits expression of NKp30 and NKG2D receptors: consequences for the NK-mediated killing of dendritic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **100**, 4120–4125 (2003).
56. Pasero, C. *et al.* Highly effective NK cells are associated with good prognosis in patients with metastatic prostate cancer. *Oncotarget* **6**, 14360–14373 (2015).
57. Costello, R. T. *et al.* Defective expression and function of natural killer cell-triggering receptors in patients with acute myeloid leukemia. *Blood* **99**, 3661–3667 (2002).
58. Chretien, A.-S. *et al.* NKp30 expression is a prognostic immune biomarker for stratification of patients with intermediate-risk acute myeloid leukemia. *Oncotarget* **8**, 49548–49563 (2017).
59. Aversa, F., Martelli, M. F. & Velardi, A. Haploidentical hematopoietic stem cell transplantation with a megadose T-cell-depleted graft: harnessing natural and adaptive immunity. *Semin. Oncol.* **39**, 643–652 (2012).
60. Hsu, K. C. *et al.* Improved outcome in HLA-identical sibling hematopoietic stem-cell transplantation for acute myelogenous leukemia predicted by KIR and HLA genotypes. *Blood* **105**, 4878–4884 (2005).
61. Ruggeri, L. *et al.* Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants. *Science* **295**, 2097–2100 (2002).
62. Venstrom, J. M. *et al.* Donor activating KIR2DS1 in leukemia. *N. Engl. J. Med.* **371**, 2042 (2014).
63. Venstrom, J. M. *et al.* Donor activating KIR3DS1 is associated with decreased acute GVHD in unrelated allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* **115**, 3162–3165 (2010).
64. Storek, J. *et al.* Reconstitution of the immune system after hematopoietic stem cell transplantation in humans. *Semin Immunopathol* **30**, 425–437 (2008).
65. Ruggeri, L. *et al.* Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants. *Science* **295**(5562):2097-100 (2002).
66. Ullah, MA. *et al.* Functional Reconstitution of Natural Killer Cells in Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Front Immunology* **7**:144 (2016).
67. Pical-Izard, C. *et al.* Reconstitution of natural killer cells in HLA-matched HSCT after reduced-intensity conditioning: impact on clinical outcome. *Biol Blood Marrow Transplant* **429-39** (2015).

68. Palmer, JM. *et al.* Clinical relevance of natural killer cells following hematopoietic stem cell transplantation. *Journal of Cancer* **4**(1):25-35 (2013).
69. Koehl, U. *et al.* Clinical grade purification and expansion of NK cell products for an optimized manufacturing protocol. *Front Oncol* **3**, 118 (2013).
70. Childs, R. W. & Carlsten, M. Therapeutic approaches to enhance natural killer cell cytotoxicity against cancer: The force awakens. *Nature Reviews Drug Discovery* **14**, 487–498 (2015).
71. Ghasemi, R. *et al.* Selective targeting of IL-2 to NKG2D bearing cells for improved immunotherapy. *Nat Commun* **7**, 12878 (2016).
72. Floros, T. & Tarhini, A. A. Anticancer Cytokines: Biology and Clinical Effects of Interferon- α 2, Interleukin (IL)-2, IL-15, IL-21, and IL-12. *Semin. Oncol.* **42**, 539–548 (2015).
73. De Rham, C. *et al.* The proinflammatory cytokines IL-2, IL-15 and IL-21 modulate the repertoire of mature human natural killer cell receptors. *Arthritis Research and Therapy* **9**, 1–15 (2007).
74. Prica, A. & Crump, M. Improving CD20 antibody therapy: obinutuzumab in lymphoproliferative disorders. *Leuk. Lymphoma* 1–10 (2019). doi:10.1080/10428194.2018.1498490
75. Ciurea, S. O. *et al.* Phase 1 clinical trial using mbIL21 ex vivo-expanded donor-derived NK cells after haploidentical transplantation. *Blood* **130**, 1857–1868 (2017).
76. Knorr, D. A., Bachanova, V., Verneris, M. R. & Miller, J. S. Clinical utility of natural killer cells in cancer therapy and transplantation. *Semin. Immunol.* **26**, 161–172 (2014).
77. Rosenberg, S. A. *et al.* Observations on the systemic administration of autologous lymphokine-activated killer cells and recombinant interleukin-2 to patients with metastatic cancer. *N. Engl. J. Med.* **313**, 1485–1492 (1985).
78. Miller, J. S. *et al.* Successful adoptive transfer and in vivo expansion of human haploidentical NK cells in patients with cancer. *Blood* **105**, 3051–3057 (2005).
79. Mehta, R. S., Shpall, E. J. & Rezvani, K. Cord Blood as a Source of Natural Killer Cells. *Front Med (Lausanne)* **2**, 93 (2015).
80. Eguizabal, C. *et al.* Natural killer cells for cancer immunotherapy: pluripotent stem cells-derived NK cells as an immunotherapeutic perspective. *Front Immunol* **5**, 439 (2014).
81. Li, Y., Hermanson, D. L., Moriarity, B. S. & Kaufman, D. S. Human iPSC-Derived Natural Killer Cells Engineered with Chimeric Antigen Receptors Enhance Anti-tumor Activity. *Cell Stem Cell* **23**, 181-192.e5 (2018).
82. Carlsten M. *et al.* Clinical-Grade mRNA Electroporation of NK Cells: A Novel and Highly Efficient Method to Genetically Reprogram Human NK Cells for Cancer Immunotherapy. *Blood* **124**:2153 (2014).
83. Shaffer, B. C. *et al.* Phase II Study of Haploidentical Natural Killer Cell Infusion for Treatment of Relapsed or Persistent Myeloid Malignancies Following Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation. *Biol. Blood Marrow Transplant.* **22**, 705–709 (2016).

84. Curti, A. *et al.* Successful transfer of alloreactive haploidentical KIR ligand-mismatched natural killer cells after infusion in elderly high risk acute myeloid leukemia patients. *Blood* **118**, 3273–3279 (2011).
85. Kim, E. K. *et al.* Ex vivo activation and expansion of natural killer cells from patients with advanced cancer with feeder cells from healthy volunteers. *Cytotherapy* **15**, 231–241 (2013).
86. Levin, A. M. *et al.* Exploiting a natural conformational switch to engineer an interleukin-2 ‘superkine’. *Nature* **484**, 529–533 (2012).
87. Lundqvist, A., Berg, M., Smith, A. & Childs, R. W. Bortezomib treatment to potentiate the anti-tumor immunity of ex-vivo expanded adoptively infused autologous natural killer cells. *Journal of Cancer* **2**, 383–385 (2011).
88. Childs, R. W. & Berg, M. Bringing natural killer cells to the clinic: ex vivo manipulation. *Hematology / American Society of Hematology. Education Program* **2013**, 234–246 (2013).
89. Sharma. The Future of Immune Checkpoint 4. **348**, (2015).
90. Romagné, F. *et al.* Preclinical characterization of 1-7F9, a novel human anti-KIR receptor therapeutic antibody that augments natural killer-mediated killing of tumor cells. *Blood* **114**, 2667–2677 (2009).
91. Braud, V. M. *et al.* HLA-E binds to natural killer cell receptors CD94/NKG2A, B and C. *Nature* **391**, 795–799 (1998).
92. López-Botet, M., Llano, M. & Ortega, M. Human cytomegalovirus and natural killer-mediated surveillance of HLA class I expression: a paradigm of host-pathogen adaptation. *Immunol. Rev.* **181**, 193–202 (2001).
93. Nguyen, S. *et al.* HLA-E upregulation on IFN- γ -activated AML blasts impairs CD94/ NKG2A-dependent NK cytotoxicity after haplo-mismatched hematopoietic SCT. *Bone Marrow Transplantation* **43**, 693–699 (2009).
94. Talebian Yazdi, M. *et al.* The positive prognostic effect of stromal CD8+ tumor-infiltrating T cells is restrained by the expression of HLA-E in non-small cell lung carcinoma. *Oncotarget* **7**, 3477–3488 (2016).
95. Pesce, S. *et al.* Identification of a subset of human natural killer cells expressing high levels of programmed death 1: A phenotypic and functional characterization. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **139**, 335-346.e3 (2017).
96. Das, R. *et al.* Combination therapy with anti-CTLA-4 and anti-PD-1 leads to distinct immunologic changes in vivo. *J. Immunol.* **194**, 950–959 (2015).
97. Anderson, A. C. Tim-3: an emerging target in the cancer immunotherapy landscape. *Cancer Immunol Res* **2**, 393–398 (2014).
98. Zhou, Q. *et al.* Coexpression of Tim-3 and PD-1 identifies a CD8 γ T-cell exhaustion phenotype in mice with disseminated acute myelogenous leukemia. *Blood* **117**, 4501–4510 (2013).

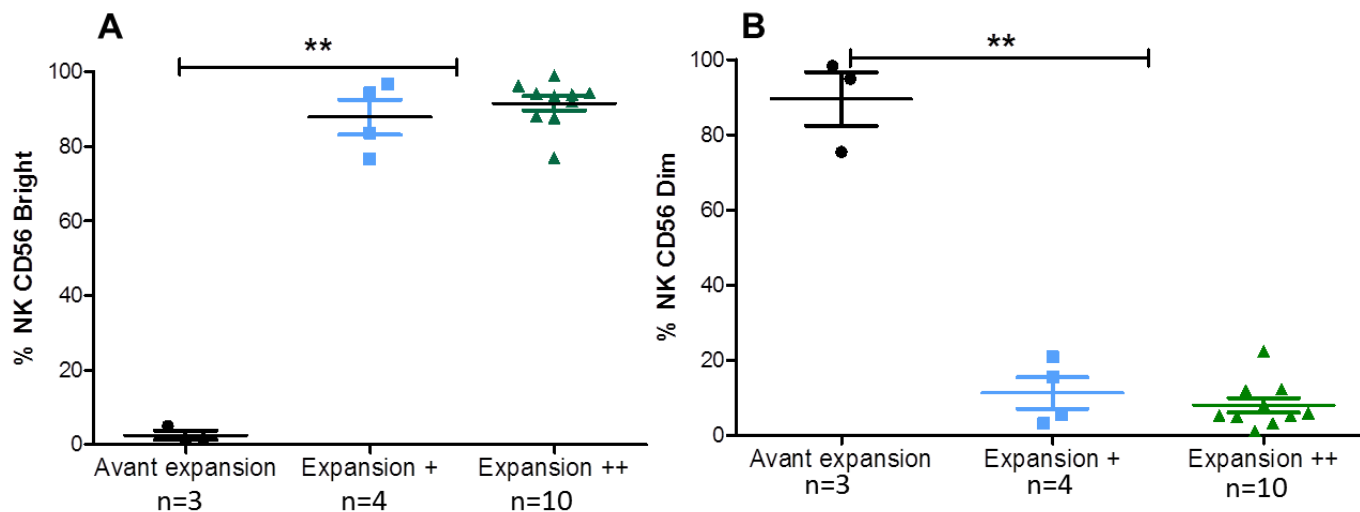
99. Fauriat, C. *et al.* Estimation of the Size of the Alloreactive NK Cell Repertoire: Studies in Individuals Homozygous for the Group A KIR Haplotype. *The Journal of Immunology* **181**, 6010–6019 (2008).
100. Roberto, A. *et al.* The early expansion of anergic NKG2Apos/CD56dim/CD16neg natural killer cells represents a therapeutic target in haploidentical haematopoietic stem cell transplantation. *Haematologica* haematol.2017.186619 (2018). doi:10.3324
101. Pical-Izard, C. *et al.* Reconstitution of Natural Killer Cells in HLA-Matched HSCT after Reduced-Intensity Conditioning: Impact on Clinical Outcome. *Biology of Blood and Marrow Transplantation* **21**, 429–439 (2015).
102. Nguyen, S. *et al.* NK-cell reconstitution after haploidentical hematopoietic stem-cell transplantations: Immaturity of NK cells and inhibitory effect of NKG2A override GvL effect. *Blood* **105**, 4135–4142 (2005).
103. Veuillen, C. *et al.* Primary B-CLL resistance to NK cell cytotoxicity can be overcome in vitro and in vivo by priming NK cells and monoclonal antibody therapy. *Journal of Clinical Immunology* **32**, 632–646 (2012).
104. Uhrberg, M. *et al.* Human diversity in killer cell inhibitory receptor genes. *Immunity* **7**, 753–763 (1997).

Annexe 3 : Stratégie de fenêtrage en cytométrie de flux (BD LSRII®).



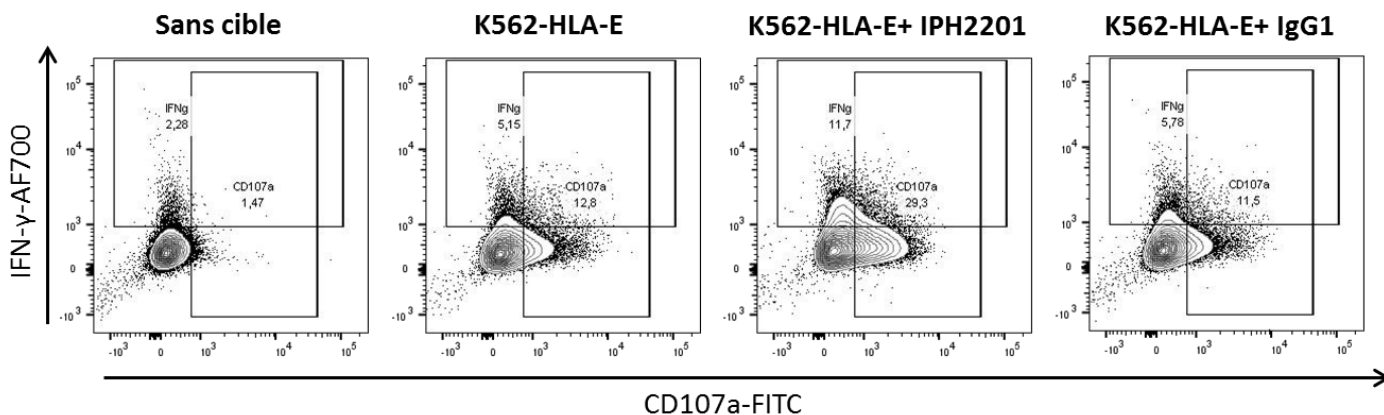
On sélectionne les lymphocytes en fonction de leur taille (FSC) et de leur granulosité (SSC) sur le graphe SSC/FSC, puis on élimine les doublets cellulaires et on sélectionne les cellules vivantes aqua-. Le marqueur CD3 permet d'exclure les lymphocytes T CD3+. Les cellules NK sont définies par l'expression de CD56 et l'absence de CD3. Les sous populations de cellules NK plus ou moins matures sont mises en évidence grâce à l'intensité du marqueur CD56 et aux marqueurs CD16, NKG2A, CD57 et KIR. On peut aussi mesurer l'intensité d'expression de certains récepteurs inhibiteurs par rapport à un isotype contrôle.

Annexe 4: Profil de maturation NK.



A : population CD56 fortement exprimé ; B : population CD56 faiblement exprimé

Annexe 5 : Stratégie de fenêtrage en cytométrie de flux (BD LSRII®) des tests fonctionnels de blocage.



Mesure en pourcentage de la dégranulation (CD107a) et de la sécrétion d'IFN-γ de la population de cellules NK expansées sans présentation d'une cible, face à une cible K562-HLA-E +/- ajout d'IPH2201 (anticorps bloquant NKG2A) ou d'un isotype contrôle IgG1.

SERMENT DE GALIEN

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

- ❖ D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.*
- ❖ D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.*
- ❖ De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine, de respecter le secret professionnel.*
- ❖ En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.*

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

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

MANIPULATION DE CELLULES NATURAL KILLER EXPANDUES: UN OUTIL THERAPEUTIQUE DANS LES HEMOPATHIES MALIGNES EN POST ALLOGREFFE DE CELLULES SOUCHES HEMATOPOÏÏTIQUES.

L'immunothérapie anti-cancéreuse par infusion de cellules NK expandues *ex-vivo* ou par administration d'agents pharmacologiques augmentant la sensibilité des cellules tumorales à la lyse par les cellules NK est en plein essor. De nombreux protocoles d'expansion *ex-vivo* de cellules NK ont été décrits avec des taux d'expansion variables. Toutefois, peu d'études se sont focalisées sur le phénotype dont l'expression des récepteurs inhibiteurs et sur les fonctions des cellules NK résultantes. Dans notre étude, nous avons mis au point une méthode d'expansion de cellules NK avec des cellules supportrices K562 irradiées et un cocktail de cytokines IL-2, IL-15 et IL-21 afin d'étudier le phénotype et la fonctionnalité des cellules expandues. Nous avons mis en évidence une augmentation de l'expression de récepteurs inhibiteurs à la surface des cellules NK expandues, en particulier NKG2A et TIM-3. La surexpression de ces deux molécules, ciblées par des anticorps bloquants en développement clinique, nous a amené à mesurer la dégranulation et la sécrétion de cytokines IFN- γ et TNF- α des cellules NK expandues face à des cibles exprimant les ligands de ces récepteurs. Nous avons montré une baisse des fonctions cytotoxiques des cellules NK expandues face à une cible exprimant HLA-E, ligand de NKG2A, ainsi qu'une restauration de ces fonctions après blocage par un anti-NKG2A. Ces résultats constituent le support de prochains travaux de recherche associant un produit cellulaire NK de grade clinique avec un médicament d'immunothérapie potentialisant l'activité anti-leucémique de ces cellules.

Mots clés : cellules NK, expansion *ex vivo*, récepteurs inhibiteurs, anticorps bloquants.