



Thèse de Doctorat

Cynthia CHAUVIN-FLEURENCE

Mémoire présenté en vue de l'obtention du **grade de Docteur de l'Université de Nantes** sous le sceau de l'Université Bretagne Loire

École doctorale : 502 Biologie Santé

Disciplines : *Immunologie, Cancérologie* **Spécialité :** *Biologie des organismes* **Unité de recherche :** *CRCINA Inserm U1232*

Soutenue le 19 septembre 2017

Thérapie Cellulaire Adoptive pour le Glioblastome Multiforme Analyse des cibles tumorales et de leur reconnaissance par les lymphocytes T Vγ9Vδ2

JURY

Président du jury :	Pr Daniel OLIVE, PU-PH, CRCM - INSERM U891 - Institut Paoli-Calmettes, Marseille
Rapporteurs :	Dr Naomi TAYLOR, DR INSERM, IGMM - CNRS U5535, Montpellier Pr François GHIRINGHELLI, PU-PH, INSERM U1231 - Centre Georges Francois Leclerc, Dijon
Examinateurs :	Dr Joëlle GASCHET, MCU, CRCINA - INSERM U1232 - IRS-UN, Nantes Pr Daniel OLIVE, PU-PH, CRCM - INSERM U891 - Institut Paoli-Calmettes, Marseille
Directeur de thèse :	Dr Emmanuel SCOTET, DR INSERM, CRCINA - INSERM U1232 - IRS-UN, Nantes
Co-directeur de thèse :	Dr Claire PECQUEUR, CR CNRS, CRCINA - INSERM U1232 - IRS-UN, Nantes

Remerciements

Je remercie le **Dr Naomi Taylor** et le **Pr François Ghiringhelli** pour avoir accepté d'évaluer ce travail de thèse en tant que rapporteurs.

Je remercie également le **Dr Joëlle Gaschet** et le **Pr Daniel Olive** d'avoir accepté d'examiner mon travail.

Je souhaite ensuite remercier mes directeurs de thèse, les **Dr Claire Pecqueur** et **Dr Emmanuel Scotet**, pour leur soutien et la confiance qu'ils m'ont accordés durant ces trois années. Vous avez su rendre ce travail collaboratif possible tout en me permettant de développer mes connaissances scientifiques, chacun apportant sa pierre à l'édifice. Travailler sous votre supervision a été la meilleure chose pour faire avancer ce projet et je vous en remercie.

Merci au **Dr Ulrich Jarry**, qui a également fait partie de l'aventure, m'apprenant notamment à vaincre mon appréhension des souris et à maîtriser la stéréotaxie. Je te remercie pour ta patience, ton soutien, ton enthousiasme, tes conseils et ta bonne humeur. Même après ton départ, nos longues heures de discussion m'ont beaucoup apporté. J'espère sincèrement que nous aurons l'occasion de retravailler ensemble dans les années futures.

Je souhaite ensuite remercier mes amies du labo sans qui rien n'aurait été pareil : **Marion**, **Charlotte**, **Dihia** et **Floriane**. Nous avons partagé des moments forts au cours de ces quatre dernières années et votre précieux soutien a beaucoup compté. Je vous souhaite le meilleur pour la suite, aussi bien dans la vie professionnelle qu'en dehors, vous le méritez !!! La rédaction de cette thèse marque la fin d'une belle aventure avec vous les filles, mais également le début d'une nouvelle en post-doctorat...

Merci à l'ensemble des membres de **l'équipe 9** et plus particulièrement au **Dr François Vallette** pour m'avoir accueilli dans son équipe, à **Lisa** pour m'avoir formée à la manipulation des cultures primaires, à **Catherine** pour m'avoir initiée à la biologie moléculaire, et à **Vincent** et **Fanny** pour leur humour et leur bonne humeur.

Je remercie également l'ensemble des membres de l'équipe 1 et plus particulièrement Noémie, Laura, Jeanne, Laëtitia, Mélinda, Jocelyn, Lola, Fabienne, Marie-Claude, Marie-Claire, Régine, Béatrice, Richard, Henri et Xavier. Je remercie également Catherine et Christelle qui ont participé à ce travail.

Merci aux collègues que l'on ne croise qu'à l'animalerie pour l'aide qu'ils m'ont apporté : **Thibauld**, **Séverine**, **Nathalie** et les **animaliers**.

Un grand merci aux amis scientifiques ou non pour leur soutien : Tatiana, Mathieu, Stéphane, Hélène, Guillaume, bébé Valentin et tous les autres.

Merci à mon grand-père, à ma famille, et à ma belle famille pour leur bienveillance.

Je ne remercierai jamais assez mes **parents**, sans qui rien de tout cela n'aurait été possible. Merci d'avez toujours cru en moi, de m'avoir soutenue et encouragée durant toutes ces années, jours après jours...

Enfin, merci à Julien qui a littéralement illuminé ma vie...

À Julien, À mes parents, À mes directeurs de thèse,

Sommaire

Table des illustrations	4
A. Figures	4
R Tableaux	5
D. Tableaux	
Abréviations	6
	-
Introduction	9
L Le Gliablastome Multiforme	10
A La Système Newyoux Control	10
A. Le Système Nerveux Central	10
A.1. Generalites	10
A.2. Eléments cellulaires du système nerveux central	10
A.2.1. Les neurones	10
A.2.2. Les cellules gliales	11
B. Les tumeurs cérébrales	12
B.1. Les gliomes	12
B.2. Le glioblastome multiforme (GBM)	13
B.2.1. Epidémiologie	13
B.2.2. Étiologie et facteurs de risques	14
B.2.3. Physiopathologie et classifications moléculaires	15
B.2.3.a. Caractéristiques histopathologiques	15
B.2.3.b. Classifications moléculaires des GBM	16
i. Classification de l'OMS	16
ii. Autres classifications moléculaires	17
B.2.4. Diagnostic	18
B.2.4.a. Symptômes cliniques	18
B.2.4.b. Neuro-imagerie	18
D.2.4.C. Anaiomopainoiogie ei oiomarqueurs P 2.5. Duise on chauge théagneutique	19
D.2.J. Frise en charge inerapeulique B 2 5 a Résection chirurgicale	19
i Ftendue de l'exérèse et survie	20
ii. Aides techniques	20
B.2.5.b. Radiothérapie	22
B.2.5.c. Chimiothérapie	22
B.2.5.d. Particularité des sujets âgés	23
B.2.5.e. Prise en charge de la récidive	24
B.2.6. Causes de l'échec thérapeutique	24
B.2.6.a. Infiltration et agressivité	24
B.2.6.b. Barrière hémato-encéphalique (BHE)	24
B.2.6.c. Heterogeneite moleculaire intra-tumorale	23
D.2.0.0. Centules souches cancereuses B 2.6 e. Micro-environnement tumoral	25
	27
II. L'immunothérapie anticancéreuse	. 29
A. Le système immunitaire contre le cancer	29
A.1. Généralités	29
A.1.1. Un peu d'histoire	29
A.1.2. Réponses immunitaires	30
A.1.3. Rôles du système immunitaire contre le cancer	30
A.1.4. Concept d'immuno-édition de la tumeur	31
A.2. Immunité et glioblastome multiforme	32
A.2.1. Immunologie du système nerveux central	32
A.2.2. Système immunitaire et glioblastome multiforme	33
A.2.2.a. Présentation antigénique	33
A.2.2.b. Infiltrat immunitaire	34
A.2.2.c. Subversion du système immunitaire	34
i. Lymphocytes T régulateurs	34
ii. Microglie et macrophages	34

iii. Cellules myéloïdes suppressives	
A.2.2.d. Micro-environnement immunosuppresseur	
B. L'immunothérapie ciblant le GBM	
B.1. Principe	
B 2 L'immunothéranie active	38
B 2 1 La vaccination	39
B 2 1 a Vaccing pentidiaues ciblant le GRM	30
i. Vaccins anti-EGFRvIII	
<i>ii. Vaccins anti-IDH1</i> ^{R132H}	
iii. Vaccins multipeptidiques	40
B.2.1.b. Vaccins utilisant les cellules dendritiques	
B.2.2. Immunothérapies actives aspécifiques	
B.2.2.a. Cytokines immunostimulatrices	
B.2.2.b. Inhibiteurs du métabolisme immunosuppresseur	
B.2.2.c. Anticorps immunomodulateurs	
B.3. L'immunothérapie passive	43
B.3.1. Virothérapie oncolytique	
B.3.2. Anticorps thérapeutiques	
B.3.3. Thérapie cellulaire adoptive	
B.3.3.a. Transfert adoptif de cellules immunitaires autologues	
B.3.3.b. Transfert adoptif de cellules génétiquement modifiées	
i. Ingénierie des TCR	
<i>ii. Récepteurs chimériques (CAR)</i>	
III. Les lymphocytes Τ Vγ9Vδ2	
A Généralités	50
Δ 1 Ontogenèse	51
A.1. Ontogenese	
A.2. Equations of the LT $V\gamma\gamma\gamma V$	
A.3. Fonctions effectrices des L1 $\sqrt{\gamma}$ 9 $\sqrt{62}$	
A.3.1. Pleiotropie fonctionnelle	
A.3.2. Plasticite cellulaire	
B. Réactivité des lymphocytes T Vγ9Vδ2	
B.1. Phosphoantigènes	56
B.2. Reconnaissance des phosphoantigènes par le TCR V γ 9V δ 2	58
B.3. Autres molécules modulatrices de l'activation des LT Vγ9Vδ2	60
B.3.1. Aminobisphosphonates et alkylamines	
B.3.2. Récepteurs des cellules NK.	
B.3.3. Cytokines	
B.3.4. Toll-like récepteurs	
B.3.5. Récepteurs Fc	
B.3.6. Molécules d'adhésion	
C. Lymphocytes T Vy9Vo2 contre le cancer	64
C 1 Propriétés anti-tumorales des LT V γ 9V δ 2	64
C_2 I T V ₂ 9V δ^2 et immunothéranies anti-cancéreuses	65
\mathbf{W} Objectifs des traveux de resperabe	
IV. Objectils des travaux de recherche	
Résultats	69
Dartia 1.	
<u>rainer</u> .	
Caracterisation des cultures primaires de GBNI	_
et développement de modèles murins	
A. Article 1 : « Efficient mitochondrial glutamine targeting	
prevails over GBM metabolic plasticity »	70
B. Résultats complémentaires sur les modèles murins	
r · · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	•••••••••••••••••••••••••••••••••••••••

Partie 2 :

Faisabilité préclinique d'une immuno-thérapie associant le transfert	
adoptif de LT Vγ9Vδ2 allogéniques au zolédronate pour le GBM	
<u>Article 2</u> : « Stereotaxic administrations of allogeneic human $V\gamma 9V\delta 2$ T cells	0.0
efficiently control the development of human glioblastoma brain tumors »	
Partie 3 :	
Etude de la réactivité naturelle des LT Vγ9Vδ2 allogéniques	
vis-à-vis de cultures primaires de GBM	
A. Reconnaissance et élimination sélective des cultures primaires de GBM	
de signature moléculaire mésenchymateuse	107
B. Hétérogénéité des populations de LT Vγ9Vδ2 allogéniques	109
C. <u>Article 3</u> : « IL-21 increases the reactivity of allogeneic human $V\gamma 9V\delta 2$ T ce	lls
against primary glioblastoma tumors »	112
 Identification des voies moléculaires impliquées dans la réactivité naturel des LT Vγ9Vδ2 allogéniques contre les cultures primaires de GBM A. Implication du récepteur NKG2D et du TCR Vγ9Vδ2 dans la reconnaissance naturelle des cultures primaires de GBM B. Analyses fonctionnelles de clones générés à partir d'une population de LT Vγ9Vδ2 naturellement réactive 	lle 128 128
Experimental procedure for unpublished data	
Discussion	
Références bibliographiques	
Annexes	
<u>Article 4</u> : « Adoptive transfer by stereotaxy of cytotoxic immune cells in murine models of orthotopic human glioblastoma multiforme xenografts »	

Table des illustrations

A. Figures

Figure 1 : Les différents types cellulaires composant le SNC au niveau de l'encéphale	11
Figure 2 : Distribution des gliomes primaires du SNC et du cerveau par sous-types histologiques .	13
Figure 3 : Taux d'incidence spécifique à l'âge des patients atteints de GBM au diagnostic	14
Figure 4 : IRM cérébrale d'un patient atteint de GBM	19
Figure 5 : Effet de la qualité de la résection chirurgicale sur la survie des patients atteints de GBM	20
Figure 6 : Exérèse guidée par fluorescence d'un patient atteint de GBM	21
Figure 7 : Prise en charge thérapeutique conventionnelle des patients atteints de GBM	22
Figure 8 : Effet du TMZ sur la survie des patients atteints de GBM et traités par radiothérapie	23
Figure 9 : Différences entre les cellules souches cancéreuses (CSC) et les cellules tumorales « clas	ssiques » 26
Figure 10 : Les trois phases de l'immuno-édition : « échappement », « équilibre » et « échappeme	nt »32
Figure 11 : Subversion du SI par les cellules de GBM et micro-environnement immunosuppresseu	ır
Figure 12 : Différentes approches immunothérapeutiques possibles pour le traitement du GBM	
Figure 13 : Vaccination thérapeutique anti-GBM basée sur l'injection de cellules dendritiques auto	ologues 41
Figure 14 : Génération de cellules immunitaires cytotoxiques autologues en vue d'un transfert adoptif chez un patient atteint de GBM	45
Figure 15 : Comparaison entre les structures d'un récepteur TCR modifié génétiquement et d'un récepteur chimérique CAR	47
Figure 16 : Réponses immunitaires innées et adaptatives	
Figure 17 : Proposition des principales étapes à l'origine du répertoire Vγ9Vδ2 chez l'adulte avec sélection et expansion thymique puis extra-thymique	
Figure 18 : Recombinaison et épissage de l'ARNm générant la chaîne du TCR Vγ9-JP-C1	53
Figure 19 : Principales fonctions effectrices des LT $\gamma\delta$	54
Figure 20 : Synthèse des précurseurs isoprénoïdes chez les vertébrés et les micro-organismes	57
Figure 21 : Trois mécanismes d'action hypothétiques pour l'induction de l'activation des LT Vγ9Vδ2 par les pAg	60
Figure 22 : Structures moléculaires du pamidronate et du zoledronate	61
Figure 23 : Développement de modèles murins de tumeurs cérébrales humaines	94
Figure 24 : Selective recognition and elimination of mesenchymal primary GBM cultures	

Figure 25 :	Allogeneic PBMC-derived $V\gamma 9V\delta 2$ T lymphocytes display heterogeneous reactivity towards primary GBM cultures	110
Figure 26 :	Adoptively-transferred allogeneic PBMC-derived Vγ9Vδ2 T lymphocytes slightly reduce invasive primary GBM tumor progression <i>in vivo</i>	111
Figure 27 :	Mesenchymal primary GBM cultures highly express NKG2D ligands	129
Figure 28 :	Natural elimination of mesenchymal GBM-1 cells through TCR $\gamma\delta$ and NKG2D pathways	131
Figure 29 :	Reactivity of T cell clones from the polyclonal and naturally reactive L2 V γ 9V δ 2 T cells	133
Figure 30 :	$V\gamma 9V\delta 2$ T cell clone C15 spontaneously eliminates GBM-1 culture through TCR $\gamma\delta$ and NKG2D pathways	134
Figure 31 :	Voies moléculaires montrées au cours de cette étude comme étant impliquées dans la lyse des cultures primaires MES par les LT Vγ9Vδ2	143
Figure 32 :	Protocole clinique hypothétique basé sur le transfert adoptif de LT $V\gamma 9V\delta 2$ allogéniques dans le cas du traitement de patients atteints de GBM	147

B. Tableaux

Tableau 1 : Principales caractéristiques des GBM IDH-sauvages ou IDH-mutés	17
Tableau 2 : Le différents sous-types de GBM	18
Tableau 3 : Exemples de phosphoantigènes caractérisés capables d'induire l'activation des LT Vγ9Vδ2	58
Tableau 4 : Primers used in RT-qPCR.	136

Abréviations

5-ALA	Acide 5-aminolévulinique			
¹¹¹ In	indium 111			
ABCA1	ATP-binding cassette transporter A1			
ABP	aminobisphosphonate			
ADCC	antibody-dependent cellular cytotoxicity			
ADN	acide désoxyribonucléique			
ANSM	Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de santé			
ARN	acide ribonucléique			
ATRX	ATP-dependent helicase ATRX			
BCR	B cell receptor			
BHE	barrière hémato-encéphalique			
BrHPP	bromohydrin IPP			
BTN3A1	butyrophiline 3 A1			
CAR	chimeric antigen receptor			
CBTRUS	Central Brain Tumor Registry of the United States			
CCL2	C-C ligand 2			
CCR7	CC-chemokine receptor 7			
CD	cluster de différenciation			
CDP ME	4-diphosphocytidyl méthylerythritol			
CIRC	Centre International de Recherche sur le Cancer			
СМН	complexe majeur d'histocompatibilité			
CNP	classique/neural/proneural			
CPA	cellule présentatrice d'antigène			
CSC	cellules souches cancéreuses			
CTLA-4	cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4			
CXCL13	CXC-chemokine ligand 13			
DAMP	danger-associated molecular patterns			
DMAPP	dimethylallyl pyrophosphate			
DOXP	deoxyxylulose-5 - phosphate			
EC ₅₀	concentration efficace médiane			
EFS	Etablissement Français du Sang			
EGFR	epidermal growth factor receptor			
EGFRvIII	epidermal growth factor receptor variant III			
FPP synthase	farnesyl pyrophosphate synthase			

GBM	glioblastome multiforme		
GLN	glutamine		
GM-CSF	granulocyte-macrophage colony-stimulating factor		
GMP	good manufacturing practices		
GVHD	graft-versus-host disease		
HIF1-α	hypoxia inducible factor 1 - α		
HLA	human leukocyte antigen		
HMBPP	hydroxymethylbutenyl 4 - diphosphate		
HMG-CoA	hydroxyméthylglutaryl-CoA		
ICAM-1	intercellular adhesion molecule-1		
ICOS	inducible T-cell costimulator		
IDH	isocitrate déshydrogénase		
IDO	indoleamine 2,3-dioxygénase		
IFN	interféron		
Ig	immunoglobuline		
IL	interleukine		
ILT-2	Ig-like transcript 2		
IPP	isopenthenyl pyrophosphate		
IRM	imagerie par résonnance magnétique		
LAK	lymphokine-activated killer cells		
LCS	liquide cérébro-spinal		
LDA	limiting dilution assay		
LFA-1	lymphocyte function-associated antigen 1		
LT	lymphocyte T		
LTreg	lymphocyte T régulateur		
MDSC	myeloïd-derived suppressor cells		
MEcPP	méthylerythritol cyclodiphosphate		
MEP	methylerythritol phosphate		
MES	cellules mésenchymateuses		
MGMT	méthylguanine méthyltransférase		
MICA/B	MHC class I polypeptide-related sequence A/B		
MMAF	monomethyl auristatin F		
MVA	mévalonate		
MVAP	5-phosphomévalonate		
MVAPP	mévalonate-5-diphosphate		
NK	natural killer		
NKG2D	natural killer group 2, member D		

NKR	récepteur des cellules NK		
NKT / iNKT	natural killer T cell / invariant natural killer T cell		
ns	non spécifique		
NSG	NOD.Cg-PrkdcScid Il2rgtm1Wjl/SzJ		
NO	oxyde nitrique		
OMS	Organisation Mondiale de la Santé		
pAg	phosphoantigène		
PAMP	pathogen-associated molecular patterns		
PBMC	peripheral blood mononuclear cell		
PD-1	programmed cell death-1		
PDL-1	programmed cell death ligand-1		
PGE ₂	prostaglandine E2		
РРР	polyprényl diphosphate		
PTEN	phosphatase and TENsing homolog		
RCP	Réunion de Concertation Pluridisciplinaire		
ROS	reactive oxygen species		
RT-PCR	real-time polymerase chain reaction		
scFv	single-chain variable fragment		
SI	système immunitaire		
SNC	système nerveux central		
SPF	specific-pathogen-free		
TAM	tumor associated macrophages		
TCGA	The Cancer Genome Atlas		
TCR	T cell receptor		
TERT	telomerase reverse transcriptase		
TGF-β	transforming growth factor- β		
TIL	tumor-infiltrating lymphocytes		
TLR	toll-like receptors		
TMZ	témozolomide		
TNF	tumor necrosis factor		
TP53	tumor supressor p53		
TRAIL	TNF-related apoptosis inducing ligand		
ULBP	UL16 binding protein		
VEGF	vascular endothelial growth factor		
VIH	virus de l'immunodéficience humaine		

Introduction

I. Le Glioblastome Multiforme

A. Le Système Nerveux Central

A.1. Généralités

Le Système Nerveux Central (SNC) joue un rôle essentiel en intégrant les informations qui parviennent de l'organisme et en coordonnant l'ensemble de ses activités. Il est constitué de deux entités étroitement liées : (i) l'encéphale qui comprend le cerveau, le cervelet et le tronc cérébral situés dans la boîte crânienne ; (ii) la moelle épinière située dans le canal rachidien et qui prolonge le tronc cérébral et le bulbe rachidien pour s'étendre jusqu'à la région lombaire. L'ensemble du SNC est protégé par une triple couche protectrice membraneuse appelée « méninges ». De plus, une barrière cellulaire hautement sélective et semi-perméable sépare et isole physiologiquement l'encéphale du sang périphérique tout en maintenant l'homéostasie, en permettant le passage de nutriments et en évacuant les déchets respectivement depuis et vers la circulation générale. Cette barrière hémato-encéphalique (BHE) est constituée de trois types cellulaires principaux : (i) les cellules endothéliales qui tapissent les capillaires sanguins sont liées entre elles par des jonctions serrées composées d'occludines et de claudines ne laissant pénétrer que des petites molécules <400 Daltons (Da), et interagissent étroitement avec (ii) les astrocytes et (iii) les péricytes (Papademetriou et Porter 2015). La BHE assure un rôle fondamental en restreignant sélectivement le passage des solutés (via des transports actifs) et en protégeant le SNC contre la plupart des pathogènes et des molécules potentiellement toxiques.

A.2. Eléments cellulaires du système nerveux central

A.2.1. Les neurones

Les neurones sont des cellules automatiquement et physiologiquement spécialisées dans la réception, l'intégration et la transmission d'informations. Ce rôle complexe nécessite la mise en place de réseaux multiples, ordonnés et hiérarchisés, chargés de recevoir et de transmettre des signaux ou de coordonner des fonctions. L'activité cellulaire des neurones est entièrement dédiée à leurs fonctions de récepteurs et de transmetteurs d'informations.

A.2.2. Les cellules gliales

En plus des neurones, le SNC est constitué d'un tissu de soutien et de cellules nourricières jouant un rôle clé dans la protection ainsi que le maintien de l'homéostasie : les cellules gliales (ou neuroglie). Elles assurent le lien avec les vaisseaux sanguins et apportent des nutriments essentiels au fonctionnement métabolique du SNC.



Figure 1 : Les différents types cellulaires composant le SNC au niveau de l'encéphale. Les neurones interagissent avec les cellules gliales (astrocytes, oligodendrocytes, cellules épendymaires et microglie) qui assurent un rôle essentiel dans la protection et le maintien de l'homéostasie du SNC (LCS : liquide cérébrospinal).

Il existe quatre types de cellules gliales (Figure 1):

- Les **astrocytes** sont les cellules majoritaires de l'encéphale et assurent en plus de leur fonction de soutien, le support métabolique et la synthèse des principaux constituants du SNC. De forme étoilée, ces cellules n'ont pas de rôle direct dans la transmission de l'influx nerveux mais jouent un rôle essentiel dans le maintien de l'homéostasie du milieu extracellulaire assuré par la BHE. En effet, leurs prolongements en contact direct avec les lames basales des capillaires sanguins présentent des jonctions serrées qui s'opposent à la libre pénétration de liquides et substances intra-vasculaires en provenance de la circulation générale.
- Les oligodendrocytes ont pour rôle principal l'élaboration de la myéline entourant les axones des neurones, permettant d'augmenter la vitesse de propagation ainsi que la fréquence des influx nerveux pour délivrer un signal plus rapide et plus efficace.

- Les cellules épendymaires sont des cellules épithéliales cylindriques ou cubiques qui bordent les cavités ventriculaires de l'encéphale et le canal central de la moelle épinière (canal de l'épendyme). Elles ont pour fonction de sécréter le liquide cérébro-spinal (LCS) et de le faire circuler via leurs cils apicaux. Elles jouent également un rôle important dans les échanges entre le LCS et le parenchyme cérébral.
- Les **cellules microgliales** sont des cellules étoilées de petite taille ayant pour rôle d'assurer l'immunité du SNC via notamment leur capacité de phagocytose.

B. Les tumeurs cérébrales

Le terme de « tumeurs cérébrales » désigne l'ensemble des tumeurs bénignes et malignes se développant dans le parenchyme cérébral. Elles surviennent suite à des divisions cellulaires anormales, incontrôlées et anarchiques, qui conduisent au développement soit d'une tumeur dite « primaire » si la cellule initiale est une cellule cérébrale, soit d'une tumeur « secondaire » s'il s'agit de l'évolution d'une autre tumeur cérébrale primaire ou encore de métastases cérébrales, liées à la dissémination d'un autre cancer.

B.1. Les gliomes

Les gliomes sont les tumeurs cérébrales malignes les plus fréquentes puisqu'elles en représentent 80% (Ostrom et al. 2015), et trouvent leur origine dans la transformation maligne de cellules gliales ou de cellules précurseurs.

L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) propose en 2007 une classification des gliomes en fonction du type cytologique majoritaire et de critères histologiques de malignité tels que la densité cellulaire, l'atypie nucléaire, la prolifération vasculaire ou encore la nécrose (Louis et al. 2007). Quatre grades de malignité sont décrits, depuis le gliome « bénin » de grade I jusqu'aux gliomes les plus agressifs de grade IV.

Les gliomes sont classés en 4 sous-groupes suivant leur origine cellulaire (Figure 2) :

 Les astrocytomes représentent 75% des gliomes et sont issus des astrocytes. Ils sont eux-mêmes divisés en 4 grades : astrocytome pilocytique (grade I), astrocytome diffus (grade II), astrocytome anaplasique (grade III) et glioblastome multiforme (grade IV).

- Les oligodendrogliomes (grade II et III) dérivent des oligodendrocytes.
- Les oligo-astrocytomes (grade II et III) sont des tumeurs mixtes combinant les caractéristiques des deux précédents types de gliomes.
- Les épendymomes (grades I à III) sont issus des cellules épendymaires.



Figure 2 : Distribution des gliomes primaires du SNC et du cerveau par sous-types histologiques. Adapté du rapport statistique américain CRTRUS 2008-2012, portant sur 97 910 patients (Ostrom et al. 2015).

B.2. Le glioblastome multiforme (GBM)

Le glioblastome ou astrocytome de grade IV, est la tumeur cérébrale la plus agressive et la plus fréquente puisqu'elle représente plus de 55% des gliomes (**Figure 2**) (Ostrom et al. 2015). Le glioblastome est dit « multiforme » ou polymorphe du fait de son hétérogénéité avec d'importantes variabilités morphologiques, cytologiques et moléculaires. De par leur fréquence et leur gravité, les GBM constituent un enjeu thérapeutique majeur.

B.2.1. Epidémiologie

L'incidence du GBM en France est estimée à 4 GBM pour 100 000 hab/an (Zouaoui et al. 2012), soit plus de 2 600 nouveaux cas diagnostiqués chaque année. Ces données sont comparables à celles obtenues aux USA par le CBTRUS (Central Brain Tumor Registry of the United States), qui décrit également une corrélation entre l'incidence du GBM et l'âge des patients, avec une incidence maximale de la pathologie survenant entre 75 et 84 ans et un âge médian au diagnostic de 64 ans (**Figure 3**). Il est également intéressant de souligner une prédominance du GBM chez les hommes (rapport de 1,6/1), chez les populations caucasiennes dans lesquelles il est deux fois plus retrouvé, ainsi que dans certaines régions

géographiques (Ostrom et al. 2015). Ces dernières sources de variabilité peuvent s'expliquer par des inégalités d'accès aux outils de diagnostic, des différences environnementales ou encore l'hétérogénéité génétique.



Figure 3 : Taux d'incidence spécifique à l'âge des patients atteints de GBM au diagnostic pour 100 000 personnes. Adapté du rapport statistique américain CRTRUS 2008-2012 (Ostrom et al. 2015).

B.2.2. Étiologie et facteurs de risques

Les facteurs de risque sont divisés en facteurs intrinsèques et extrinsèques.

Les **facteurs intrinsèques** qui augmenteraient le risque de survenue d'un GBM sont notamment l'origine ethnique (risque supérieur chez les populations caucasiennes), le sexe (homme>femme), certaines maladies génétiques (neurofibromatose de type 1/2, sclérose tubéreuse de Bourneville, syndromes de Li-Fraumeni et de Turcot) ou encore des antécédents familiaux de gliome (Ostrom et al. 2015; Reni et al. 2017).

Parmi les **facteurs** de risques **extrinsèques**, l'exposition à une radiothérapie ionisante thérapeutique durant l'enfance a été corrélée à un risque accru de développer des tumeurs cérébrales (Mathews et al. 2013). Il a également été décrit qu'une exposition intense et prolongée aux pesticides ou aux produits chimiques pouvait figurer parmi les facteurs de risques (Reni et al. 2017). Enfin, l'association entre les tumeurs cérébrales et les champs électromagnétiques reste controversée, à tel point que le Centre International de Recherche sur le Cancer (CIRC, agence de l'OMS spécialisée sur le cancer) les a classés en 2011 comme « peut-être » cancérogène pour l'homme. Une étude récente retrouve toutefois une association significative entre l'utilisation intensive du téléphone portable et la survenue d'un gliome (Coureau et al. 2014).

B.2.3. Physiopathologie et classifications moléculaires

B.2.3.a. Caractéristiques histopathologiques

Bien qu'elle soit considérée par l'OMS comme une tumeur astrocytaire, les cellules à l'origine du GBM demeurent inconnues (cellules indifférenciées, astrocytaires et/ou oligodendrogliales). Macroscopiquement, la masse tumorale est volumineuse, hémorragique, nécrotique et ses caractéristiques histopathologiques comprennent notamment le polymorphisme cellulaire, l'atypie nucléaire et l'activité mitotique. Cependant, les deux éléments histologiques majeurs restent la présence de plages de nécrose entourées de cellules proliférantes en pseudo-palissade et la prolifération endothélio-capillaire (Reni et al. 2017). En effet, la néo-angiogénèse (formation de nouveaux vaisseaux à partir de vaisseaux primitifs) est un élément d'agressivité important des GBM, traduisant leur degré de malignité. Le déclenchement de l'angiogénèse tumorale est consécutif à l'altération de l'équilibre entre les facteurs pro- et anti-angiogéniques au sein de la tumeur. L'environnement appauvri en oxygène induit par la croissance tumorale rapide, crée des zones de nécrose. En réponse à l'hypoxie, les cellules tumorales bordant la nécrose s'organisent en palissades, expriment fortement HIF1- α (hypoxia inducible factor 1- α) et secrètent du VEGF (vascular endothelial growth factor) qui diffuse dans l'environnement tumoral. Ces signaux environnementaux vont notamment stimuler la prolifération et la migration de précurseurs endothéliaux ainsi que la transdifférenciation de certaines cellules tumorales en cellules endothéliales, à l'origine du développement de néo-vaisseaux (Acker et Plate 2004). Cependant, ces vaisseaux néoformés sont anormaux, fragiles et perméables, contribuant à l'œdème péri-tumoral et à l'augmentation du risque hémorragique. De plus, l'environnement tumoral joue un rôle important dans la migration et l'invasion du tissu environnant par les cellules cancéreuses. La transformation puis la destruction du parenchyme cérébral sain dans les zones d'infiltration tumorale s'effectue via des processus protéolytiques favorables à la migration des cellules et à la croissance des tumeurs (Figarella-Branger et al. 2010). Par ailleurs, et contrairement à la majorité des cancers capables de former des métastases (cellules malignes ayant migré à distance de leur organe d'origine), les GBM récurrents se limitent le plus souvent à une localisation cérébrale, proche de la lésion initiale ou à distance après dissémination dans le parenchyme (Reni et al. 2017).

B.2.3.b. Classifications moléculaires des GBM

Les cancers sont le résultat d'altérations génétiques héréditaires ou somatiques des gènes qui contrôlent les processus biologiques critiques. Ces mutations, rarement visibles lors d'un caryotype (analyse morphologique des chromosomes), sont détectés via des méthodes d'analyses génétiques de pointe et provoquent soit l'activation d'oncogènes, soit l'inhibition des gènes suppresseurs de tumeur. L'accumulation de tels dommages à l'ADN au fil du temps permet la transformation progressive et la survie d'une population cellulaire anormale qui peut conduire à la formation de tumeurs.

i. Classification de l'OMS

Faisant suite à la classification de 2007 basée exclusivement sur des caractéristiques morphologiques subjectives, peu reproductibles, et avec de forts taux de discordance intraet inter-observateurs (Louis et al. 2007), l'OMS propose en 2016 une nouvelle classification. Cette dernière utilise pour la première fois des marqueurs moléculaires en plus de l'histologie pour définir et diagnostiquer les différents types de gliomes, y compris le GBM. Récemment, une analyse génomique intégrée des gliomes a identifié une altération clé dans la gliomagenèse, la mutation de l'isocitrate déshydrogénase 1 (ou IDH1) (Parsons et al. 2008; Yan et al. 2009). Cette mutation spécifique conduit à la modification d'un seul acide aminé (l'arginine 132 est remplacée par une histidine, IDH1^{R132H}) au niveau du site actif entraînant une altération de l'enzyme qui ne catalyse plus la conversion de l'isocitrate en α -kétoglutarate (α -KG) mais celle de l' α -KG en un oncométablite, le 2-hydroxyglutatrate (2-HG) (Rizk et al. 2017). De façon très intéressante, il a été montré que les GBM IDHsauvages (\approx 90% des cas) correspondent le plus souvent à des GBM primaires ou *de novo* qui prédominent chez les patients âgés de plus de 55 ans, tandis que les GBM IDH-mutés (\approx 10% des cas) correspondent à des GBM secondaires faisant suite à un gliome diffus de bas grade et touchant des patients plus jeunes (Tableau 1) (Louis et al. 2016; Ohgaki et Kleihues, 2013).

Tableau 1 : Principales caractéristiques des GBM IDH-sauvages ou IDH-mutés. (TP53 : *tumor supressor p53* ; ATRX : *ATP-dependent helicase ATRX* ; TERT : *telomerase reverse transcriptase* ; EGFR : *Epidermal Growth Factor Receptor* ; PTEN : *Phosphatase and TENsing homolog*) (Louis et al. 2016).

	GBM IDH-sauvages	GBM IDH-mutés
Types de tumeur	Primaires, de novo	Secondaires
Proportion des GBM	90%	10%
Age médian au diagnostic	62 ans	44 ans
Médiane de survie (suite au protocole de Stupp)	15 mois	31 mois
Altérations génétiques les plus fréquentes	 Promoteur TERT muté (72%) Amplification EGFR (35%) TP53 muté (27%) PTEN muté (24%) 	• TP53 muté (81%) • ATRX muté (71%) • Promoteur TERT muté (26%)

ii. Autres classifications moléculaires

Divers études ont été réalisées afin de classer les GBM en différents groupes de tumeurs en vue du développement d'une médecine personnalisée, avec des traitements adaptés à chaque patient. Parmi elles, l'analyse de l'expression génique à grande échelle a démontré que les profils de transcription reflètent la physiopathologie de la tumeur et peuvent être utilisés pour prédire la classification des GBM, le pronostic vital des patients, voire même leur réponse aux traitements. En effet, chaque tumeur possède son propre profil d'expression génique et donc sa propre physiopathologie. D'après plusieurs études dont celles de Phillips et al. (Phillips et al. 2006), du TCGA (The Cancer Genome Atlas) (McLendon et al. 2008) puis de Verhaak et al. (Verhaak et al. 2010), les patients atteints de GBM peuvent être regroupés selon leurs profils transcriptomiques en 3 principaux sous-types moléculaires : « mésenchymateux », « prolifératif » (qui regroupe les sous-types « classiques » et « neural ») et « proneural » (Tableau 2). Ainsi, il a été montré que les tumeurs de sous-type mésenchymateux étaient plus agressives et touchaient des patients souvent plus âgés. De plus, les patients présentant ce type de tumeur répondent de façon similaire aux thérapies permettant d'envisager à terme, le développement d'une médecine personnalisée avec des traitements plus adaptés et spécifiques à la physiopathologie de chaque sous-type. Cette classification reste néanmoins à nuancer en raison (i) de l'existence d'une hétérogénéité moléculaire intra-tumorale, avec divers sous-types pouvant être associés à une même tumeur (Sottoriva et al. 2013); (ii) de modifications de la signature moléculaire tumorale qui peuvent être observée après traitements (Halliday et al. 2014).

Sous-types moléculaires		Age au diagnostic	Altérations génétiques majeures
MESENCHYMATEUX		50,7 ± 1,3 an	Perte/mutation de NF1, TP53, PTEN Surexpression de MET, CHI3L1, CD44, MERTK Voies TNF, NFκB activées
PROLIFERATIF Classique Neural	49 ± 2.5 ans	Mutation/amplification/surexpression de <i>EGFR</i> Perte/mutation de <i>PTEN</i> Perte de <i>CDKN2A</i> Surexpression de <i>NES</i> Voies <i>Notch, Shh</i> activées	
	Neural		Amplification/surexpression de <i>EGFR</i> Signature génétique de cerveau sain Expression de marqueurs neuronaux (<i>NEFL</i> , <i>GABRA1</i> , <i>SYT1</i> , <i>SLC12A5</i>)
PRONEURAL		40,5 ± 1,4 an	Amplification PDGFRA Mutation de IDH1, PIK3A/PIK3R1 Perte ou mutation de TP53, CDKN2A, PTEN Expression de marqueurs proneuraux (SOX, DCX, DLL3, ASCL1, TCF4) Expression de marqueurs oligodendrocytiques (PDGFRA, OLIG2, TCF3 and NKX2-2) Voies HIF, PI3K, PDGFRA activées

Tableau 2 : Le différents sous-types de GBM d'après les classifications de Philips et al. 2006 et de Verhaak et al. 2010.

B.2.4. Diagnostic

B.2.4.a. Symptômes cliniques

La majorité des patients atteints de GBM sont diagnostiqués tardivement, souvent plusieurs mois après la survenue des premiers symptômes neurologiques dont il existe une grande diversité en fonction des zones cérébrales touchées et du volume de la tumeur.

Il est possible de distinguer 3 grands cadres syndromiques :

- déficits neurologiques (moteur, sensitif et/ou visuel), troubles des fonctions supérieures, cognitives et langagières ;
- syndrome d'hypertension intracrânienne lié à la croissance tumorale rapide et/ou à une réaction œdémateuse péritumorale importante, ou encore à un blocage des voies d'écoulement du LCS entraînant une hydrocéphalie obstructive ;
- épilepsie (concerne 20 à 25% des patients atteints de GBM).

B.2.4.b. Neuro-imagerie

En cas de suspicion de GBM, un scanner et une Imagerie par Résonance Magnétique (IRM) cérébrale doivent être réalisés afin de confirmer le diagnostic, localiser la tumeur et préciser ses rapports avec les structures anatomiques tout en évaluant son étendue (**Figure 4**).



Figure 4 : IRM cérébrale d'un patient atteint de GBM (image pondérée en T1 après administration de gadolinium), présentant une importante masse tumorale (zone pointillée) aux contrastes irréguliers (centre nécrotique) et entourée d'un œdème cérébral péri-tumoral (flèches) dans le lobe pariétal droit (Louis et al. 2016).

B.2.4.c. Anatomopathologie et biomarqueurs

La neuro-imagerie n'étant pas suffisamment spécifique sur le diagnostic du GBM, il est nécessaire de réaliser une analyse histologique puis moléculaire de la tumeur, soit à partir d'une biopsie tumorale (pratiquée seulement en cas de non-opérabilité), soit directement sur la pièce opératoire issue de l'exérèse tumorale (Reni et al. 2017). Cependant, l'analyse anatomopathologique manque de précision pronostique en raison de l'existence de plusieurs sous-types moléculaires au sein d'un même sous-type histologique. C'est pourquoi les biomarqueurs moléculaires prennent une place grandissante dans le diagnostic des GBM, en complément de l'analyse macro- et microscopique, puisqu'ils semblent avoir une valeur pronostique et prédictive supérieure à la classification morphologique seule (cf partie B.2.3.b). Les marqueurs biologiques recherchés en routine correspondent à la mutation de certains gènes (TP53, IDH1/2, PTEN, EGFRvIII), à des modifications chromosomiques (délétion 10q, 1p, 19q) ou à des modifications épigénétiques telles que la méthylation du promoteur du gène codant pour la MGMT (Hegi et al. 2005). L'émergence de nouveaux biomarqueurs moléculaires dans les tumeurs du cerveau profiterait à la fois au diagnostic, à la prédiction du pronostic vital et au choix du traitement pour le patient (Bush et Butowski, 2017).

B.2.5. Prise en charge thérapeutique

Le traitement conventionnel repose sur l'ablation chirurgicale de la tumeur suivie d'une radiothérapie associée à une chimiothérapie concomitante puis adjuvante au témozolomide (Stupp et al. 2005). Toutefois, les patients atteints de GBM récidivent inévitablement et leur pronostic vital demeure sombre.

B.2.5.a. Résection chirurgicale

Bien que l'élimination complète de la masse tumorale soit illusoire du fait du caractère diffus et infiltrant des GBM, la chirurgie reste l'élément clé de la prise en charge en tant que première ligne de traitement. La qualité de l'exérèse chirurgicale permet non seulement de diminuer la compression exercée par la masse tumorale, d'améliorer la qualité de vie des patients en limitant les troubles neurologiques, mais également d'augmenter sensiblement leur survie (Holland 2000).

i. Etendue de l'exérèse et survie

Chaichana *et al.* ont montré, lors d'une étude rétrospective de 2013, une meilleure survie des patients ayant subit une résection chirurgicale étendue sur plus de 70% de la masse tumorale (médianes de survie 14,4 mois *vs* 10,5 mois) et ont défini un volume tumoral résiduel « seuil » à 5 cm³ (médianes de survie < et > 5 cm³ respectivement de 15,3 mois et 11,6 mois) (**Figure 5**) (Chaichana et al. 2014).



Figure 5 : Effet de la qualité de la résection chirurgicale sur la survie des patients atteints de GBM. Pourcentage de survie des patients atteints de GBM en fonction (A) du pourcentage de résection ou (B) du volume tumoral résiduel persistant après la chirurgie. Adapté de l'étude rétrospective de Chaichana *et al.* réalisée entre 2007 et 2011, et portant sur 259 patients nouvellement diagnostiqués GBM (Chaichana et al. 2014).

Bien que tous s'accordent sur le fait que la qualité de l'exérèse influence la survie des patients, le « seuil » d'étendue de la résection à partir duquel il existe un réel bénéfice clinique n'est pas clairement établi puisqu'il serait > 90% pour Orringer et al. (Orringer et al. 2012) voire > 95% pour Lacroix et al. (Lacroix et al. 2001). Ceci peut s'expliquer notamment par le fait que ces études ont été conduites en s'appuyant sur des procédés et des temps d'imagerie postopératoires différents, mais également sur des méthodes de quantification variables, rendant les résultats difficiles à comparer et à interpréter.

ii. Aides techniques

Le neurochirurgien dispose de nombreux outils et aides techniques à la résection. Certains permettent d'apprécier les « limites » tumorales, tels que l'échographie, l'IRM ou la fluorescence peropératoires ; d'autres permettent d'identifier les structures fonctionnelles en condition endormie ou éveillée. L'exérèse guidée par fluorescence repose sur l'administration orale (3 h avant l'intervention) d'un précurseur de l'hémoglobine, l'acide 5-aminolévulinique (5-ALA), qui permet la synthèse et l'accumulation de porphyrines fluorescentes dans les cellules tumorales. Cette fluorescence est ensuite visualisée en peropératoire à l'aide d'un microscope de neurochirurgie modifié (lumière blanche et filtre UV) (Figure 6). Une étude multicentrique randomisée sur 270 patients a démontré en 2006 un taux plus élevé d'exérèses « complètes » dans le groupe « 5-ALA » (65%) que dans le groupe contrôle « lumière blanche » (36%) conduisant à une augmentation significative de la survie sans progression à 6 mois (41% vs 21,1%) avec un faible impact sur la médiane de survie (15,2 mois vs 13,5 mois) (Stummer et al. 2006). L'effet du 5-ALA reste toutefois controversé du fait que cette étude ait été réalisée peu avant la standardisation du protocole de Stupp (Weller, van den Bent, et al. 2014). De plus, il aurait été rapporté des cas non isolés de déficits neurologiques postopératoires liés à l'utilisation du 5-ALA (Stummer et al. 2011; Schucht et al. 2012, 2014).



Figure 6 : Exérèse guidée par fluorescence d'un patient atteint de GBM. (A) IRM cérébrale peropérative montrant la masse tumorale située dans le lobe frontal droit (image pondérée en T1 après administration de gadolinium). **(B)** IRM cérébrale postopérative (image pondérée en T1) montrant la résection tumorale « complète » grâce à l'utilisation de la fluorescence intraopératoire. **(C)** Vue microscopique intraopérative (lumière blanche) de la cavité de résection tumorale. **(D)** Vue microscopique intraopérative de la fluorescence tumorale (flèches) utilisant une lampe UV (Meir et al. 2010).

Afin de limiter les risques neurologiques permanents, certains auteurs suggèrent d'associer à la fluorescence des techniques de cartographies cérébrales éveillées qui permettraient d'identifier les aires fonctionnelles essentielles et contribueraient à limiter les déficits postopératoires tout en maximisant la résection tumorale (Schucht et al. 2012, 2014). Cette cartographie corticale et subcorticale peropératoire en condition éveillée permet au neurochirurgien de réséquer le parenchyme concerné par la tumeur selon des limites fonctionnelles et non plus tumorales. Ce type de chirurgie, très courant pour les gliomes de bas grade, n'est cependant pas toujours possible dans le cas du GBM qui touche souvent une population plus âgée dont les co-morbidités ou les troubles neurologiques peuvent parfois restreindre la réalisation des tests peropératoires éveillés.

B.2.5.b. Radiothérapie

Faisant suite à la chirurgie, la radiothérapie seule a longtemps été le traitement standard du GBM, avec un effet indiscutable sur la survie des patients (Laperriere et al. 2002). Sa complexité est principalement liée à la localisation de la masse tumorale au sein d'un tissu cérébral sain particulièrement sensible aux radiations ionisantes (Noël et Guillevin, 2011). Les protocoles actuels de radiothérapie externe ciblent la zone tumorale visible en IRM avec une marge de sécurité de 2-3 cm et une dose totale délivrée de 54-60 Gy en fractions de 1,8-2 Gy (Weller, van den Bent, et al. 2014). Elle est débutée 4 à 6 semaines après la chirurgie, sous réserve d'une bonne cicatrisation et est réalisée 5 jours par semaine pendant 6 semaines. Les principales complications pouvant survenir suite à la radiothérapie sont : la fatigue, l'alopécie localisée, la leucoencéphalopathie (atteinte des fibres de myéline pouvant conduire à des troubles cognitifs), et la nécrose induite par l'action des radiations ionisantes (radionécrose focale) sur le tissu sain environnant (J. Ye et al. 2016).

B.2.5.c. Chimiothérapie

Parmi les agents génotoxiques, le témozolomide (TMZ) est utilisé après la chirurgie dans le traitement standard du GBM en association avec la radiothérapie puis en monothérapie selon le protocole de Stupp (Stupp et al. 2005) (**Figure 7**). Le TMZ est administré quotidiennement par voie orale au patient (75 mg/m²) pendant toute la durée de la radiothérapie puis est maintenu (150–200 mg/m²) durant 6 cycles de 5 jours tous les 28 jours.



Figure 7 : Prise en charge thérapeutique conventionnelle des patients atteints de GBM. Le protocole de Stupp repose sur une exérèse chirurgicale suivie d'une radiothérapie (5 jrs/semaine pendant 6 semaines) et d'une chimiothérapie concomitante (quotidienne pendant 6 semaines) puis adjuvante (6 cycles de 5 jrs/28 jrs) au TMZ (Stupp et al. 2005).

L'étude multicentrique randomisée de Stupp et al. sur une cohorte de 573 patients nouvellement diagnostiqués GBM (Stupp et al. 2005), a montré un bénéfice significatif de cette association avec une augmentation de la survie des patients de plus de 2 mois par rapport à la radiothérapie seule (**Figure 8**). Toutefois, les effets secondaires du TMZ sont multiples : la fatigue, l'alopécie, les troubles digestifs, l'anorexie, les céphalées et les toxicités hématologiques telles que la lymphopénie (Weller, van den Bent, et al. 2014).



Figure 8 : Effet du TMZ sur la survie des patients atteints de GBM et traités par radiothérapie. Les médianes de survie des patients traités avec la radiothérapie seule ou en association avec le TMZ sont respectivement de 12,1 mois et 14,6 mois. Adapté de l'étude de Stupp et al. 2005 portant sur 573 patients nouvellement diagnostiqués GBM.

B.2.5.d. Particularité des sujets âgés

La prise en charge des sujets âgés occupe une place grandissante dans les pays occidentaux dont la population de plus de 65 ans pourrait augmenter de 238% d'ici 2050 (Reardon 2012). L'identification d'approches thérapeutiques adaptées aux patients de plus en plus âgés est d'autant plus importante que l'incidence du GBM augmente avec l'âge (**Figure 3**). La difficulté du choix thérapeutique réside dans le fait que les patients de plus de 65 ans présentent souvent une vulnérabilité globale accrue avec une plus forte probabilité de co-morbidités pouvant entraîner de forts taux de complications. Aussi, aucun standard thérapeutique n'est actuellement proposé pour cette tranche de population qui est le plus souvent exclue des études (Stupp et al. 2005). Même si le choix du traitement reste controversé conduisant à se questionner sur la qualité de vie ou la survie prolongée, le corps médical s'accorde sur le fait qu'il dépend avant tout de l'état général du patient. Ainsi, divers traitements peuvent être proposés : le traitement standard « maximaliste » suivant le protocole de Stupp, la radiothérapie hypofractionnée seule ou en combinaison avec la chimiothérapie, ou encore le TMZ en monothérapie (Halani, Babu, et Adamson 2017).

B.2.5.e. Prise en charge de la récidive

L'évolution des GBM est péjorative et la récidive tumorale est la règle. En l'absence de traitement, la médiane de survie des patients n'excède pas quelques mois. Avec un traitement dit « maximaliste » selon le protocole de Stupp (exérèse chirurgicale, radiothérapie et chimiothérapie), la médiane de survie est de 14,6 mois (Stupp et al. 2005) et la récidive tumorale survient en moyenne 7 mois après la chirurgie (Laws et al. 2003) avec une survie à 5 ans de 5,1% (Ostrom et al. 2015). Il n'existe pas de consensus concernant la prise en charge de la récidive (Weller, van den Bent, et al. 2014). La décision doit être discutée en réunion de concertation pluridisciplinaire (RCP) de neuro-oncologie et se base notamment sur les traitements déjà reçus par le patient, son âge, son état général, le délai de récidive et son aspect en imagerie.

B.2.6. Causes de l'échec thérapeutique

Les tumeurs cérébrales constituent une unique classe de cancers parmi les plus difficiles à traiter en raison notamment de leur localisation, de leur inclusion dans la BHE et de leur caractère infiltrant et mal délimité, marqué par une prolifération rapide et hétérogène des cellules tumorales.

B.2.6.a. Infiltration et agressivité

La présence de cellules cancéreuses hautement infiltrantes à distance du foyer tumoral initial, rend l'exérèse complète impossible. En raison du caractère disséminé et non délimité de la masse tumorale, l'acte chirurgical n'élimine qu'une partie de la tumeur et la récidive survient le plus souvent au niveau même du site de la résection, dans la zone péritumorale (Reni et al. 2017).

B.2.6.b. Barrière hémato-encéphalique (BHE)

En tant que barrière physiologique conférant une perméabilité sélective au SNC, la BHE peut être altérée dans de nombreuses pathologies et avoir d'importantes implications sur la biodistribution des traitements. Dans le contexte des tumeurs cérébrales et plus particulièrement du GBM, l'environnement tumoral pro-angiogénique conduit à la formation de néo-vaisseaux dont l'endothélium désorganisé altère les flux sanguins et réduit la perfusion des zones tumorales affectées. De plus, la perte des jonctions serrées et l'augmentation des fenestrations touchant les cellules endothéliales résultent en l'augmentation des flux para-cellulaires conduisant à l'hyperperméabilité des vaisseaux sanguins. L'hétérogénéité de la perméabilité de la BHE au niveau de la masse tumorale peut

ainsi avoir un impact sur la biodisponibilité et l'effet thérapeutique des drogues (Papademetriou et Porter, 2015). En plus des jonctions serrées, la perméabilité sélective de la BHE est induite par d'autres mécanismes constituant des obstacles importants à la distribution des drogues. Ainsi, la BHE implique des transports actifs tels que les pompes à efflux qui renvoient les drogues vers la circulation sanguine, divers enzymes capables de métaboliser les médicaments avant même leur arrivée à destination, et une pression interstitielle élevée empêchant toute extravasation (Papademetriou et Porter, 2015). Par conséquent, la présence de la BHE peut limiter voire compromettre l'utilisation de certaines drogues qui auraient pu être efficaces dans le traitement du GBM. Outrepasser cette barrière par une méthode d'administration invasive telle que des injections intracrâniennes nécessitera d'étudier de façon approfondie les effets secondaires pouvant être induits par les différents traitements. La BHE reste un obstacle au traitement des GBM par les agents pharmacologiques et le développement de nouvelles approches pouvant contourner cette barrière constitue un domaine de recherche très actif en cancérologie.

B.2.6.c. Hétérogénéité moléculaire intra-tumorale

Bien que l'identification des différents sous-types de GBM permette de prédire le pronostic vital des patients, voire leur réponse aux traitements, il est important de noter qu'il existe un biais d'échantillonnage dont les études de Phillips *et al.* (Phillips et al. 2006), du TCGA (*The Cancer Genome Atlas*) (McLendon et al. 2008) et de Verhaak *et al.* (Verhaak et al. 2010) ne tiennent pas compte, celui de l'hétérogénéité intra-tumorale. A l'aide de l'exérèse guidée par fluorescence (5-ALA), Sottoriva *et al.* ont identifié et isolé de multiples fragments provenant de la même masse tumorale et séparés d'au moins 1 cm les uns des autres (Sottoriva et al. 2013). Ces échantillons présentent des profils anatomopathologiques similaires et ont été analysés au travers d'études génomiques et transcriptomiques révélant qu'une même tumeur peut inclure plusieurs sous-types de GBM. Cette hétérogénéité intra-tumorale s'accompagnerait d'une cohabitation hiérarchisée entre divers clones cellulaires, faisant suite à l'expansion clonale de précurseurs communs apparus lors de la gliomagenèse. Ce phénomène s'expliquerait par une évolution tumorale propre à chaque patient ce qui complique d'autant plus la prise en charge thérapeutique avec la difficulté d'identifier les sous-types de GBM et l'émergence de clones résistants aux traitements (Ellis et al. 2015).

B.2.6.d. Cellules souches cancéreuses

La théorie des cellules souches cancéreuses (CSC) ou cellules initiatrices des tumeurs, repose sur le fait que les cancers dériveraient d'une petite fraction de cellules cancéreuses

qui constitueraient un réservoir autonome à l'origine du maintien de la tumeur. Par analogie aux cellules souches normales, les CSC seraient dotées d'un potentiel de prolifération infini avec une capacité d'auto-renouvèlement et de divisions asymétriques par différenciation, qui expliquerait l'hétérogénéité cellulaire intra-tumorale. De plus, ces cellules posséderaient des mécanismes moléculaires leurs permettant de résister aux radiations et aux agents pharmacologiques conduisant à leur persistance et à leur maintien malgré l'action de thérapies agressives. Bien qu'en faible proportion au sein d'une tumeur, les CSC seraient responsables de l'initiation tumorale et de la récidive après traitement.



Figure 9 : Différences entre les cellules souches cancéreuses (CSC) et les cellules tumorales « **classiques** ». Contrairement aux cellules tumorales classiques, les CSC sont capables de s'auto-renouveler, de se différencier, de résister aux thérapies conventionnelles et d'initier des tumeurs *in vivo* (adapté de Abou-Antoun et al. 2017).

Une telle sous-population a été décrite pour la première fois en 1994 par Lapidot *et al.* dans le cas de la leucémie myéloïde aiguë (Lapidot et al. 1994), avant d'être mise en évidence dans divers tumeurs solides, dont le cancer du sein (Al-Hajj et al. 2003), du colon (O'Brien et al. 2007), de l'ovaire (Bapat et al. 2005) et du cerveau (Singh et al. 2004). Contrairement aux cellules tumorales « classiques », les CSC sont caractérisées par leur faible proportion au sein de la tumeur, leur capacité à se différencier et à initier un développement tumoral *in vivo* (**Figure 9**) ainsi que leur expression de marqueurs de cellules souches. Dans le cas

du GBM et bien qu'ils demeurent très controversés, divers marqueurs de cellules souches peuvent être utilisés en combinaison afin d'identifier les CSC tels que CD133, CD90, CD44, OLIG2, SOX2, CD15, NESTIN, OCT4, NANOG (Abou-Antoun et al. 2017). Une autre particularité de ces cellules est leur résistance à de nombreuses approches thérapeutiques dont les radiations et la chimiothérapie. Les traitements conventionnels sont souvent efficaces sur les cellules tumorales « classiques » mais ne ciblent pas les CSC dont la proportion augmente au sein des tumeurs traitées. Cette plasticité tumorale peut s'expliquer par le fait que les thérapies génèrent au niveau du micro-environnement, un stress favorable au maintien du phénotype souche et à l'enrichissement des CSC (hypoxie, carence en nutriments, altération du pH...) (Abou-Antoun et al. 2017). Toutefois, le modèle des CSC reste controversé notamment car il ne tient pas compte des multiples mutations oncogéniques nécessaires à l'initiation tumorale, ni des relations clonales pouvant persister au cours de la croissance tumorale. De plus, la théorie des CSC n'explique en rien l'origine de la cellule initiatrice de la tumeur qui pourrait aussi bien être une cellule souche neurale mutée, qu'une cellule mature dédifférenciée ayant acquis la capacité d'auto-renouvellement (Lathia 2013).

B.2.6.e. Micro-environnement tumoral

Il est désormais admis que le caractère invasif d'une tumeur est déterminé non seulement par les cellules cancéreuses, mais aussi par leurs interactions avec l'environnement extracellulaire qui module leur capacité à développer une tumeur et à résister aux traitements. Les cellules communiquent entre elles et avec le stroma tumoral de manière dynamique. Cette communication se fait soit de manière directe par le biais de complexes jonctionnels, soit de manière indirecte de façon paracrine (avec les cellules voisines) ou endocrine (à distance) via des facteurs sécrétés dans le milieu extracellulaire (facteurs de croissance, chimiokines...) et qui agissent sur des récepteurs spécifiques à la surface de leurs cellules cibles. Bien que non transformées, les populations cellulaires présentes dans le micro-environnement tumoral (astrocytes, fibroblastes, cellules endothéliales, cellules immunitaires...) sont subverties et contrôlées par les cellules cancéreuses pour répondre à leurs besoins. Le stroma tumoral peut ainsi se comporter comme une niche contenant des nutriments, de l'oxygène et des molécules permettant le maintien de la tumeur. De multiples niches tumorales favorisant le développement et la persistance des CSC ont été décrites dans le GBM, telles que les niches péri-vasculaires ou prolifératives et les niches hypoxiques ou péri-nécrotiques (Codrici et al. 2016). Le microenvironnement tumoral doit donc être pris en compte dans la conception de nouvelles thérapies dont le but ultime serait de cibler conjointement les cellules stromales et tumorales afin de limiter voir d'exclure la récidive chez les patients atteints de GBM.

Face à l'échec des thérapies standard mises en œuvre pour traiter les patients atteints de GBM, de nouvelles stratégies thérapeutiques sont en cours d'étude. Parmi elles, l'immunothérapie anti-cancéreuse suscite beaucoup d'intérêt puisqu'elle permettrait de cibler spécifiquement les cellules tumorales résiduelles responsables de la récidive des patients.

II. L'immunothérapie anticancéreuse

A. Le système immunitaire contre le cancer

A.1. Généralités

A.1.1. Un peu d'histoire...

L'immunothérapie anti-cancéreuse a été décrite pour la première fois à la fin du XIXème siècle par le chirurgien newyorkais William Coley (Dunn-Pirio et Vlahovic, 2017). Après avoir observé la disparition spontanée d'un sarcome chez un patient ayant développé un érysipèle (infection de la peau induite par un streptocoque), il émit l'hypothèse qu'une infection post-opératoire pouvait aider à combattre le cancer. Il inocula à des patients atteints de sarcome inopérable des streptocoques morts et observa un ralentissement de la progression tumorale. Au début des années 1900, Paul Ehrlich a proposé que le cancer serait beaucoup plus courant dans les organismes à longue durée de vie s'il n'y avait pas un effet protecteur de l'immunité (Ehrlich 1909). Mais à cette époque, peu d'éléments étaient connus sur la composition et la fonction du SI et il n'était tout simplement pas possible de valider ce postulat. Il faudra attendre la fin des années 50 pour voir émerger de nouveau l'idée d'un contrôle immunitaire sur le cancer, nourrie en grande partie par une meilleure compréhension du SI combinée à la découverte des antigènes tumoraux (Old et Boyse, 1964). Ainsi, Macfarlane Burnet et Lewis Thomas proposèrent le concept d'immunosurveillance impliquant directement l'immunité adaptative dans la prévention et le développement des cancers chez des hôtes immunocompétents (Burnet 1957; Thomas 1959). Ce n'est ensuite que dans les années 1990, avec l'amélioration et la standardisation des modèles murins immunodéficients issus de lignées génétiques pures, que des études ont réévalué le rôle de l'immunité dans le contrôle du cancer. L'intérêt pour l'immunothérapie du cancer a notamment été ravivé par la découverte du rôle protecteur de l'interféron-y (IFN-γ) contre les tumeurs (Dighe et al. 1994). Rapidement, d'autres études ont démontré des résultats similaires qui révélèrent que le SI peut fonctionner comme un régulateur de tumeur (Schreiber, Old, et Smyth 2011).

A.1.2. Réponses immunitaires

Le système immunitaire (SI) est constitué de deux composantes majeures : l'immunité innée et l'immunité adaptative. Lors de l'intrusion d'un agent pathogène dans l'organisme, une réponse immunitaire innée se met rapidement en place (quelques heures), faisant notamment intervenir les monocytes, les neutrophiles, les macrophages, les cellules NK (natural killer), les cellules dendritiques ainsi que des molécules solubles du complément. Ces éléments cellulaires et moléculaires représentent la première ligne de défense de l'organisme. En cas d'échec de l'immunité innée à éliminer totalement le pathogène, une réponse immunitaire adaptative se développe au cours des jours suivant l'infection. Cette réponse fait intervenir les lymphocytes B (LB) et T (LT) capables de cibler spécifiquement des antigènes exprimés à la surface du pathogène. Il existe différentes souspopulations de LT : les LT dits « conventionnels » et les LT « non conventionnels ». Parmi les LT conventionnels exprimant un récepteur TCR $\alpha\beta$ (LT $\alpha\beta$), les LT CD8⁺ et CD4⁺ reconnaissent les peptides antigéniques présentés respectivement par des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) classiques de classe I (CMH-I) ou II (CMH-II) et possèdent des propriétés cytotoxiques et/ou modulatrices du SI via la sécrétion de cytokines. A l'inverse, les LT non conventionnels n'expriment généralement pas de corécepteurs CD8 et CD4 et reconnaissent des antigènes indépendamment des molécules du CMH classiques. Parmi ces LT non conventionnels, certaines populations expriment un TCR $\alpha\beta$ telles que les cellules NKT et iNKT (porteuses d'un TCR V α 24V β 11 invariant), tandis que d'autres populations lymphocytaires expriment un TCR composé des chaînes γ et δ (LT $\gamma\delta$). L'ensemble de ces acteurs immunitaires va conduire au développement d'une réponse spécifique et adaptée à chaque pathogène. De plus, le SI adaptatif est capable de mettre en place une réponse dite « mémoire » qui pourra être conservée dans le temps et permettra une réaction immunitaire plus rapide en cas de nouvelle infection de l'organisme par le même pathogène.

A.1.3. Rôles du système immunitaire contre le cancer

Plusieurs éléments indiquent l'existence d'un processus d'immunosurveillance du cancer chez l'homme (Dunn, Old, et Schreiber 2004) : (i) les patients immunodéprimés (transplantés) ou immunodéficients (infectés par le VIH) présentent une incidence plus élevée de cancers non liés à des étiologies virales connues ; (ii) les patients atteints de cancer peuvent développer des réponses immunitaires innées ou adaptatives anti-tumorales spontanées ; (iii) la présence de lymphocytes infiltrant les tumeurs (TIL) pourrait être

un indicateur pronostic favorable à la survie des patients porteurs de mélanome (Burton et al. 2011), de cancers de l'ovaire (Sato et al. 2005) et du colon (Galon et al. 2006; Ohtani 2007). Il est maintenant largement admis que le SI joue au moins 3 rôles distincts dans la prévention du cancer (Schreiber, Old, et Smyth 2011) : (i) il protège l'hôte contre les infections virales et supprime ainsi les tumeurs viro-induites ; (ii) il empêche la création d'un micro-environnement inflammatoire pro-tumorigénique en éliminant les agents pathogènes et en résolvant rapidement l'inflammation ; (iii) il élimine les cellules tumorales néoformées qui co-expriment des ligands activateurs des cellules immunitaires innées et des antigènes tumoraux reconnus par les cellules effectrices appartenant au SI adaptatif.

A.1.4. Concept d'immuno-édition de la tumeur

Le concept d'immunosurveillance a été révisé en 2001, suite à l'étude de Shankaran et al. révélant que les tumeurs formées chez des souris immunodéficientes étaient plus immunogènes (« non éditées ») que des tumeurs dérivées de souris immunocompétentes (« éditées ») (Shankaran et al. 2001). Cette nouvelle notion indique que le système immunitaire ne protège pas seulement l'hôte contre la formation de tumeurs mais façonne également l'immunogénicité des cellules cancéreuses qui constitue la base même du concept d'immuno-édition (Dunn et al. 2002). L'immuno-édition du cancer (ou règle des 3 « E ») se déroule en 3 phases distinctes (Schreiber, Old, et Smyth 2011): « élimination », « équilibre » et « échappement » (Figure 10). Des facteurs externes peuvent influer l'évolution tumorale (stress environnemental, détérioration du SI) et certaines cellules cancéreuses peuvent entrer directement en phases d'équilibre ou d'échappement sans passer par la (les) phase(s) antérieure(s). Durant la phase d'élimination, les systèmes immunitaires innés et adaptatifs travaillent de concert pour détecter et détruire d'éventuelles tumeurs en développement avant qu'elles ne deviennent cliniquement décelables (Schreiber, Old, et Smyth 2011). Rares sont les cellules tumorales qui survivent à la phase d'élimination et entrent en « équilibre ». Au cours de cette phase qui peut durer plusieurs années, le SI adaptatif contrôle la prolifération des cellules tumorales en les maintenant dans un état quiescent, tout en façonnant leur immunogénicité (Schreiber, Old, et Smyth 2011). Puis, les cellules tumorales qui acquièrent la capacité de contourner la reconnaissance immunitaire, prolifèrent et donnent naissance à une masse tumorale visible. Le passage de la phase d'équilibre à la phase d'échappement peut survenir suite (i) à des modifications d'immunogénicité de la population tumorale soumise à la fonction d'édition exercée par

le SI ; (ii) à une modification du SI de l'hôte en réponse à l'immunosuppression exercée par les cellules cancéreuses ; (iii) à une détérioration du SI de l'hôte.



Figure 10 : Les trois phases de l'immuno-édition : « échappement », « équilibre » et « échappement ». Le SI contrôle les cellules tumorales néo-formées en les éliminant, puis certains variants tumoraux apparaissent et survivent jusqu'à contourner la réponse immunitaire. Adapté de van der Burg et al. 2016.

A.2. Immunité et glioblastome multiforme

A.2.1. Immunologie du système nerveux central

Le SNC et plus particulièrement le cerveau, étaient historiquement considérés comme immunoprivilégiés en raison du rôle de la BHE qui limite l'entrée des cellules immunitaires et de leurs médiateurs. Ce dogme trouve son origine notamment dans le fait qu'une étude de 1948 réalisée sur des lapins montre une croissance accrue d'allogreffes de peau implantées dans le cerveau comparée aux modèles sous-cutanés (Medawar 1948). De plus, le drainage lymphatique du SNC a longtemps été considéré comme absent. Pourtant, des réactions immunitaires peuvent s'y produire telles que des maladies auto-immunes (Hohlfeld et Wekerle, 2001) ou des réponses immunitaires à des bactéries, des virus (Dörries 2001) et des parasites (Fischer, Bonifas, et Reichmann 2000). C'est en 2015 qu'ont été découverts des vaisseaux lymphatiques fonctionnels, au sein du sinus dural, capables de faire circuler les leucocytes entre le LCS et les ganglions lymphatiques cervicaux

profonds (Aspelund et al. 2015; Louveau et al. 2015). Ainsi, même en l'absence d'infection ou d'inflammation, les cellules immunitaires sont présentes dans le SNC. La sélectivité exercée par la BHE induit cependant une différence de proportions cellulaires par rapport au sang périphérique, avec une prédominance de lymphocytes T. Ces cellules en provenance de la circulation générale peuvent accéder au SNC par de multiples voies (plexus choroïdes, espace sous-arachnoïdien, espaces périvasculaires) et circuler soit dans le LCS, soit directement dans le parenchyme cérébral (Ransohoff, Kivisäkk, et Kidd 2003). Le SNC est donc un organe immunospécialisé dont la surveillance immunitaire active permet de lutter contre les néoplasmes intracrâniens notamment via la présentation d'antigènes, le trafic permanent de cellules immunitaires et le drainage lymphatique du SNC.

A.2.2. Système immunitaire et glioblastome multiforme

A.2.2.a. Présentation antigénique

Certaines cellules du SI sont capables de tuer spécifiquement les cellules tumorales suite à une présentation antigénique aussi appelée présentation croisée ou cross-presentation. Les cellules présentatrices d'antigènes (CPA) assimilent les antigènes tumoraux exogènes et les exposent à leur surface sur les molécules de complexes majeurs d'histocompatibilité de classe I ou II (CMH-I/II) qui vont être respectivement reconnus par des lymphocytes T $CD8^+$ ou $CD4^+$ (LT $CD8^+/CD4^+$) cytotoxiques (Joffre et al. 2012). Grâce à cette reconnaissance spécifique via leur T cell receptor chain- $\alpha\beta$ (TCR- $\alpha\beta$) et à la présence de molécules de co-stimulation, les lymphocytes vont s'activer et les LT CD8⁺ cytotoxiques vont notamment pouvoir lyser les cellules cancéreuses. Dans le cas du GBM, le site où se produit la présentation antigénique (SNC ou périphérie) ainsi que les types cellulaires impliqués sont encore discutés. Des modèles précliniques ont démontré que la microglie activée est capable de présenter des antigènes tumoraux à des LT CD8⁺, bien qu'elle exprime moins de CMH et de marqueurs de co-stimulation que les cellules dendritiques (Garden et Möller, 2006; Beauvillain et al. 2008; Jarry et al. 2013). Ces dernières ainsi que les macrophages et les péricytes qui infiltrent la tumeur figurent également parmi les candidats à la présentation antigénique (Pieper et al. 2014; Dunn-Pirio et Vlahovic, 2017). De plus, les antigènes tumoraux pourraient potentiellement être drainés à l'extérieur du SNC vers les ganglions lymphatiques périphériques où ils pourraient subir une présentation croisée en périphérie (Dunn-Pirio et Vlahovic, 2017).
A.2.2.b. Infiltrat immunitaire

Le GBM est souvent associé à une altération de la BHE couplée à de la nécrose tumorale et un nombre parfois important de cellules immunitaires infiltrant la tumeur. Certaines études suggèrent qu'un plus grand nombre de TIL indiquerait une réaction immunitaire plus robuste au sein du micro-environnement tumoral corrélée à un meilleur pronostic pour les patients (Brooks et al. 1978; Yang et al. 2010). Cependant, une présence substantielle de cellules immunitaires ne correspond pas nécessairement à une meilleure élimination de la tumeur (Dunn, Dunn, et Curry 2007). Ainsi, il n'est pas exclu que les cellules de GBM déjouent l'action anti-tumorale du SI en entravant le fonctionnement des cellules immunitaires infiltrantes et/ou en mettant en place des mécanismes d'échappement.

A.2.2.c. Subversion du système immunitaire

i. Lymphocytes T régulateurs

Les patients atteints de GBM présentent souvent une pénurie de LT $CD4^+$ dans le sang périphérique au profit d'une augmentation des lymphocytes T régulateurs (LTreg) (Fecci et al. 2006). Cette population lymphocytaire $CD4^+$ $CD25^+$ FoxP3⁺ est dite « régulatrice » car elle possède la capacité de moduler la réponse immunitaire et d'induire une tolérance. Les cellules cancéreuses secrètent des facteurs solubles et des chimiokines telles que le *C-C ligand 2* (CCL2), capables d'attirer les LTreg directement sur le site tumoral (**Figure 11**) (Crane et al. 2012). De plus, une infiltration massive de LTreg dans les tumeurs de GBM est associée à un mauvais pronostic vital (Heimberger et al. 2008).

ii. Microglie et macrophages

La microglie et les macrophages peuvent constituer entre 30% et 50% des cellules présentes dans les gliomes (Hambardzumyan, Gutmann, et Kettenmann 2016). Ces populations cellulaires dérivent toutes deux des monocytes et peuvent être recrutées par les cellules de GBM. Sous l'action de divers facteurs solubles tels que le *transforming growth factor-\beta* (TGF- β) et l'interleukine-10 (IL-10), ces cellules appartenant à l'immunité innée modifient leur phénotype pour devenir des macrophages associés aux tumeurs (*tumor associated macrophages* ou TAM). Les TAM présentent majoritairement un phénotype de type M2 et induisent une immunosuppression protumorale (Komohara et al. 2008; Wu et al. 2010) via la sécrétion de TGF- β , d'IL-10, ainsi que via l'expression d'indoleamine 2,3dioxygénase (IDO) qui clive le tryptophane (acide aminé essentiel) en plusieurs métabolites dont la kynurénine, induisant l'inactivation des LT effecteurs tout en contribuant à promouvoir les LTreg (Gotwals et al. 2017). Par ailleurs, les TAM sont également capables d'induire l'invasion et la dissémination tumorale via la sécrétion de TGF- β , de *vascular endothelial growth factor* (VEGF) et de métalloprotéases (**Figure 11**) (X. Ye et al. 2012; Hambardzumyan, Gutmann, et Kettenmann 2016).

iii. Cellules myéloïdes suppressives

Les cellules myéloïdes suppressives (*myeloid-derived suppressor cells* ou MDSC) représentent une population hétérogène de cellules myéloïdes qui contribuent à l'immunosuppression médiée par le GBM (Raychaudhuri et al. 2011). Les MDSC recrutées au niveau du micro-environnement tumoral sont capables d'inhiber les fonctions des LT effecteurs par divers mécanismes dont la production d'IDO, d'arginase et la sécrétion d'oxyde nitrique (NO). L'arginase produite par les MDSC diminue la quantité d'arginine présente dans le milieu extracellulaire et nécessaire au fonctionnement des cellules T. Le manque d'arginine dans le micro-environnement tumoral induit une diminution d'expression du TCR et une dysfonction des LT (Rodríguez et Ochoa, 2008). De plus, les MDSC secrètent du NO et des espèces réactives de l'oxygène (*reactive oxygen species* ou ROS) qui inhibent l'activation des cellules effectrices immunitaires (**Figure 11**) (Nagaraj et Gabrilovich, 2007).

<u>A.2.2.d. Micro-environnement immunosuppresseur</u>

Suite à l'immuno-édition, les cellules de GBM peuvent diminuer leur expression en molécules de CMH-I/II empêchant ainsi leur reconnaissance directe par les cellules immunitaires effectrices (**Figure 11**) (Zagzag et al. 2005). De plus, les cellules cancéreuses mettent en place divers mécanismes immunosuppresseurs pour contourner, inhiber voire subvertir l'action du SI. Au sein du micro-environnement tumoral est retrouvé un large panel de molécules immunosuppressives et de facteurs pro-tumoraux telles que des cytokines (dont l'IL-10) du TGF- β , de la prostaglandine E₂ (PGE2), du VEGF, de l'IDO, ou encore du NO (Hao et al. 2002; Jackson et al. 2011; Gotwals et al. 2017). Par ailleurs, les LTreg, les TAM, la microglie et/ou les cellules tumorales elles-mêmes, peuvent exprimer des protéines de surface dont le rôle est d'inhiber directement les effecteurs immunitaires par contacts directs, telles que les ligands des récepteurs *programmed cell death-1* (PDL-1, B7-H1 ou CD274) et Fas (Fas-L ou CD95L) (**Figure 11**) (Mangani, Weller, et Roth 2017). Ainsi, l'immunosupression exercée par les cellules tumorales et leurs alliés du SI, induit une diminution de l'efficacité de présentation croisée d'antigènes tumoraux par les CPA, entrave l'élimination de la tumeur par les cellules cytotoxiques (cellules *natural killer* (NK)

et LTCD8⁺) et favorise le maintien et la prolifération des cellules tumorales voire de leur dissémination (Razavi et al. 2016).



Figure 11 : Subversion du SI par les cellules de GBM et micro-environnement immunosuppresseur. Les cellules de GBM contrôlent leur micro-environnement en sécrétant des facteurs solubles immunosuppresseurs (TGF-β, PGE2, IL-10) et des chimiokines (CCL2, M-CSF) qui vont recruter leurs partenaires de l'immunité régulatrice. Elles expriment également des ligands membranaires tels que FasL et PDL-1 qui induisent l'apoptose des LT effecteurs et diminuent leur expression de CMH-I afin d'abolir leur reconnaissance par le SI. M-CSF, TGF-β, et IL-10 permettent une modification des TAMs vers un phénotype M2 immunosuppresseur via l'expression d'IDO et la sécrétion de TGF-β et d'IL-10. Les TAMs vont également avoir une action favorable à l'invasion et la dissémination tumorale avec la sécrétion de VEGF et de métalloprotéases. Les MDSCs produisent de l'IDO, de l'arginase, du NO et des ROS qui vont inhiber l'activité des LT effecteurs. Les CPAs présentent des antigènes tumoraux aux effecteurs TCR-αβ⁺ CD8⁺/CD4⁺ via leur CMH-I/II et expriment les molécules de co-stimulations CD80/86 nécessaires à une activation efficace des LT. Cependant, ces derniers peuvent exprimer CTLA-4 qui, lorsqu'il reconnaît CD80/86, entraîne l'anergie des effecteurs. Enfin, les LTregs recrutés sur le site tumoral sécrètent du TGF-β et de l'IL-10 et expriment PDL-1 (Θ : inhibition ; \mathfrak{O} : activation). Adapté de Nduom et al. 2015; Hambardzumyan et al. 2016; Kamran et al. 2016; Gotwals et al. 2017.

B. L'immunothérapie ciblant le GBM

B.1. Principe

L'immunothérapie anti-cancéreuse est une biothérapie qui consiste à manipuler le SI dans le but de traiter les patients atteints de cancers. Dans le cas du GBM, l'immunothérapie ciblée suscite beaucoup d'intérêt, notamment en raison de la localisation de la tumeur où tout dégât collatéral sur le tissu sain doit être limité. Des composants immunitaires cytotoxiques spécifiques qui ciblent préférentiellement les cellules tumorales (sans causer de dommages au tissu cérébral environnant) apparaissent dès lors comme candidats potentiels pour le traitement du GBM. De plus, en fonction du type d'approche, il peut être envisagé une persistance de la réponse immunitaire anti-tumorale empêchant la rechute des patients. Les approches d'immunothérapie actuelles présentent différents degrés de complexité en raison du choix de(s) l'antigène(s) cible(s) et du système de traitement utilisé : autologue (où les composants de l'immunité ou les antigènes sont propres au patient) ou allogénique (issus d'un individu (donneur) différent du receveur). L'immunothérapie utilise le SI afin d'éliminer les cellules cancéreuses et est dite « active » lorsqu'elle stimule et dépend de la réponse immunitaire de l'hôte, ou « passive » lorsqu'elle transfère au patient des composants de l'immunité ayant une action directe sur les cellules cibles tumorales (Figure 12).



Figure 12 : Différentes approches immunothérapeutiques possibles pour le traitement du GBM. L'immunothérapie utilise le SI de façon spécifique (orange) ou non spécifique (vert), afin d'éliminer les cellules cancéreuses. Elle peut être « active » : vaccination anti-tumorale (cellules dendritiques (CD), cellules tumorales mortes, peptides tumoraux), Ac immunomodulateurs (points de contrôle ou *checkpoint* inhibiteurs : anti-PD-1 ou anti-CTLA-4), cytokines immunostimulatrices (IFN- α ou IL-2), inhibiteurs du métabolisme immunosuppresseur (IDO) ; ou « passive » : thérapie cellulaire adoptive par transfert d'effecteurs cytotoxiques (autologues, allogéniques ou modifiés génétiquement (CAR)), Ac thérapeutiques dirigés contre des antigènes tumoraux (nus ou conjugués à des toxines ou radioéléments) et les virus oncolytiques spécifiques d'antigènes tumoraux membranaires. Adapté de Galluzzi et al. 2014; Calinescu et al. 2015; Tivnan et al. 2017.

B.2. L'immunothérapie active

Son objectif est de moduler la réponse immunitaire afin que celle-ci puisse contrecarrer les mécanismes d'échappement mis en œuvre par les cellules tumorales. Cette stimulation du SI peut être « spécifique » ou « aspécifique ».

B.2.1. La vaccination

La vaccination thérapeutique anti-tumorale est une immunothérapie active dont le but est d'induire une réponse immunitaire spécifique endogène contre les cellules cancéreuses. Comme pour les maladies infectieuses, il existe différentes sources potentielles d'antigènes tumoraux : des protéines et/ou peptides présents à la surface des cellules tumorales (purifiés ou synthétisés) ; des cellules ou des lysats dérivés d'échantillons frais ou cryopréservés de tumeurs autologues (mélange entre cellules normales et malignes) ; ou encore des lysats ou cellules de lignées tumorales autologues ou allogéniques. Lors d'une vaccination thérapeutique anti-cancéreuse, il peut être envisagé d'inoculer au patient : (i) des peptides spécifiques de la tumeur ; (ii) des cellules tumorales mortes ou inactivées (Calinescu et al. 2015). De plus, diverses voies d'administration sont possibles telles que les voies sous-cutanée, intradermique, intramusculaire, intraveineuse ou encore intralymphatique (Robert O. Dillman 2011) et des traitements adjuvants peuvent être utilisés dans le but d'augmenter l'immuno-génicité de certains vaccins (Calinescu et al. 2015).

B.2.1.a. Vaccins peptidiques ciblant le GBM

i. Vaccins anti-EGFRvIII

Environ 35% des GBM primaires présentent un gène EGFR amplifié (**Tableau 1**) (Louis et al. 2016). Parmi ces tumeurs, plus de la moitié sont mutées résultant en l'expression d'une protéine EGFR tronquée (perte du domaine de liaison au ligand) constitutivement active qui présente une nouvelle séquence peptidique potentiellement immunogène (Batra et al. 1995; Heimberger et al. 2003; Weller, Kaulich, et al. 2014). Le vaccin thérapeutique « rindopepimut » qui utilise cette séquence peptidique pour stimuler le SI, a été testé chez des patients nouvellement diagnostiqués GBM au cours de 3 essais cliniques de phases II conduisant à une étude de phase III (ACT-IV). Cette dernière s'est récemment soldée par un échec avec une absence d'amélioration de la survie des patients (Weller et al. 2016) en raison notamment de la perte d'expression de l'EGFRvIII chez les patients réfractaires indiquant une instabilité d'expression de l'EGFRvIII dans le temps induite par l'immuno-édition de la tumeur (Weller et al. 2017).

ii. Vaccins anti-IDH1^{*R132H*}

La mutation IDH1^{R132H} touche environ 10% des GBM (**Tableau 1**) (Louis et al. 2016). En plus des conséquences métaboliques de cette mutation (Waitkus, Diplas, et Yan 2016), IDH1^{R132H} arbore un néo-épitope qui peut être présenté par les CPA (Bunse et al. 2015). Ainsi, il peut être observé chez certains patients atteints de GBM une réponse lymphocytaire T spontanée et la présence d'anticorps spécifiques dirigés contre IDH1^{R132H} (Schumacher et al. 2014). Un essai clinique de phase I (NOA-16) est actuellement en cours afin d'évaluer la sécurité, la tolérance et l'immunogénicité d'un peptide issu de l'IDH1^{R132H} chez des patients IDH-mutés atteints de gliomes de grades III-IV (NCT02454634 2017).

iii. Vaccins multipeptidiques

Les peptides associés aux tumeurs qui dérivent de protéines non mutées, sont le reflet de voies de signalisation dérégulées et sont hautement conservés entre les différents GBM (Dutoit et al. 2012). IMA950 est un vaccin contenant 11 peptides associés au GBM, récemment testé en essai clinique de phase I sur une quarantaine de patients nouvellement diagnostiqués (Rampling et al. 2016). Bien que 36 patients sur 40 aient développé une réponse immunitaire contre le vaccin et que 20 patients aient présenté une réponse dirigée contre plusieurs peptides, le bénéfice de l'IMA950 sur la survie des patients atteints de GBM reste modeste (médiane de survie de 15,3 mois *vs* 14,6 mois avec le protocole de Stupp) (Rampling et al. 2016). Compte tenu des variabilités interindividuelles, l'une des causes de cet échec pourrait être un manque de spécificité des peptides constituant le vaccin. La sélection de peptides associés aux tumeurs spécifiques anti-cancéreux personnalisés. Ces derniers cibleraient des antigènes immunogènes surexprimés chez un patient donné, dans le but de maximiser les chances de succès induites par une réponse immunitaire efficace et spécifique.

B.2.1.b. Vaccins utilisant les cellules dendritiques

Les cellules dendritiques sont les CPA les plus efficaces qui, en plus de la présentation antigénique, sont capables d'activer les LT CD4⁺, les LT CD8⁺, les cellules NK et les cellules NKT par contacts directs et/ou via la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (Gustafsson et al. 2011). Les cellules dendritiques sont le plus souvent induites *ex vivo* à partir de cellules mononuclées du sang périphérique (PBMC) et en présence d'IL-4 et de GM-CSF. Elles peuvent être chargées directement avec des antigènes tumoraux (peptides ou lysats) ou transfectées avec des ARN tumoraux, puis subissent leur maturation en présence d'un cocktail de cytokines et de facteurs solubles (Calinescu et al. 2015). Les cellules dendritiques matures peuvent ensuite être congelées ou directement administrées au patient (**Figure 13**).



Figure 13 : Vaccination thérapeutique anti-GBM basée sur l'injection de cellules dendritiques (CDs) autologues. Les CDs sont isolées *ex vivo* à partir de cellules mononuclées du sang périphérique (PBMCs) du patient, puis amplifiées, sélectionnées, chargées en antigènes tumoraux (peptides, lysats) avant d'être réinjectées au patient. Adapté de Weller et al. 2017.

Actuellement, plusieurs essais cliniques utilisant les cellules dendritiques chargées avec des antigènes de GBM sont en cours. Parmi eux, le DCVax-L (phase III) est basé sur un vaccin autologue utilisant les cellules dendritiques générées avec des lysats tumoraux propres aux patients nouvellement diagnostiqués GBM ou en rechute (NCT00045968 2017). L'étude ayant précédé cet essai portait sur 23 patients et montrait que le vaccin semble induire une réponse anti-tumorale systémique avec une survie des patients prolongée (médiane de survie de 31,4 mois) (Prins et al. 2011). Les auteurs de l'étude rapportent également une infiltration lymphocytaire T CD8⁺ accrue ainsi qu'une meilleure survie des patients porteurs d'une tumeur de signature moléculaire mésenchymateuse (Prins et al. 2011). Ces résultats suggèrent que les tumeurs de GBM présentant un profil d'expression génique mésenchymateux pourraient être plus facilement éligibles à l'immunothérapie (Prins et al. 2011; Doucette et al. 2013). Un second essai clinique porte sur l'administration du vaccin thérapeutique ICT-107 contenant des cellules dendritiques autologues préalablement exposées à un cocktail de 6 protéines décrites comme étant abondantes dans le GBM et associées à une signature des CSC (G. Liu et al. 2004; Phuphanich et al. 2013; Wen et al. 2014). Ces protéines sont la glycoprotéine 100 (gp100), la melanoma-associated antigen 1 (MAGE1), l'interferon-inducible protein AIM2, le human epidermal growth factor receptor-2 (HER2), le récepteur à l'IL-13 sous-unité α2 (IL-13Rα2), et la tyrosinase

related protein-2 (TRP2). L'essai clinique de phase I sur l'ICT-107 portait sur 21 patients et a rencontré un certain succès avec un ralentissement de la progression tumorale et une médiane de survie de 38,4 mois (Phuphanich et al. 2013). Toutefois, ce résultat n'a pas été confirmé en phase II (124 patients) avec peu d'effet et une survie qui reste inchangée (Wen et al. 2014). Malgré ces résultats très modestes, un essai clinique de phase III est en cours (NCT02546102 2017).

B.2.2. Immunothérapies actives aspécifiques

B.2.2.a. Cytokines immunostimulatrices

Certaines cytokines telles que l'IFN- α , l'IL-2 ou le GM-CSF, sont utilisées en association avec d'autres traitements immunothérapeutiques afin de stimuler et d'amplifier le fonctionnement général du SI (Robert O. Dillman 2011). Toutefois, en raison du manque de spécificité de ces molécules, des toxicités et des effets secondaires parfois importants sont souvent retrouvés. Dans le cas d'injections systémiques d'IL-2, l'activation non spécifique du SI peut entraîner une libération massive de cytokines pro-inflammatoires pouvant conduire à une « tempête cytokinique » parfois létale chez le patient (fièvre, malaises, troubles digestifs, anémie) (Dhupkar et Gordon, 2017). D'autres modes d'administration de l'IL-2 sont actuellement à l'étude afin de limiter ses effets (couplage à des anticorps, protéines de fusions, aérosols) (Dhupkar et Gordon, 2017).

B.2.2.b. Inhibiteurs du métabolisme immunosuppresseur

Toujours dans le but de stimuler le SI, l'association avec des inhibiteurs du métabolisme immunosuppresseur du micro-environnement tumoral pourrait être envisagée. C'est notamment le cas des inhibiteurs de l'IDO qui sont en cours d'évaluation chez des patients atteints de GBM en récidive ou porteurs de métastases cérébrales de mélanome (essai clinique de phase I) (Gotwals et al. 2017; Weller et al. 2017).

B.2.2.c. Anticorps immunomodulateurs

Une autre approche pour augmenter la réponse immunitaire de façon globale et directe, est l'administration d'anticorps immunomodulateurs. Les « points de contrôle » ou *checkpoint* inhibiteurs sont essentiels à la régulation du système immunitaire dans l'organisme sain. Ils permettent le maintien de la tolérance vis-à-vis des cellules du Soi et évitent le développement des maladies auto-immunes (Keir et al. 2008). Des protéines membranaires ou facteurs solubles sont utilisés pour stopper l'activation et la prolifération des effecteurs du SI afin d'éviter que la réaction inflammatoire ne perdure. Cependant, dans de nombreux

cancers dont le GBM, ces ligands sont surexprimés par les cellules tumorales entraînant une immunosuppression (Pardoll, 2012; Weller et al. 2017). Parmi ces ligands, 2 acteurs moléculaires présents à la surface des lymphocytes sont préférentiellement ciblés dans la lutte contre les mécanismes d'immunosuppression tumorale : la cytotoxic T-lymphocyteassociated protein-4 (CTLA-4 ou CD152) et le programmed cell death-1 (PD-1 ou CD279) (Mangani, Weller, et Roth 2017). Les voies de signalisation de ces récepteurs peuvent être inhibées par des anticorps monoclonaux antagonistes qui interfèrent avec leurs interactions récepteurs-ligands. Ces anticorps permettent ainsi d'outrepasser l'immunosuppression exercée par les cellules de GBM, de délivrer un message autorisant les cellules immunitaires à défendre l'organisme et donc de faciliter la destruction des cibles tumorales par les effecteurs immunitaires (Dunn et al. 2002; Weller et al. 2017). Les inhibiteurs des checkpoint immunitaires tels que « l'ipilimumab » (anti-CTLA-4), le « nivolumab » et le « pembrolizumab » (anti-PD-1), « l'atezolizumab » et le « durvalumab » (anti-PDL-1), ont montré leur efficacité contre plusieurs types de cancers dont le mélanome (Hodi et al. 2010) et le cancer du poumon (Rizvi et al. 2015). Actuellement de nombreux essais cliniques portant sur le ciblage des *checkpoint* inhibiteurs avec des anticorps monoclonaux administrés seuls ou en combinaison avec d'autres traitements, sont en cours d'évaluation chez les patients atteints de GBM, et devraient fournir des résultats prochainement (Weller et al. 2017).

B.3. L'immunothérapie passive

B.3.1. Virothérapie oncolytique

Les virus oncolytiques présentent un tropisme naturel pour les cellules néoplasiques et peuvent être génétiquement modifiés pour infecter et détruire spécifiquement les cellules cancéreuses (Dunn-Pirio et Vlahovic, 2017). La virothérapie oncolytique pourrait être adaptée au GBM en raison de la localisation de la tumeur, relativement isolée dans le SNC et entourée de neurones dont l'activité mitotique est quasi inexistante. Toutefois, le cerveau est un tissu particulièrement sensible nécessitant l'utilisation de virus capables d'infecter spécifiquement les cellules tumorales cibles afin d'épargner le tissu sain environnant (Maxwell et al. 2017). Les anomalies intracellulaires propres à la tumeur ainsi que les protéines membranaires exprimées à sa surface doivent être largement caractérisées et connues avant de choisir et/ou concevoir un virus ciblant spécifiquement les cellules

de GBM (Wollmann, Ozduman, et van den Pol 2012). Plusieurs virus oncolytiques sont à l'étude dans le traitement du GBM dont l'herpes simplex virus-1 (HSV-1), l'adénovirus ou encore le poliovirus (Maxwell et al. 2017). Par ailleurs, en plus d'entraîner la destruction des cellules cibles, les virus oncolytiques sont capables d'induire une réponse immunitaire antivirale et anti-tumorale efficace (Chiocca et Rabkin, 2014). Ce phénomène pourrait néanmoins affecter négativement la virothérapie avec l'élimination précoce des agents thérapeutiques viraux par le SI activé. Une virothérapie oncolytique efficace devra donc s'adapter à l'activation de l'immunité du patient tout en conservant sa capacité de réplication virale et de lyse tumorale.

B.3.2. Anticorps thérapeutiques

Les traitements basés sur l'administration d'anticorps monoclonaux conduisent à la mort des cellules tumorales via des mécanismes immuns et non-immuns (Kamran et al. 2016). Idéalement, l'expression de l'antigène reconnu par l'anticorps devrait être restreinte aux cellules tumorales afin d'optimiser le ciblage et minimiser les dommages collatéraux sur le tissu sain. Face à la difficulté d'identifier des antigènes tumoraux robustes propres au GBM, exprimés par l'ensemble des cellules cancéreuses et conservés dans le temps, peu d'anticorps anti-tumoraux sont évalués actuellement. Parmi les antigènes tumoraux pouvant être ciblés, le variant muté de l'EGFR constitutivement actif ou EGFRvIII (cf. paragraphe B.2.1.a.) est souvent exprimé dans les tumeurs de GBM. Des anticorps nus dirigés contre la voie activée de l'EGFR tels que le « cetuximab » et le « nimotuzumab », ont été développés et testés en clinique en combinaison avec les traitements conventionnels. A l'heure actuelle, les effets de ces anticoprs restent minimes et ne montrent pas de modification de la survie des patients atteints de GBM (Westphal et al. 2015; Kamran et al. 2016). L'ABT-414 est un anticorps conjugué qui permet de délivrer une drogue, la monomethyl auristatin F (MMAF), aux cellules exprimant le mutant EGFRvIII ou présentant la voie de l'EGFR activée. Actuellement, un essai clinique de phase I est en cours pour tester l'effet de l'ABT-414 combiné aux traitements standards (NCT02573324 2017).

B.3.3. Thérapie cellulaire adoptive

La thérapie cellulaire adoptive fait référence à l'administration directe au patient de cellules immunitaires cytotoxiques, sans passer par l'activation du SI de l'hôte, pour induire l'élimination de la tumeur. Ces cellules immunitaires doivent donc reconnaître des antigènes tumoraux spécifiques, être capable de s'amplifier et posséder des fonctions effectrices robustes permettant le ciblage et la mort des cellules cancéreuses (Steven A. Rosenberg et al. 2008; Restifo, Dudley, et Rosenberg 2012; Kamran et al. 2016). La majorité des approches de thérapie cellulaire implique une manipulation de cellules *ex vivo* afin d'enrichir une sous-population et/ou de stimuler leur activité via notamment l'utilisation de facteurs de croissance (**Figure 14**). Divers types de cellules immunitaires cytotoxiques peuvent être utilisés en thérapie, telles que les cellules NK, les LTCD8⁺, les cellules iNKT, ou encore les lymphocytes T $\gamma\delta$ (June, Blazar, et Riley 2009). Ces cellules sont collectées à partir de sang périphérique (PBMC), d'infiltrat immunitaire présent dans la masse tumorale (TIL), ou encore de ganglions lymphatiques autologues (propres au patient) ou allogéniques (issus d'un donneur différent) (Robert O. Dillman 2011).



Figure 14 : Génération de cellules immunitaires cytotoxiques autologues en vue d'un transfert adoptif chez un patient atteint de GBM. Ces cellules aux propriétés anti-tumorales peuvent être des cellules NK, des LTCD8⁺, des cellules iNKT, ou encore des LT $\gamma\delta$, et sont issues d'un fragment tumoral (infiltrat immunitaire) ou de sang périphérique (PMBC). Ces cellules sont sélectionnées et amplifiées en présence d'un cocktail de facteurs de croissance, puis sont soit modifiées génétiquement avec un CAR ou des TCR, soit activées par des CPA via la présentation d'antigènes tumoraux spécifiques. La population cellulaire cytotoxique ainsi obtenue est ensuite administrée au patient par infusion. Adapté de June et al. 2009; Restifo et al. 2012; Tivnan et al. 2017.

B.3.3.a. Transfert adoptif de cellules immunitaires autologues

Rosenberg et al. ont été les pionniers dans le domaine du transfert adoptif, montrant la régression tumorale chez certains patients atteints de mélanome et ayant reçu des TIL amplifiés ex vivo combinés à de l'IL-2 (S. A. Rosenberg et al. 1988). Cette méthode a été ensuite appliquée au GBM par différents groupes dont Hayes et al. qui ont montré en 1995, que l'infusion intracrânienne d'IL-2 associée à un mélange de cellules NK et de LT CD3⁺ autologues préalablement activées ex vivo par des cytokines (lymphokine-activated killers ou LAK), semble induire une augmentation des TIL et de la survie des patients atteints de GBM (Hayes et al. 1995). En 2009, un essai clinique de phase I a consisté à traiter 33 patients nouvellement diagnostiqués GBM avec des LAK autologues (injection intracrânienne) en association avec le traitement standard (Stupp et al. 2005; Robert Owen Dillman et al. 2009). Cette étude a montré une bonne tolérance des injections cellulaires intracrâniennes ainsi qu'une augmentation de la survie des patients (20,5 mois vs 14,6 mois avec le protocole de Stupp) (NCT00331526 2009). Cependant, plusieurs limites freinent le développement de ces approches autologues dans le cas du GBM. Outre le coût et les difficultés de production (Robert O. Dillman 2011), les principales limites de ces techniques sont (i) la difficulté à isoler et amplifier les cellules effectrices anti-tumorales autologues souvent présentes en très faible proportion et/ou en « fin de vie » ; (ii) la restriction de ces cellules par le CMH ; (iii) les mécanismes d'échappement tumoraux (diminution du CMH, micro-environnement tumoral immunosuppresseur) conduisant le plus souvent les lymphocytes à un état d'anergie (Fousek et Ahmed, 2015).

B.3.3.b. Transfert adoptif de cellules génétiquement modifiées

Les cellules immunitaires cytotoxiques peuvent être modifiées génétiquement afin qu'elles reconnaissent spécifiquement les antigènes tumoraux. Plusieurs techniques de génie génétique ont été développées pour faire exprimer à un lymphocyte un récepteur (TCR ou CAR) de forte affinité et d'une grande spécificité pour un antigène cible.

i. Ingénierie des TCR

La sélection de plusieurs clones lymphocytaires T présentant une excellente avidité pour des antigènes tumoraux spécifiques, permet d'identifier des TCR « efficaces » qui pourront ensuite être transférés par ingénierie génétique à des cellules d'autres patients atteints de la même pathologie. Une fois isolés, les lymphocytes peuvent être transduits avec des vecteurs rétroviraux codant pour des TCR spécifiques (**Figure 14**) afin d'induire la reconnaissance et le ciblage des cellules cancéreuses (Restifo, Dudley, et Rosenberg 2012; Fesnak, June, et Levine 2016) (**Figure 15**). Cette stratégie a été développée principalement avec des modèles de tumeurs immunogènes telles que le mélanome (Morgan et al. 2006) et reste difficilement applicable au GBM (Kamran et al. 2016). En effet, ce type d'approche est

restreint par le CMH et donc sujet aux mécanismes d'échappement tumoral tels que la diminution d'expression des complexes CMH/peptide (Figure 11).

ii. Récepteurs chimériques (CAR)

Une nouvelle génération de cellules en plein essor, conçues par génie génétique pour le transfert adoptif, est basée sur l'utilisation de cellules T transduites avec un récepteur chimérique (CAR) ciblant spécifiquement un antigène tumoral. Le récepteur CAR est la combinaison entre un anticorps (*single-chain variable fragment* ou scFv) spécifique d'un antigène tumoral, fusionné au domaine de transduction intracellulaire ζ du CD3, nécessaire à l'activation des voies de signalisation du LT (**Figure 15**) (Fesnak, June, et Levine 2016). Ainsi, les CAR exploitent à la fois les propriétés des cellules T (migration, cytotoxicité directe, mémoire immunologique) et celles des anticorps (forte capacité de reconnaissance antigénique indépendante du CMH).



Figure 15 : Comparaison entre les structures d'un récepteur TCR modifié génétiquement et d'un récepteur chimérique CAR. De même que le récepteur TCR endogène naturel (à gauche), le TCR transgénique repose sur le recrutement de molécules intracellulaires endogènes telles que LAT (*linker for activation of T cell family member 1*) et ZAP70 (protéine associée à la chaîne ζ de 70kDa), pour transduire le signal. Il reconnaît un antigène spécifique présenté par la molécule du CMH et nécessite des signaux de co-stimulation pour s'activer pleinement. Les récepteurs chimériques aux antigènes (CAR, à droite), ne possèdent pas les chaînes α et β du TCR. Leur portion extracellulaire est constituée des chaînes variables V_H (lourde) et V_L (légère) d'un anticorps, fusionnée à un domaine transmembranaire et à une portion intracellulaire comprenant un(des) domaines de co-stimulation liés à la chaîne CD3 ζ . Les CARs reconnaissent l'antigène de surface indépendamment du CMH, et recrutent également des molécules intracellulaires endogènes pour transduire le signal, avec des signaux de co-stimulation directement induits lors de leur activation. Adapté de Fesnak et al. 2016.

Plusieurs générations de récepteurs CAR ont été générées pour augmenter leur efficacité, avec l'ajout de domaines de co-stimulation tels que CD27, CD28, ICOS, 4-1BB et/ou OX40 au niveau de la chaîne intracellulaire (Fesnak, June, et Levine 2016). Les cellules CAR ne sont donc pas restreintes par le CMH et permettent, via leurs fragment d'anticorps extracellulaires, un ciblage des cellules tumorales plus affin que les récepteurs TCR classiques (Fousek et Ahmed, 2015; Fesnak et al. 2016). De plus, ces cellules semblent présenter une meilleure diffusion et persistance dans le micro-environnement tumoral comparées aux anticorps monoclonaux (Calinescu et al. 2015). Les cellules CAR ont été développées avec succès dans le traitement des leucémies lymphoblastiques aiguës réfractaires (Till et al. 2012; Kochenderfer et al. 2015), démontrant leur persistance dans le temps ainsi que leur efficacité anti-tumorale pouvant aller jusqu'à la rémission complète de certains patients. Une variété de récepteurs CAR a également été développée pour traiter les patients atteints de GBM et ciblent notamment l'EGFRvIII et l'IL-13R α 2.

Deux essais cliniques de phase I et I//II basés sur l'utilisation de cellules CAR autologues ciblant l'EGFRvIII (respectivement NCT02209376, 2017; NCT01454596, 2017), sont actuellement en cours d'évaluation. Leur objectif est d'étudier la faisabilité et la tolérance d'injections de CAR anti-EGFRvIII chez des patients atteints de GBM et dont les cellules tumorales expriment ce variant de l'EGFR. L'efficacité de cette thérapie cellulaire pourra ensuite être comparée à la vaccination peptidique au « rindopepimut » (phase III) (Weller et al. 2016). Suite à des études précliniques (Kahlon et al. 2004; Krebs et al. 2014), des essais pilotes de cellules CAR ciblant l'IL-13Ra2 ont été lancés. L'IL-13Ra2 est un récepteur associé au GBM, très peu exprimé par les cellules cérébrales saines et corrélé à un mauvais pronostic (Debinski et al. 1999; Brown et al. 2016). Un premier essai clinique a été lancé sur 3 patients atteints de GBM en récidive et a montré la faisabilité et la bonne tolérance de l'infusion de CAR anti-IL-13R α 2 ainsi qu'une réponse anti-tumorale transitoire chez 2 patients. Néanmoins, la survenue de la rechute peut s'expliquer par une perte d'expression du récepteur à la surface des cellules réfractaires (Brown et al. 2015). Un second essai pilote a été réalisé sur un patient de 50 ans en récidive. Les infusions intracrâniennes et intraventriculaires qui permettent de délivrer les cellules CAR autologues respectivement sur le site tumoral et dans le LCS, ont montré une régression de la tumeur avec une réponse clinique qui perdurait plus de 7,5 mois (NCT02208362 2017, 02208362). L'étude est toujours en cours bien que le patient ait récemment rechuté avec l'apparition de nouveaux foyers tumoraux négatifs en IL-13R α 2 dans le cerveau (Brown et al. 2016).

Enfin, il est important de noter que de graves effets secondaires principalement liés au relargage massif de cytokines, ont été rapportés. Cette réaction inflammatoire aiguë (ou « tempête cytokinique ») toucherait 2/3 des patients recevant des cellules CAR dans les quelques jours suivant l'infusion (Xu et Tang, 2014). Ces effets indésirables peuvent être contournés via l'administration au patient de corticostéroïdes et/ou des molécules bloquant l'effet des cytokines telles que le « tocilizumab » (anticorps monoclonal antagoniste du récepteur à l'IL-6).

L'intérêt porté à l'immunothérapie anti-cancéreuse a permis le développement et l'analyse de nouveaux outils thérapeutiques qui pourraient, à terme, être utilisés pour traiter les patients atteints de GBM. Ces avancées rencontrent néanmoins de nombreux obstacles notamment liés aux propriétés intrinsèques de la tumeur, capable d'échapper au SI voire de le subvertir en sa faveur. Ainsi, bien que certains essais cliniques aient permis l'obtention de résultats prometteurs, la majorité des outils immunothérapeutiques conçus pour cibler spécifiquement les cellules tumorales échouent en raison notamment de la difficulté à identifier un antigène tumoral immunogène, relativement stable dans le temps et dont l'expression resterait inchangée suite au traitement. Le développement de stratégies thérapeutiques novatrices dans le domaine de l'immunothérapie cellulaire adoptive anti-GBM étudie actuellement de nouveaux effecteurs cellulaires capables de patrouiller dans le parenchyme cérébral et d'induire l'élimination spécifique des cellules tumorales résiduelles. Parmi eux, les lymphocytes T V γ 9V δ 2 suscitent un intérêt grandissant et font l'objet de ce travail de thèse.

III. Les lymphocytes T Vγ9Vδ2

A. Généralités

Les cellules T $\gamma\delta$ sont des lymphocytes T non conventionnels qui expriment des récepteurs spécifiques d'antigènes (TCR) composés d'une chaîne γ et d'une chaîne δ . L'analyse transcriptomique des LT $\gamma\delta$ réalisée par Pont et al. montre que leur signature moléculaire est un savant mélange entre les cellules NK et les LT $\alpha\beta$ (Pont et al. 2012). En plus de ce profil d'expression génique hybride, leurs caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles les placent à l'interface entre l'immunité innée et l'immunité adaptative (**Figure 16**) (Bonneville, O'Brien, et Born 2010).



Figure 16 : Réponses immunitaires innées et adaptatives. La réponse immunitaire innée constitue la première ligne de défense de l'organisme. Elle inclut des facteurs solubles, telles que les protéines du complément, et divers composants cellulaires dont les granulocytes (basophiles, éosinophiles et neutrophiles), les mastocytes, les cellules dendritiques et les cellules NK. La réponse immunitaire adaptative se développe plus lentement, mais présente une spécificité antigénique accrue ainsi qu'une mémoire immunologique. Elle inclut les anticorps produits par les lymphocytes B ainsi que les LT CD4⁺/CD8⁺. Les cellules NKT et les LT $\gamma\delta$ sont des lymphocytes cytotoxiques situés à l'interface entre l'immunité innée et adaptative. Adapté de Dranoff, 2004.

Les cellules T $\gamma\delta$ sont les premiers lymphocytes T à se développer chez l'ensemble des vertébrés étudiés. Leur première contribution est une protection immunitaire néonatale de l'organisme, lorsque les CPA sont encore immatures et que les réponses T aß conventionnelles ne sont pas encore fonctionnelles (Vantourout et Hayday 2013). Ils ont ensuite pour rôle de surveiller l'environnement et de médier les défenses immunitaires de l'hôte contre les infections, les transformations cellulaires et les dommages tissulaires (Adams, Gu, et Luoma 2015; Silva-Santos, Serre, et Norell 2015). Loin d'être une population cellulaire rare, les LT $\gamma\delta$ sont répartis chez l'adulte un peu partout dans l'organisme. Bien qu'ils soient plus répandus au niveau des tissus épithéliaux tels que la peau et l'intestin, où ils peuvent représenter jusqu'à 50% des cellules T, les LT $\gamma\delta$ sont présents en faible proportion (1-5%) dans le sang périphérique (Silva-Santos, Serre, et Norell 2015). Ces cellules T constituent une population lymphocytaire conservée au cours de l'évolution et sont classées sur la base de leurs chaînes variables (V) du TCR. Toutefois, l'apparition de divergences au niveau des loci codant pour les TCR γ et TCR δ empêche la comparaison stricte des orthologues directs entre certaines espèces telles que les rongeurs et les primates (Kazen et Adams, 2011). Ainsi, malgré l'absence d'homologue murin, les LT $\gamma\delta$ les plus abondants (50-95%) du sang périphérique chez l'homme et les primates non humains, expriment un hétérodimère constitué des chaînes Vy9 et V82 du TCR (aussi nommées Vy2 et V82 dans la littérature) (Silva-Santos, Serre, et Norell 2015).

A.1. Ontogenèse

La grande majorité des études portant sur le développement lymphocytaire T $\gamma\delta$ est basée sur l'utilisation de modèles murins, qui ne possèdent pas de LT V γ 9V δ 2 ni d'équivalents structuraux ou fonctionnels. Ceci explique en grande partie le fait que leur ontogenèse n'ait pas encore été élucidée et reste obscure. Toutefois, il a été montré que les cellules T $\gamma\delta$ et $\alpha\beta$ apparaissent de façon concomitante au cours du développement thymique et trouvent leur origine dans un précurseur commun aux deux populations cellulaires (**Figure 17**) (Dudley et al. 1995; Vantourout et Hayday 2013). Chez l'homme, les LT V γ 9V δ 2 apparaissent dès le stade fœtal (McVay et Carding 1996), et sont prédominants à 23 semaines de gestation avant de diminuer progressivement avant la naissance (Dimova et al. 2015). Ils augmentent ensuite jusqu'à l'âge de 8 ans, à la fois en terme de nombre absolu et de proportion de LT CD3⁺ dans la circulation générale. Les LT V γ 9V δ 2 génèrent leurs TCR suite non seulement à des réarrangements de leurs chaînes variables γ et δ , mais également à de multiples mécanismes de sélections thymiques puis extra-thymiques qui restent encore à élucider (Parker et al. 1990; Pauza et Cairo 2015). La population cellulaire T $\gamma\delta$ directement issue du thymus est hétérogène et ne contient qu'une faible proportion de LT V γ 9V δ 2 (**Figure 17**). Après passage dans la circulation générale, les LT V γ 9V δ 2 nouvellement produits rencontrent leurs antigènes spécifiques, s'amplifient et s'accumulent en périphérie (Vantourout et Hayday, 2013; Pauza et Cairo, 2015). La proportion de LT V γ 9V δ 2 CD45RO⁺ (marqueur mémoire) devient ainsi de plus en plus importante au cours du temps, de sorte que la majorité des LT V γ 9V δ 2 circulant chez l'adulte sont des lymphocytes mémoires, ayant déjà rencontré leurs antigènes (Parker et al. 1990; Bonneville et Scotet 2006). Dans le sang périphérique, plus d'une cellule circulante sur 40 serait un LT V γ 9V δ 2 mémoire, ce qui constituerait la plus vaste mémoire immunitaire chez l'homme (Pauza et Cairo, 2015).



Figure 17 : Proposition des principales étapes à l'origine du répertoire V γ 9V δ 2 chez l'adulte avec sélection et expansion thymique puis extra-thymique. Les LT $\gamma\delta$ sont issus de précurseurs thymiques communs aux LT $\alpha\beta$ et $\gamma\delta$. Bien que le développement thymique des LT V γ 9V δ 2 ne soit pas encore élucidé, les réarrangements des chaînes du TCR ainsi que les mécanismes de sélection thymique seraient à l'origine d'une population cellulaire hétérogène de LT $\gamma\delta$, au sein de laquelle les LT V γ 9V δ 2 sont minoritaires. Le postulat actuel serait qu'après passage dans la circulation générale, les LT V γ 9V δ 2 qui rencontreraient leurs antigènes soient amplifiés sélectivement (jaunes) ce qui modulerait de façon continue le répertoire V γ 9V δ 2 chez l'adulte. Adapté de Dudley et al. 1995; Vantourout and Hayday, 2013; Pauza and Cairo, 2015.

A.2. Répertoire des LT Vγ9Vδ2

La puissance du SI repose sur sa capacité à générer des milliards de récepteurs spécifiques d'antigènes différents à partir de l'assemblage par recombinaisons somatiques de segments de gènes. Ces recombinaisons associent un segment d'ADN « variable » (V) à un segment de « jonction » (J), avec dans certains cas une liaison à une séquence de « diversité » (D) afin de former la région variable des chaînes des récepteurs cellulaires B (BCR) et T (TCR). Au même titre que les LB et LT $\alpha\beta$, les LT $\gamma\delta$ génèrent leurs TCR suite à ces recombinaisons génétiques qui conduisent à la grande diversité de leur répertoire. Malgré un répertoire V relativement restreint (6 à 7 fois inférieur à celui des chaînes α et β) qui limite la diversité combinatoire des TCR $\gamma\delta$, les délétions et/ou additions aléatoires de nucléotides au niveau des jonctions V-(D)-J constituent une diversité jonctionnelle importante. Celle-ci conduit à la génération d'une grande variété de TCR $\gamma\delta$, pouvant varier d'une sous population de LT $\gamma\delta$ à une autre, et dont le répertoire théorique serait 100 fois plus important que celui des αβ (Chien et Konigshofer 2007; Harly, Peigné, et Scotet 2014). Le TCR Vγ9Vδ2 est ainsi formé d'une chaîne Vγ9 réarrangée avec le segment de jonction JP puis épissée pour former la chaîne Vγ9-JP-C1 (Figure 18) (Pauza et Cairo 2015). De plus, l'ajout aléatoire de nucléotides lors de la recombinaison V-J accroît encore la diversité jonctionnelle (Figure 18). Cette chaîne est le plus souvent associée à la chaîne V δ 2 qui présente une forte variabilité du fait notamment d'associations aléatoires entre les séquences, avec un réarrangement supplémentaire au segment de « diversité » (D).



Figure 18 : Recombinaison et épissage de l'ARNm générant la chaîne du TCR V\gamma9-JP-C1. Structure du locus de la chaîne γ humaine et étapes de l'assemblage de la chaîne V γ 9-JP-C1. La figure décrit une portion du chromosome 7 (p15-p14) humain et n'est pas dessinée à l'échelle. Dans la lignée germinale sont présents 14 gènes ou pseudogènes de la chaîne variable γ (V), 5 segments jonctionnels (J) et deux régions constantes (C). Les régions violettes, vertes, jaunes et rouges représentent des séquences fonctionnelles. Les régions grises sont des pseudogènes. Les régions blanches sont des cadres de lecture ouverte non fonctionnels. La région N (orange) indique la zone de N-addition de nucléotides et identifie la diversité jonctionnelle introduite durant la recombinaison V-J. Les séquences ne possédant pas de région N sont considérées comme germinales. Adapté de Pauza et Cairo, 2015.

L'étude du répertoire TCR V γ 9V δ 2 par séquençage des ADN complémentaires produits à partir des ARN messagers, est notamment employée pour caractériser les modifications liées à l'âge, l'impact des maladies et les réponses aux thérapies. Chez l'homme, le répertoire TCR V γ 9V δ 2 peut varier en fonction du stade fœtal avec des changements majeurs chez le nouveau-né, l'enfant et l'adulte, qui dépendent directement de l'histoire immunologique de chaque individu. Plus tard dans la vie d'adulte, la complexité du répertoire V γ 9V δ 2 décline en raison notamment de la sélection positive continue et de la diminution de la synthèse de nouvelles cellules (Pauza et Cairo 2015).

A.3. Fonctions effectrices des LT Vγ9Vδ2

A.3.1. Pléiotropie fonctionnelle

De nombreuses études ont montré le rôle central et pléiotrope des LT $\gamma\delta$, dont les LT V $\gamma9V\delta2$, dans les défenses immunitaires de l'hôte contre les infections, les transformations cellulaires et les dommages tissulaires (Vantourout et Hayday 2013).



Figure 19 : Principales fonctions effectrices des LT $\gamma\delta$. L'ensemble des LT $\gamma\delta$ est capable de défendre l'hôte via six mécanismes d'action principaux : (1) les LT $\gamma\delta$ sont capables d'éliminer les cellules stressées (infectées ou transformées) via la libération de perforine et de granzymes ; (2) ils sont capables de produire un large panel de cytokines et de chimiokines permettant de réguler les cellules immunitaires ; (3) ils peuvent aider les LB et promouvoir la production d'IgE ; (4) ils sont capables de présenter des antigènes aux cellules T $\alpha\beta$; (5) ils peuvent induire la maturation des cellules dendritiques ; (6) ils peuvent réguler les fonctions des cellules stromales via la production de facteurs de croissance. Adapté de Vantourout et Hayday 2013.

Six mécanismes d'action principaux des LT Vγ9Vδ2 ont été décrits (Figure 19) :

- Les LT V γ 9V δ 2 sont capables de lyser et d'éliminer par contact direct les cellules stressées, infectées ou transformées via notamment la production et la libération de perforine et de granzymes (Bonneville, O'Brien, et Born 2010).

- En réponse à divers signaux environnementaux, ils sont capables de produire un large panel de facteurs solubles tels que des cytokines pro-inflammatoires (TNF-α ou *tumor necrosis factor-α*, IFN-γ) et des chimiokines (CCL3/4, CXCL10) afin de réguler les cellules immunitaires tels que les cellules NK et les macrophages (Vantourout et Hayday 2013).
- Les LT Vγ9Vδ2 peuvent interagir avec les LB en régulant notamment leur organisation au sein des tissus lymphoïdes via la production de *CXC-chemokine ligand 13* (CXCL13) (Vermijlen et al. 2007), ou encore en favorisant la production d'anticorps (Caccamo et al. 2006).
- Les LT V γ 9V δ 2 sont capables de présenter des antigènes aux cellules T $\alpha\beta$. En effet, Brandes et al. ont montré en 2005 que lorsque les LT V γ 9V δ 2 majoritairement présents dans le sang s'activent, l'expression des molécules de CMH-I/II et de co-stimulation CD80/86 augmente pour atteindre des niveaux similaires à ceux des CPA (Brandes, Willimann, et Moser 2005). De plus, leur activation induirait l'expression de *CCchemokine receptor* 7 (CCR7) permettant leur migration vers les ganglions lymphatiques (Brandes, Willimann, et Moser 2005).
- Les LT V γ 9V δ 2 peuvent collaborer avec les cellules dendritiques et affiner les signaux qu'elles reçoivent de l'environnement. Ils sont ainsi capables de potentialiser la maturation des cellules dendritiques (Conti et al. 2005; Devilder et al. 2006).
- Enfin, les LT Vγ9Vδ2 peuvent également réguler les fonctions des cellules stromales via la production de cytokines et de facteurs de croissance (Vantourout et Hayday 2013).

A.3.2. Plasticité cellulaire

En plus des fonctions effectrices décrites précédemment, les cellules T V γ 9V δ 2 sont capables de s'adapter aux différents signaux qu'elles perçoivent dans leur environnement (Vermijlen et al. 2007) et présentent une plasticité fonctionnelle à la fois innée et acquise (Bonneville, O'Brien, et Born 2010). La plasticité innée fait référence à la mise en place transitoire de fonctions effectrices spécifiques, dépendantes du contexte d'activation tel que la nature des stimuli inflammatoires ou du signal TCR. A l'inverse, la plasticité acquise fait référence à une capacité des LT V γ 9V δ 2 à réaliser sur plus long terme différents types de fonctions effectrices co-régulatrices en réponse au signal TCR et à des signaux environnementaux (Bonneville, O'Brien, et Born 2010).

B. Réactivité des lymphocytes T Vγ9Vδ2

Les LT V γ 9V δ 2 sont des senseurs de stress cellulaires qui peuvent être activés dans de nombreux contextes et reconnaître des cellules infectées ou transformées. Leur activation antigénique est déclenchée par la reconnaissance et l'engagement du TCR V γ 9V δ 2 vis-à-vis de son antigène, spécifiquement présenté à la surface de la cellule cible.

B.1. Phosphoantigènes

Les LT Vy9V82 sont capables de reconnaître spécifiquement des petites molécules nonpeptidiques phosphorylées, nommées phosphoantigènes (pAg) (C. T. Morita et al. 1995; Tanaka et al. 1995). Cette reconnaissance, dépendante du TCR Vγ9Vδ2, n'est pas restreinte par la molécule du CMH ce qui explique le fait que ces lymphocytes ne soient pas alloréactifs. Les pAg sont des métabolites très conservés, issus des voies de biosynthèse des isoprénoïdes et retrouvés à la fois chez les vertébrés et les micro-organismes. Ils sont essentiels au métabolisme cellulaire puisqu'ils sont notamment à l'origine de la synthèse de nombreux lipides et de modifications post-traductionnelles des protéines (Thurnher, Nussbaumer, et Gruenbacher 2012). Parmi les pAg naturels, l'IPP (isopenthenyl pyrophosphate) est naturellement produit par l'ensemble des cellules eucaryotes et procaryotes, et peut être synthétisé selon deux voies différentes en fonction de la nature de l'organisme (Figure 20). Chez les vertébrés, l'IPP est synthétisé à partir de la voie du mévalonate (MVA), tandis que chez les micro-organismes, il dérive de la voie MEP/DOXP (methylerythritol phosphate / deoxyxylulose-5-phosphate) qui conduit également à la synthèse d'un autre pAg reconnu par les LT V γ 9V δ 2, le HMBPP (*hydroxymethylbutenyl* 4-diphosphate). Le HMBPP est un métabolite bactérien qui présente une bioactivité très largement supérieure à celle de l'IPP (EC₅₀ 39-70 pM vs 50-500 µM) (Tableau 3) permettant aux LT Vy9V82 de discriminer les cellules infectées des cellules saines (Harly, Peigné, et Scotet 2014). Bien que l'IPP soit un antigène ubiquitaire, il serait impliqué dans la reconnaissance des cellules du Soi stressées ou transformées par les LT Vy9V82. Certaines cellules tumorales présenteraient une dérégulation de la voie du MVA induisant une augmentation d'IPP intracellulaire qui permettrait aux LT Vy9V82 de différencier les cellules stressées ou cancéreuses des cellules saines (Gober et al. 2003; Silva-Santos, Serre, et Norell 2015).



Figure 20 : Synthèse des précurseurs isoprénoïdes chez les vertébrés et les micro-organismes. Représentation schématique des voies du mévalonate (MVA) et du MEP/DOXP (*methylerythritol phosphate / deoxyxylulose-5-phosphate*) conduisant respectivement à la synthèse de deux phosphoantigènes, l'IPP (*isopenthenyl pyrophosphate*) chez les vertébrés et le HMBPP (*hydroxymethylbutenyl 4-diphosphate*) chez les micro-organismes. HMG-CoA : hydroxyméthylglutaryl-CoA ; MVAP : 5-phosphomévalonate ; MVAPP : mévalonate-5-diphosphate ; DMAPP : diméthylallyl pyrophosphate ; PPP : polyprenyl diphosphate ; CDP ME : 4-diphosphocytidyl méthylerythritol ; MEcPP : méthylerythritol cyclodiphosphate. Adapté de Thurnher et al. 2012; Coppens, 2013; Wiemer and Wiemer, 2014.

Des analogues synthétiques des pAg naturels ont ensuite été développés et sont actuellement commercialisés. Le BrHPP (*bromohydrin IPP*) figure parmi les pAg synthétiques les plus connus, présente une bioactivité supérieure à celle de l'IPP naturel (EC₅₀ 20-50 nM *vs* 50-500 μ M) (**Tableau 3**) et est notamment utilisé *in vitro* pour activer spécifiquement les LT V γ 9V δ 2 (Espinosa et al. 2001).

Tableau 3 : Exemples de phosphoantigènes caractérisés capables d'induire l'activation des LT V\gamma9V\delta2. Ces phosphoantigènes peuvent être d'origine naturelle ou synthétique. Ils induisent des niveaux d'activation variables avec diverses valeurs d'EC₅₀ et des différences de réponses peuvent également être observées entre les différents donneurs de LT V γ 9V δ 2. IPP : *isopenthenyl pyrophosphate* ; HMBPP : *hydroxymethylbutenyl 4- diphosphate* ; BrHPP : *bromohydrin IPP*. Adapté de Harly, Peigné, et Scotet 2014.

Phosphoantigènes	EC ₅₀	Molécules	Туре
IPP	50-500 μM		Naturel (vertébrés et microorganismes)
HMBPP	39-70 pM	но 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	Naturel (vertébrés et microorganismes)
BrHPP	20-50 nM	CH2Br OH OH OH OH OH OH OH	Synthétique

B.2. Reconnaissance des phosphoantigènes par le TCR Vγ9Vδ2

Les LT V γ 9V δ 2 peuvent être spécifiquement activés par leurs pAg aussi bien dans des contextes infectieux que tumoraux, avec une amplitude de réponses qui varie en fonction des TCR exprimés (Evans et al. 2001). Ainsi, au sein d'une population de LT V γ 9V δ 2 issue d'un même donneur sain adulte, chaque clone cellulaire peut proliférer plus ou moins rapidement après stimulation (Pauza et Cairo, 2015). Les bases moléculaires de l'interaction entre le TCR V γ 9V δ 2 et son pAg n'ont pas encore été clairement identifiées et font l'objet de nombreuses études. La première hypothèse en faveur d'une interaction sans intervention d'un intermédiaire moléculaire entre le pAg et le TCR, n'a jamais été clairement démontrée (Harly, Peigné, et Scotet 2014) et la nécessité de contacts cellulaires pour activer les LT V γ 9V δ 2 par les pAg solubles réfute la possibilité d'un processus de reconnaissance directe (Lang et al. 1995; C. T. Morita et al. 1995). Par la suite, des études ont tenté d'identifier des molécules candidates qui pourraient être impliquées dans les mécanismes de présentation des pAg aux cellules T. Ainsi, l'association entre l'Ecto-F1-ATP synthase et l'apolipo-protéine A-1 à la surface des cellules cibles pourrait constituer un complexe de présentation

des pAg pour les LT Vy9V82 (Scotet et al. 2005). En parallèle, diverses études se sont intéressées à un autre acteur moléculaire, la butyriphiline BTN3A1, dont l'implication dans la réactivité des LT Vy9V82 a clairement été démontrée au cours de ces dernières années (Harly et al. 2012; Vavassori et al. 2013). BTN3A1 (ou CD277 isoforme 1) est une glycoprotéine de type I exprimée à la surface des cellules cibles, appartenant à la superfamille des immunoglobulines (Ig) et composée de 2 domaines extracellulaires IgV et IgC, liés au domaine intracellulaire B30.2 (Figure 21). BTN3A1 est exprimée de façon ubiquitaire chez l'homme, et des homologues sont retrouvés chez les primates possédant des LT Vy9V82 (Harly, Peigné, et Scotet 2014). Il n'existe pas d'orthologues de BTN3A1 chez les rongeurs qui ne possèdent pas d'équivalents lymphocytaires T Vγ9Vδ2 (Vantourout et Hayday 2013; Silva-Santos, Serre, et Norell 2015). Les mécanismes moléculaires mis en jeu dans l'interaction entre BTN3A1 et les pAg ne sont pas encore élucidés et il existe actuellement 2 hypothèses principales. En 2012, Harly et al. proposent un « modèle allostérique » dans lequel les pAg endogènes ou internalisés, interagissent avec le domaine intracellulaire B30.2 de BTN3A1, induisant des modifications conformationnelles de la protéine, des variations de la topographie membranaire et/ou le recrutement/exclusion de partenaire(s) moléculaire(s) (Harly et al. 2012). Ces modifications allostériques seraient ensuite perçues par les LT Vy9V62, conduisant à leur activation (Figure 21). L'année suivante, Vavassori et al. proposent un « modèle de présentation antigénique » dans lequel les pAg endogènes sont exportés et interagissent avec la partie extracellulaire de BTN3A1. Les pAg seraient alors présentés par le domaine extracellulaire IgV comme complexe antigénique aux LT Vy9V82 entraînant leur activation (Vavassori et al. 2013) (Figure 21). Le transporteur membranaire responsable de l'extrusion de pAg endogènes vers le milieu extracellulaire a été récemment identifié (Castella et al. 2017). L'ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1) qui appartient à la famille des transporteurs ABC, est notamment impliqué dans la voie du cholestérol. Son association avec l'apolipoprotéine A-1 et la molécule BTN3A1, jouerait un rôle dans l'export d'IPP endogène vers le compatiment extracellulaire (Castella et al. 2017).



Figure 21 : Trois mécanismes d'action hypothétiques pour l'induction de l'activation des LT V γ 9V δ 2 par les pAg. (A) « Modèle allostérique » : les pAg d'origine endogène (issus de la voie du mévalonate (MVA)) ou internalisés via un transpotreur membranaire, interagissent avec le domaine intracellulaire B30.2 de BTN3A1, qui induit des modifications conformationnelles de la protéine, des variations de la topographie membranaire et/ou le recrutement/exclusion de partenaires moléculaires. Ces modifications sont ensuite perçues par les LT V γ 9V δ 2, conduisant à leur activation. (B-C) « Modèles de présentation antigénique » (B) les pAg endogènes sont exportés via un transpotreur membranaire. Les pAg intra et extracellulaires interagissent avec le domaine extracellulaire de BTN3A1. Les pAg sont présentés par le domaine extracellulaire IgV comme complexe antigénique aux LT V γ 9V δ 2, conduisant à leur activation. (C) Les pAg produits par la cellule interagissent avec le domaine intracellulaire B30.2 de BTN3A1 puis sont exportés via un transpotreur membranaire interagissent avec le domaine extracellulaire B30.2 de BTN3A1 puis sont exportés via un transpotreur membranaire associé à BTN3A1. Les pAg intra et extracellulaires interagissent avec le domaine intracellulaire B30.2 de BTN3A1 puis sont exportés via un transpotreur membranaire associé à BTN3A1. Les pAg intra et extracellulaires interagissent avec le domaine extracellulaire B30.2 de BTN3A1 puis sont exportés via un transpotreur membranaire associé à BTN3A1. Les pAg intra et extracellulaires interagissent avec le domaine extracellulaire B30.2 de BTN3A1 puis sont exportés via un transpotreur membranaire associé à BTN3A1. Les pAg intra et extracellulaires interagissent avec le domaine extracellulaire IgV de BTN3A1 et induisent l'activation des LT V γ 9V δ 2. Adapté de Harly, Peigné, et Scotet 2014.

B.3. Autres molécules modulatrices de l'activation des LTVγ9Vδ2

B.3.1. Aminobisphosphonates et alkylamines

Contrairement aux pAg naturels et synthétiques capables d'activer directement les LT V γ 9V δ 2, des composés d'origine naturelle et/ou synthétique sont capables d'inhiber spécifiquement certaines enzymes impliquées dans la synthèse des isoprénoïdes.

Les aminobisphosphonates (ABP) tels que le pamidronate et le zolédronate (Figure 22), sont des composés pharmacologiques utilisés en clinique afin de lutter contre les troubles

de résorption osseuse tels que l'ostéoporose et les métastases osseuses (Thurnher, Nussbaumer, et Gruenbacher 2012). Ces drogues sont capables d'inhiber l'enzyme farnésyl pyrophosphate synthase (FPP synthase) qui catalyse la condensation séquentielle de l'IPP et/ou du DMAPP sous formes farnésylpyrophosphate et géranylpyrophosphate (**Figure 20**). L'effet activateur de ces molécules sur les LT V γ 9V δ 2 a été mis en évidence pour la première fois par Kunzmann et al. qui ont observé chez 4 patients traités au pamidronate sur 10, le développement d'une réaction immunitaire aiguë associée à une augmentation significative du nombre de LT V γ 9V δ 2 circulants (Kunzmann, Bauer, et Wilhelm 1999). Cette observation a ensuite été confirmée par diverses études qui démontrent l'existence d'une corrélation positive entre l'inhibition de la FPP synthase (entraînant l'accumulation d'IPP dans la cellule traitée) et l'activation des LT V γ 9V δ 2, ainsi que l'implication directe des ABP (dont le zolédronate) dans la stimulation des LT V γ 9V δ 2 (Das et al. 2001; Gober et al. 2003; Sanders et al. 2004).



Figure 22 : Structures moléculaires du pamidronate et du zoledronate. Ces 2 composés pharmacologiques sont les aminobisphosphonates les plus utilisés. Adapté de Riganti et al. 2012.

Les **alkylamines** sont des composés naturels secrétés par certaines bactéries commensales et pathogènes, et sont communément retrouvées dans les fluides humains (Craig T. Morita et al. 2007). Ces molécules sont également présentes dans des produits végétaux comestibles tels que le thé, le vin, les pommes et les champignons (Kamath et al. 2003; Craig T. Morita et al. 2007). De façon similaire aux ABP, ces molécules sont capables d'inhiber la FPP synthase, induisant l'accumulation de pAg endogènes et l'activation indirecte des LT V γ 9V δ 2 (Bukowski, Morita, et Brenner 1999; Thompson, Rojas-Navea, et Rogers 2006).

B.3.2. Récepteurs des cellules NK

En plus du TCR, les LT V γ 9V δ 2 expriment naturellement des récepteurs activateurs et inhibiteurs des cellules NK (NKR) qui apportent une contribution importante à leur réactivité (Raulet et Guerra 2009; Bonneville, O'Brien, et Born 2010).

Parmi les NKR activateurs, NKG2D (natural killer group 2, member D) est une protéine transmembranaire appartenant à la famille des lectines de type II et est associé de façon non covalente à une protéine adaptatrice intracellulaire DAP10 qui permet la transduction du signal activateur suite à la liaison du récepteur avec son ligand. Ce récepteur se lie aussi bien aux molécules du CMH de classe I non classiques MICA/B (MHC class I polypeptiderelated sequence A/B) qu'aux molécules UL16 binding protein (ULBPs), dont l'expression est le plus souvent induite par un stress cellulaire, qui entraîne donc leur surexpression à la surface des cellules infectées ou transformées (Raulet et Guerra 2009). NKG2D est recruté au cours de la formation de la synapse immunologique entre le LT V γ 9V δ 2 et sa cellule cible, et joue un rôle majeur dans la co-stimulation des LT Vγ9Vδ2. En plus du TCR, l'engagement du récepteur NKG2D amplifie le plus souvent de façon synergique la réponse des LT Vy9V82 (Bonneville, O'Brien, et Born 2010), mais pourrait dans certains cas, entraîner une cytotoxicité directe en l'absence de signal TCR contre des cellules infectées par des virus (Qin et al. 2009). Les LT Vy9V82 expriment également des NKR inhibiteurs tels que le complexe CD94/NKG2A qui reconnaît les molécules du CMH non classiques HLA-E (Poccia et al. 1997), et ILT-2 (Ig-like transcript 2) qui interagit avec les molécules du CMH non classiques HLA-G (Lesport et al. 2011). Comme pour les cellules NK, l'interaction entre ces récepteurs et leurs ligands induit des signaux inhibiteurs qui vont entrer en compétition avec les signaux activateurs, pour ainsi conduire à une réponse lymphocytaire T $\gamma\delta$ finement régulée.

B.3.3. Cytokines

L'activité des LT V γ 9V δ 2 est constamment modulée par des signaux environnementaux. Les cytokines, jouent un rôle important dans l'immunomodulation LT V γ 9V δ 2. L'**IL-2** agit notamment comme un facteur de croissance sur les LT en régulant leur prolifération, et augmente la cytotoxicité des cellules NK (Rochman, Spolski, et Leonard 2009). Lorsqu'elle est utilisée en combinaison avec un pAg ou un ABP *in vitro*, l'IL-2 induit la prolifération et la maturation des LT V γ 9V δ 2 en cellules effectrices à partir de PBMC. D'autres cytokines sont capables d'agir sur les fonctions effectrices des LT V γ 9V δ 2. C'est notamment le cas de l'**IL-21**, qui lorsqu'elle est combinée à l'IL-2, n'influence pas la prolifération cellulaire, mais induit la polarisation des LT V γ 9V δ 2 vers un phénotype effecteur cytolytique et pro-inflammatoire, en favorisant notamment leur production de perforine et de granzymes A/B ainsi que leur capacité de dégranulation (Thedrez et al. 2009).

B.3.4. Toll-like récepteurs

Les **TLR** (*toll-like receptors*) sont des récepteurs co-stimulateurs exprimés par les LT V γ 9V δ 2 qui reconnaissent des motifs moléculaires non peptidiques hautement conservés. Les ligands des TLR aussi appelés PAMP (*pathogen-associated molecular patterns*) et DAMP (*danger-associated molecular patterns*), sont retrouvés chez certains microorganismes et surexprimés en réponse au stress cellulaire tel que l'infection ou la transformation (Devilder et al. 2009). Ils constituent des signaux de danger détectés par le SI qui induisent son activation. Ensemble, les TLR et les NKR associés à l'engagement du TCR, vont activer les fonctions effectrices des LT V γ 9V δ 2 via l'induction de signaux séparés, synergiques ou additifs (Bonneville, O'Brien, et Born 2010).

B.3.5. Récepteurs Fc

Le CD16 (Fc γ RIIIA) est un récepteur activateur qui présente une faible affinité pour les anticorps, constitutivement exprimé par les cellules NK et retrouvé à la surface de certains LT V γ 9V δ 2. La fixation spécifique d'un fragment constant d'une IgG au CD16 permet la transduction d'un signal activateur similaire à celui induit par l'engagement du TCR V γ 9V δ 2, entraînant non seulement l'ADCC (*antibody-dependent cellular cytotoxicity*) et la lyse des cellules cibles spécifiquement reconnus par les anticorps, mais également la production de TNF- α par les LT V γ 9V δ 2 (Lafont et al. 2001). De plus, la surexpression du CD16 par les LT V γ 9V δ 2 serait également associée à une maturation cellulaire en lymphocytes T effecteurs (Angelini et al. 2004).

B.3.6. Molécules d'adhésion

L'activation lymphocytaire T V γ 9V δ 2 nécessite l'implication de molécules d'adhésion telles que LFA-1 (*lymphocyte function-associated antigen 1*) et CD2 qui participent à la formation et à la stabilité de la synapse immunologique. **LFA-1** appartient à la famille des intégrines et est fortement exprimé par les LT V γ 9V δ 2. L'interaction entre LFA-1 et son ligand naturel ICAM-1 (*intercellular adhesion molecule-1*) semble nécessaire à l'activation des LT V γ 9V δ 2 (Kato et al. 2003). **CD2** appartient à la superfamille des Ig et est exprimé aussi bien par les LT $\gamma\delta$ et $\alpha\beta$ que les cellules NK. L'interaction entre CD2 et son ligand LFA-3 est impliquée dans la prolifération des LT V γ 9V δ 2, et la production de cytokines telles que le TNF- α (Wang et Malkovsky 2000). L'activation des LT V γ 9V δ 2 dépend de nombreux signaux immunomodulateurs. La connaissance de leurs fonctions effectrices mais également des couples récepteurs/ligands activateurs et inhibiteurs, permet d'envisager des stratégies thérapeutiques basées sur l'utilisation des LT V γ 9V δ 2 aussi bien dans le cadre du traitement de maladies infectieuses que de cancers.

C. Lymphocytes T Vγ9Vδ2 contre le cancer

C.1. Propriétés anti-tumorales des LT Vy9V62

Une infiltration T $\gamma\delta$ a été décrite dans de nombreux types de cancers dont le mélanome (Bialasiewicz, Ma, et Richard 1999; Cordova et al. 2012), le cancer du sein (Ma et al. 2012) ou encore le cancer du colon (Corvaisier et al. 2005), suggérant leur implication naturelle dans l'immunité anti-tumorale. La méta-analyse de Gentles et al. s'intéresse aux TIL de diverses tumeurs et met en évidence une signature T $\gamma\delta$ majoritairement associée à un pronostic favorable pour les patients (Gentles et al. 2015). Toutefois, la corrélation entre l'infiltration T $\gamma\delta$ et la réponse clinique n'est pas toujours retrouvée (Lo Presti, Dieli, et Meraviglia 2014) en raison notamment d'un micro-environnement tumoral capable d'influer sur la pléiotropie et la plasticité de ces lymphocytes.

La subtilité et l'intérêt clinique des LT Vy9V82 réside dans le fait qu'ils ne sont pas restreints par les molécules du CMH classiques et reconnaissent notamment des molécules du Soi phosphorylées. Contrairement aux LT $\alpha\beta$, la reconnaissance de leurs antigènes ne nécessite pas de présentation antigénique par les CPA, permettant une action rapide en réponse à un stress cellulaire tel qu'une transformation. Les cellules transformées ou cancéreuses peuvent être reconnues spontanément ou sensibilisées à la réactivité des LT Vγ9Vδ2 par un prétraitement aux ABP, qui entraîne l'accumulation d'IPP dans les cellules cibles et leur lyse par les LT Vy9V82 (Gober et al. 2003; Silva-Santos, Serre, et Norell 2015). Après engagement du TCR Vy9V82, la mise en place d'une cytotoxicité s'effectue préférentiellement par la voie perforine/granzymes (F. Dieli et al. 2001), mais aussi via des signaux de mort tels que TRAIL (TNF-related apoptosis inducing ligand ou CD253) et Fas/FasL (CD95/CD95L) (Lo Presti, Dieli, et Meraviglia 2014). De plus, les LT Vγ9Vδ2 activés secrètent les cytokines pro-inflammatoires (IFN- γ et TNF- α) qui peuvent avoir, sur les cellules cibles, un effet cytolytique direct ou indirect en stimulant notamment les macrophages et les cellules dendritiques (Conti et al. 2005; Devilder et al. 2006; Vantourout et Hayday 2013).

De nombreuses études ont montré une réactivité *in vitro* des LT V γ 9V δ 2 contre de nombreux cancers dont le myélome multiple (Kunzmann et al. 2000), le cancer du rein (Viey et al. 2005), du colon (Corvaisier et al. 2005) ou encore de la prostate (Z. Liu et al. 2005). Il a également été montré dans le cas du GBM que les LT V γ 9V δ 2, issus du sang périphérique de donneurs sains et de patients atteints de GBM, présentent une cytotoxicité contre des lignées et des cultures primaires de GBM (Bryant et al. 2009).

C.2. LT Vy9Vo2 et immunothérapies anti-cancéreuses

La mise en évidence du potentiel anti-tumoral des LT V γ 9V δ 2 a conduit à la mise en place de divers protocoles thérapeutiques via (i) l'administration d'agonistes capables d'activer les LT V γ 9V δ 2 tels que les pAg synthétiques ou les ABP, ou (ii) le transfert adoptif de cellules T V γ 9V δ 2 préalablement isolées à partir PBMC ou de TIL, puis amplifiées *ex vivo* (Lo Presti, Dieli, et Meraviglia 2014). Plusieurs essais cliniques de phase I ont été mis en place chez l'homme afin d'évaluer la toxicité et l'efficacité de ces stratégies.

La manipulation thérapeutique in situ des LT Vy9V82, par administration directe d'ABP associée à de faibles doses d'IL-2, a montré une bonne tolérance clinique ainsi qu'un bénéfice thérapeutique allant de la stabilisation de la pathologie jusqu'à une rémission partielle des patients atteints de tumeurs lymphoïdes malignes (Wilhelm et al. 2003) et de cancer de la prostate (Francesco Dieli et al. 2007). L'avantage clinique de l'utilisation des ABP tels que le pamidronate et le zolédronate (Figure 22), est qu'ils sont approuvés par l'ANSM (Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de santé), produits et commercialisés au grade GMP (good manufacturing practices), et induisent une amplification spécifique des LT Vy9V82 in situ. Des résultats encourageants ont par ailleurs été observés après transfert adoptif des LT Vγ9Vδ2 autologues préalablement amplifiés ex vivo et associés à de faibles doses d'IL-2 (Kobayashi et al. 2007; Bennouna et al. 2008; Abe et al. 2009). Une méta-analyse basée sur 13 essais cliniques et portant sur divers types de tumeurs (Buccheri et al. 2014), démontre une bonne tolérance de l'ensemble des patients à cette stratégie thérapeutique avec une stabilisation (Bennouna et al. 2008) voire un ralentissement de la progression tumorale observé chez certains patients répondeurs (Kobayashi et al. 2007). Un cas de rémission supérieure à 2 ans a d'ailleurs été rapporté chez un patient atteint d'un carcinome rénal avec métastases pulmonaires, suite à de multiples infusions de LT Vy9V82 autologues associées à l'administration systémique de zolédronate et d'IL-2 (Kobayashi et al. 2010). Par ailleurs, l'utilisation de LT Vγ9Vδ2 autologues

radiomarqués à l'indium 111 (¹¹¹In) lors d'un essai clinique de phase I, a permis à Nicol et al. de déterminer la localisation préférentielle des LT V γ 9V δ 2 infusés (Nicol et al. 2011). Suite à leur administration chez 18 patients atteints de diverses tumeurs solides et présentant des métastases, les LT V γ 9V δ 2 injectés par intraveineuse se répartissent principalement au niveau des poumons, du foie, de la rate, voire dans certains cas, au niveau des sites métastatiques (Nicol et al. 2011).

Des effets secondaires (fièvre, fatigue, troubles digestifs) sont néanmoins systématiquement rapportés. Bien qu'elle soit maîtrisée, il n'est pas exclu que cette toxicité soit liée à l'administration concomitante d'IL-2 (Nicol et al. 2011), dont le manque de spécificité peut non seulement induire une réaction inflammatoire aiguë (*cf.* partie B.2.2.a), mais également activer de façon non spécifique les LTreg (Chinen et al. 2016) et favoriser l'apparition d'un micro-environnement tumoral immunosuppresseur.

En plus du fait qu'ils soient retrouvés dans les TIL, la réactivité des LT V γ 9V δ 2 vis-à-vis d'un large panel de cellules tumorales place ces lymphocytes en tant que cellules effectrices candidates à l'immunothérapie anti-cancéreuse. L'ensemble des études réalisées à ce jour est en faveur d'une bonne tolérance clinique des LT V γ 9V δ 2, qu'ils soient amplifiés *in situ* via l'injection d'agonistes (pAg synthétiques ou ABP), ou administrés par voie systémique après amplification *ex vivo*. De plus, leur efficacité anti-tumorale, qui commence à être mise en évidence chez l'homme, a été largement documentée à la fois *in vitro* et *in vivo* dans des modèles précliniques. Les LT V γ 9V δ 2 font l'objet de nombreuses études et présentent un intérêt majeur du fait notamment de :

- leurs fonctions effectrices anti-tumorales ;
- leur reconnaissance spécifique vis-à-vis de molécules du Soi associées au stress et surexprimées dans les cellules cancéreuses ;
- leur indépendance vis-à-vis de la présentation classique par le CMH et donc l'absence d'alloréactivité pouvant conduire à l'établissement de banques cellulaires immuno-thérapeutiques allogéniques ;
- leur capacité d'ADCC qui permet d'envisager une administration concomitante avec des anticorps monoclonaux *in vivo* ;
- leur abondance dans le sang périphérique ;
- l'existence de méthodes spécifiques d'activation et d'expansion à la fois *ex vitro* et *in vivo* qui simplifient leur manipulation.

IV. Objectifs des travaux de recherche

Le GBM est la tumeur cérébrale primaire la plus fréquente et la plus agressive, qui figure parmi les cancers les plus difficiles à traiter en raison notamment de sa localisation, de son inclusion dans la BHE et de son caractère infiltrant et mal délimité, marqué par une prolifération rapide et hétérogène des cellules tumorales.

Malgré les efforts cliniques, peu d'avancées thérapeutiques ont été faites ces dernières années, le protocole standard restant le protocole de Stupp (Stupp et al. 2005). Ainsi, l'évolution du GBM reste péjorative et la récidive tumorale est la règle. Face à l'échec des standards thérapeutiques, la recherche de nouvelles stratégies constitue un enjeu majeur et intéresse de nombreux laboratoires. L'immunothérapie cellulaire adoptive anti-cancéreuse suscite un intérêt grandissant puisqu'elle permettrait de cibler spécifiquement les cellules tumorales résiduelles responsables de la récidive des patients atteints de GBM.

L'objectif des travaux de recherche présentés dans cette thèse a été d'évaluer la faisabilité puis de définir les conditions optimales d'utilisation d'une immunothérapie cellulaire par transfert adoptif de lymphocytes T V γ 9V δ 2 allogéniques dans le cas du GBM. Notre choix s'est porté sur ces effecteurs immunitaires, en raison notamment de leur capacité à lyser un large panel de cellules tumorales et de leur absence d'alloréactivité. En effet, la reconnaissance spécifique des antigènes, indépendante des molécules du CMH classiques, permet d'envisager l'établissement de banques cellulaires allogéniques, issues de volontaires sains et infusées à des patients atteints de GBM. Les avantages d'un système allogénique sont multiples, et comprennent notamment (i) l'homogénéité des cellules infusées aux patients, (ii) la disponibilité immédiate, permanente et durable du traitement via la constitution de banques cellulaires, ou encore (iii) l'absence de GVHD (*graft-versus-host disease*) associée à l'utilisation des LT V γ 9V δ 2 non-alloréactifs.

De plus, l'ensemble de ce travail s'appuie sur l'utilisation d'une biocollection de cultures primaires, directement issues de fragments tumoraux de patients atteints de GBM, dissociés mécaniquement puis maintenus en culture en milieu défini afin de conserver leur hétérogénéité cellulaire. Actuellement, la majorité des études sont réalisées sur des lignées cellulaires, qui correspondent à des populations cellulaires homogènes, stables, faciles d'utilisation, mais peu représentatives de la diversité intra-tumorale observée chez les

patients et caractéristique du GBM. Le choix des cultures primaires donne donc accès à un modèle *in vitro* plus pertinent et plus représentatif de la physiopathologie du GBM.

Ce projet se scinde en quatres parties avec dans un premier temps la caractérisation phénotypique, métabolique et transcriptomique de cultures primaires de GBM, associées au développement de modèles murins, porteurs de xénogreffes orthotopiques humaines de GBM, et représentatifs des profils tumoraux observés chez les patients. Dans un second temps, la capacité des cellules T V γ 9V δ 2 à survivre et à patrouiller dans le parenchyme cérébral a été analysée chez la souris, puis la faisabilité préclinique d'une immunothérapie associant le transfert adoptif de LT V γ 9V δ 2 au zolédronate a été évaluée à la fois *in vitro* et *in vivo*. Faisant suite aux résultats obtenus et dans le but de s'affranchir de l'utilisation du zolédronate, un large panel de populations lymphocytaires T V γ 9V δ 2 issues de donneurs sains a été, dans un troisième temps, généré afin d'analyser leur réactivité naturelle vis-à-vis de cultures primaires de GBM. La potentialisation de cette lyse spontanée des cellules cibles par un prétraitement à l'IL-21 a également été étudiée. Enfin, la quatrième et dernière partie de ce travail porte sur l'identification des voies moléculaires impliquées dans la réactivité naturelle des cellules T V γ 9V δ 2 allogéniques contre les cellules de GBM.

A noter que les méthodes utilisées pour les résultats non publiés sont présentées à la fin des résultats, dans la section « *experimental procedure for unpublished data* » (p.135).

Résultats
<u>Partie 1</u> : Caractérisation des cultures primaires de GBM et développement de modèles murins

A. Article 1 : « *Efficient mitochondrial glutamine targeting prevails over glioblastoma metabolic plasticity* » - publié : Clinical Cancer Research 2017

Kristell Oizel[§], <u>Cynthia Chauvin[§]</u>, Lisa Oliver, Catherine Gratas, Fanny Geraldo, Ulrich Jarry, Emmanuel Scotet, Marion Rabe, Marie-Clotilde Alves-Guerra, Raluca Teusan, Fabien Gautier, Delphine Loussouarn, Vincent Compan, Jean-Claude Martinou, François M. Vallette & Claire Pecqueur

§ These authors contributed equally to the work

Dans cet article, les cultures primaires de GBM qui dérivent des tumeurs de divers patients, ont été caractérisées dans le but de les classer en différents sous-types de GBM. Sur la base de la plasticité cellulaire et de l'utilisation de la glutamine (GLN), associées aux profils transcriptomiques, deux grands groupes ont été identifiés : (i) les cultures primaires dites « GLN^{high} » présentent un métabolisme oxydatif dans lequel la glutamine est primordiale, associé à une signature moléculaire mésenchymateuse (MES), tandis que (ii) les « GLN^{low} » exhibent un métabolisme fortement glycolytique avec des profils moléculaires classiques, prolifératifs et proneuraux (CNP). Ce travail fait figure de preuve de concept pour l'application théranostique (contraction de « thérapie » et « diagnostic ») du ciblage métabolique dans le cas du GBM, et sera poursuivi par des études associant les traitemnts conventionnels aux inhibiteurs métaboliques. A terme, ces travaux pourraient conduire au choix et au développement de thérapies personnalisées, adaptées à chaque patient.

Efficient Mitochondrial Glutamine Targeting Prevails Over Glioblastoma Metabolic Plasticity S

Kristell Oizel¹, Cynthia Chauvin^{1,12}, Lisa Oliver^{1,2,11,12}, Catherine Gratas^{1,2,11}, Fanny Geraldo¹, Ulrich Jarry^{1,12}, Emmanuel Scotet^{1,12}, Marion Rabe¹, Marie-Clotilde Alves-Guerra^{3,4,5}, Raluca Teusan⁶, Fabien Gautier^{1,7}, Delphine Loussouarn^{1,2}, Vincent Compan^{8,9}, Jean-Claude Martinou¹⁰, François M. Vallette^{1,7,11,12}, and Claire Pecqueur^{1,11,12}

Clinical Cancer Research

NC.



Abstract

Purpose: Glioblastoma (GBM) is the most common and malignant form of primary human brain tumor in adults, with an average survival at diagnosis of 18 months. Metabolism is a new attractive therapeutic target in cancer; however, little is known about metabolic heterogeneity and plasticity within GBM tumors. We therefore aimed to investigate metabolic phenotyping of primary cultures in the context of molecular tumor heterogeneity to provide a proof of concept for personalized metabolic targeting of GBM.

Experimental Design: We have analyzed extensively several primary GBM cultures using transcriptomics, metabolic phenotyping assays, and mitochondrial respirometry.

Results: We found that metabolic phenotyping clearly identifies 2 clusters, GLN^{High} and GLN^{Low} , mainly based

Introduction

Glioblastoma (GBM), the highest grade of gliomas, is the most common and malignant form of primary human brain tumors in adults with an average survival at diagnosis of about 18 months (1). The current standard of care for patients includes tumor resection followed by radiotherapy with concomitant and adjuvant chemotherapy with temozolomide (TMZ; ref. 1). In

Note: Supplementary data for this article are available at Clinical Cancer Research Online (http://clincancerres.aacrjournals.org/).

K. Oizel and C. Chauvin contributed equally to the article.

Corresponding Authors: Claire Pecqueur, CRCINA, INSERM, University, de Nantes, France, 8 quai Moncousu BP 70721, 44007 Nantes, Frances. Phone: 332 0228 080325; Fax: 332 0228 080204; E-mail:

doi: 10.1158/1078-0432.CCR-16-3102

©2017 American Association for Cancer Research.

on metabolic plasticity and glutamine (GLN) utilization. Inhibition of glutamine metabolism slows the *in vitro* and *in vivo* growth of GLN^{High} GBM cultures despite metabolic adaptation to nutrient availability, in particular by increasing pyruvate shuttling into mitochondria. Furthermore, phenotypic and molecular analyses show that highly proliferative GLN^{High} cultures are CD133^{neg} and display a mesenchymal signature in contrast to CD133^{pos} GLN^{Low} GBM cells.

Conclusions: Our results show that metabolic phenotyping identified an essential metabolic pathway in a GBM cell subtype, and provide a proof of concept for theranostic metabolic targeting. *Clin Cancer Res;* 1–13. ©2017 *AACR.*

addition to their diffuse and infiltrative nature making complete resection impossible, GBM are histologically and molecularly very diverse, exhibiting strong heterogeneity between patients as well as within individual tumors, limiting the response to therapy and leading to systematic recurrence (2–4). Tumor heterogeneity is a well-recognized hallmark of solid tumors and plays a crucial role in tumor growth, metastasis, angiogenesis, and tumor resistance. Numerous publications report that the poor response of GBM to treatment as well as tumor recurrence could be mediated by the persistence of a rare population of cells similar to stem cells that have been termed "cancer stem cells" (CSC). Thus, complete recovery from GBM would involve eradication of this population.

The singular glycolytic metabolism of tumor cells, also shared by CSC (5), was recently included as one of the hallmarks of cancer cells (6) supporting the proposition that compounds altering cell metabolism could be exploited as new therapeutic approaches or synergistic improvements to actual therapies. Indeed, to fulfill the large amounts of both biomass precursors and ATP production required by tumor proliferation and invasion, tumor cells reprogram their metabolism by increasing their glycolytic and anaplerotic fluxes. This glycolytic switch, also known as the Warburg effect, drives several anabolic pathways supporting growth and proliferation of tumor cells. Furthermore, because glucose is converted to lactate at the expense of its mitochondrial oxidation, cancer cells need glutamine (GLN) to drive mitochondrial metabolism (7). Besides providing carbon for TCA-cycle anaplerosis, glutamine

www.aacrjournals.org



¹CRCINA, INSERM, Université de Nantes, France. ²Centre Hospitalier-Universitaire (CHU) de Nantes, Nantes, France. ³Inserm, U1016, Institut Cochin, Paris, France. ⁴CNRS, UMR 8104, Paris, France. ⁵Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Paris, France. ⁶Institut du thorax, INSERM, CNRS, UNIV Nantes, Nantes, France. ⁷Institut de Cancérologie de l'Ouest, René Gauducheau, St Herblain, France. ⁸Institute of Functional Genomics, Labex ICST, CNRS, UMR 5203, University of Montpellier, Montpellier, France. ⁹INSERM U1191, Montpellier, France. ¹⁰Department of Cell Biology, University Geneva, Geneva, Switzerland. ¹¹Equipe labellisée Ligue contre le Cancer. ¹²Labex IGO "Immunotherapy, Graft, Oncology."

claire.pecqueur@univ-nantes.fr; François M. Vallette, IRSUN, 8 quai moncousu, BP70721, 44007 Nantes, France. E-mail: francois.vallette@univ-nantes.fr

Translational Relevance

Glioblastoma (GBM) is one of the most common and malignant forms of primary human brain tumor in adults, with a survival of 18 months even under very aggressive treatments. The clinical characteristics and prognosis of patients with GBM are not accurately reflected by histological classification. In this work, through a combination of transcriptomic and metabolomic analyses, we show that metabolic phenotyping has identified an Achilles' heel in the more resistant GBM subtype to therapy and mirrored molecular signatures. Our study brings new insight into the potential therapeutic use of metabolic inhibitors and provides a proof of concept for theranostic metabolic targeting in the context of GBM. Stratification of future clinical trials based on these molecular and metabolic subsets should improve the development of effective therapies and uncover new predictive markers.

can also supply α -ketoglutarate to support amino acid catabolism, be a direct nitrogen donor for nucleotide biosynthesis (8), and is implicated in redox balance (9). Despite their avidity for nutrients, cancer cells often encounter conditions of nutrient scarcity *in vivo*, which usually triggers further metabolic adaptations (10–12) based on the tumor microenvironment. Interestingly, previous studies have shown that, for some tumors such as diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL), subsets can be discriminated based on metabolic fingerprints (13). In fact, the emergence of personalized molecular approaches opens the path to novel diagnosis and therapeutic options, including the use of metabolic inhibitors. Indeed, drugs targeting glutaminase 1 (GLS1) are currently being explored as therapies in breast cancer (14).

In our study, we show that primary cultures derived from patient tumors exhibit metabolic heterogeneity and plasticity. Interestingly, this metabolic hierarchism was mirrored by molecular and cellular heterogeneity and pointed out glutamine as a potential therapeutic target in a specific GBM subset.

Materials and Methods

Unless stated otherwise, all cell culture material was obtained from Life Technologies and chemicals were from Sigma-Aldrich.

Human GBM tumor cells

Primary GBM cultures were derived after mechanical dissociation from high-grade glioma operated on 14 patients. All procedures involving human participants were in accordance with the ethical standards of the ethic national research committee and with the 1964 Helsinki declaration and its later amendments or comparable ethical standards. Informed consent was obtained from all individual participants included in this study. Primary GBM cells were cultured in defined medium (DMEM/HAM-F12, 2 mmol/L L-glutamine, N2 and B27 supplement, 2 µg/mL heparin, 20 ng/mL EGF and 25 ng/mL bFGF, 100 U/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin). All the experiments with primary GBM cells were performed at early passages. The U87-MG cell line was obtained from ATCC and cultured in DMEM 5 mmol/L glucose supplemented with 10% FCS, 2 mmol/L L-glutamine and 100 U/mL penicillin, and 100 μ g/mL streptomycin. Cells were checked for *mycoplas-ma* regularly. Metabolic inhibitors, EGCG (110 μ mol/L), DON (50 μ g/mL), BPTES (10 μ mol/L), and 2-DG (5 mmol/L), were added to the culture media when required, unless stated otherwise.

Cell proliferation

Cell counts and viability were performed using the Countess optics and image automated cell counter (Life Technologies). Cells were mixed with Trypan blue (50/50) and loaded into a Countess chamber slide. The image analysis software was used to automatically analyze the acquired cell images from the sample to give cell count and viability. Data were plotted as the number of viable cells for cell proliferation or compared with proliferation in control condition for relative proliferation. Concentration of 2-DG inhibiting 50% cell proliferation (IC₅₀) was extrapolated from cell proliferation assessed 48 hours after the addition of increasing amounts of 2-DG using the alamar blue dye following the manufacturer's instructions.

Transcriptomic analysis

Samples provided as section of areas immediately adjacent to the region used for the histopathological diagnosis were mechanically dissociated, cultured in define media for less than 2 passages, and frozen. Total RNA was obtained using the RNeasy mini kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions. RNA quality was verified with the Bioanalyzer System (Agilent Technologies) using the RNA Nano Chip. RNA (1.5 µg) was processed and hybridized to the Genechip Human Genome U133 Plus 2.0 Expression array (Affymetrix), which contains over 54,000 probe sets analyzing the expression levels of over 47,000 transcripts and variants. This roughly corresponds to 29,500 distinct Unigene identifiers. The processing was done according to the recommendations of the manufacturer. The raw signals of each probes for all the arrays where normalized against a virtual median chip (median raw intensity per row) using a local weighted scattered plot smoother analysis. The data were filtered to remove probes with low intensity values by sample category in order to keep the signature of little class of sample. The hierarchical clustering used to detect groups of correlated genes, supported by a statistical method (limma) to detect differential expression among biological conditions, was computed on median-gene-centered and logtransformed data using average linkage and uncentered correlation distances with the Cluster program (15). Functional annotations of gene clusters and differential expressed genes were performed using GoMiner software (16) and the Gene Ontology database (17). Raw and normalized data have been deposited in the GEO database under accession number (GSE83626).

RT-qPCR

Quantitative real-time PCR assays were performed in triplicate using the real-time thermal cycler qTOWER (Analytic Jena) after total RNA isolation and reverse transcription. Three housekeeping genes were amplified and used to normalized with other gene transcripts. Relative transcript expression was calculated compared with the mean of all primary GBM for the corresponding gene. The list of primers used is indicated in Supplementary Table S2.

Metabolic analyses

Analysis of various substrates utilization was performed using PM-M1 and PM-M2 Biolog microplates, coated with different oxidizable carbon sources in various wells, following the manufacturer's instructions (18). Briefly, cells (30×10^3 /well) were plated on Biolog microplate for 24 hours in IFM1 media at 37°C and under 5% CO₂ allowing the cells to use up residual carbonenergy sources. Metabolic activity was then recorded spectrophotometrically for 24 hours by adding a Redox Dye Mix (Dye A). Metabolic activity value was obtained after deduction of the metabolic background obtained from negative controls (no substrate in the well). Glucose was measured in cell medium using the Roche diagnostic kit on a Cobas 8000 (Roche Diagnostics) as described previously (19). Amino acids in the culture medium were labeled using a TRAQ (ABSciex) kit and measured by LC-MS/ MS with norleucine and norvaline as internal controls. Concentrations were calculated using the software Analyst (ABSciex). Glucose, glutamine, alanine, and aspartate consumption, and production was calculated as the amount present in cell medium after 48 hours of culture minus the initial amount, and reported to 1×10^{6} cells. Metabolic dependency to glucose was assessed either by replacing glucose (17.5 mmol/L) by galactose (17.5 mmol/L) in cell media progressively over 4 weeks or with dose-response curves using 2-deoxyglucose (2-DG). IC₅₀ of 2-DG was extrapolated from the mean of 3 independent curves using PRISM6 software.

Mitochondrial oxygen consumption (OCR) and extracellular acidification rate (ECAR), reflect of glycolysis, were measured in non-buffered medium supplemented with glucose (5 mmol/L), pyruvate (1 mmol/L), and glutamine (2 mmol/L) using an XF24 Analyzer (Seahorse Bioscience). Specific mitochondrial respiration fueled with either glucose (ΔOCR_{GLC}) or glutamine (ΔOCR_{GLN}) was determined by the difference of the mean of the 3 values of OCR in the absence of substrate and the mean of the 4 values of OCR after injection of the substrate. Glucose was injected to a final concentration of 5 mmol/L and glutamine 2 mmol/L. Basal OCR was measured in non-buffered medium containing glutamine (2 mmol/L) or pyruvate (1 mmol/L) to calculate respectively ΔOCR_{GLC} and ΔOCR_{GLN} .

BRET measurement

Cells were transfected with empty vector, pWPT-MPC1-Venus, pWPT-MPC2-luciferase 8 or both (ratio 1:1) using Lipofectamine-3000 (Life Technologies) following the manufacturer's instructions. Two days after transfection, cells were plated (3×10^4 cells/ well) in white 96-well plates and BRET was recorded 24 hours later (20). For BRET measurement in the presence of EGCG, 48 hours after transfection, cells were plated at 15,000 cells/well, grown for 6 days in the presence of EGCG (110 µmol/L) and processed as before. Results were expressed as mean \pm SD.

FACS analysis and immunochemistry

Primary GBM cells were dissociated, washed, and incubated 30 minutes with the primary antibody CD133-APC. Data acquisition was performed on a FACS Calibur (Becton Dickinson) and analyzed using the FlowJo V.10 software. For immunochemistry, brains were collected from euthanized mice, fixed (PBS, 4% paraformaldehyde, PBS-PFA), embedded in paraffin wax and

serially sectioned. Paraffin-embedded brain sections were saturated with 2% BSA (Sigma) and then with rabbit anti-human CD3 (Dako, Agilent Technologies) or rabbit anti-human anti-MHC class I Ab (clone EPR1394Y; Abgent). Revelation was performed using polymer histofine anti-rabbit coupled to HRP (Microm Microtech France) and the DAB detection system (Leica), and slides were scanned using nanoZoomer 2.0 HT (Hamamatsu Photonics K.K., Hamamatsu, Japan).

Orthotopic injections of human primary cells in NSG mice

NSG (*NOD.Cg-Prkdcscid Il2rgtm1Wjl/SzJ*) mice (Charles River Laboratories) were bred in the animal facility of the University of Nantes (UTE, SFR F. Bonamy) under SPF status and used at age 6 to 12 weeks, according to institutional guidelines (Agreement # 00186.02; Regional ethics committee of the Pays de la Loire, France). Orthotopic injections of human GBM cells (10^4 in 2 µL PBS), pretreated or not with EGCG, were performed using a stereotactic frame (Stoelting) at 2 mm on the right of the medial suture and 0.5 mm in front of the bregma, depth: 2.5 mm. Animals were observed daily and euthanized when characteristic symptoms occurred, such as reduced mobility and significant weight loss.

Isolation and enrichment of tumor cells from mouse brains

For GBM cell isolation, cells were collected from the mouse brains by using the human tumor dissociation kit (Miltenyi Biotec) followed by a discontinuous 30/70% isotonic Percoll gradient (Sigma-Aldrich) and isolated using anti-human HLA mAb (clone w6/32; BioXCell) and the "CELLectionTM Pan Mouse IgG Kit" (Life Technologies), accordingly to the manufacturer's instructions. Isolated cells were then used for *in vitro* metabolic analyses.

Statistical analysis

Data were analyzed and statistical analyses were performed using GraphPad Prism 6.00 (GraphPad Software). Data points are expressed as mean \pm SD unless otherwise indicated. *, *P* < 0.05; **, *P* < 0.01; ***, *P* < 0.001. Hierarchical clustering using metabolic phenotyping assay (data at 1245 minutes) and RT-qPCR data (Δ Ct after normalization) were realized using XLSTAT software.

Results

Metabolic phenotype microarray of primary GBM cultures

Tumor samples from 14 GBM patients, mechanically dissociated and cultured in define media, grew usually as spheres (Table 1; Supplementary Fig. S1A). These spheres were further characterized using light-sheet microscopy allowing deep light penetration and exhibited a central necrotic core, similar to that observed in high-grade tumors in patients (Supplementary Fig. S1B). The metabolic profile of 8 primary GBM cultures was next investigated using the Biolog metabolic phenotype technology. This assay measured over time the generation of the high-energy molecule NADH from various metabolic pathways, starting from unique carbon, nitrogen, or phosphate sources, allowing the subsequent reduction of a redox dye (Fig. 1A). All tested GBM cells were able to take up glucose and to convert it into NADH, through glycolysis and TCA cycle (Supplementary Fig. S2A). Whereas early kinetics differed from one GBM culture to another, NADH formation reached a

Oizel et al.

Table 1.	Primary	cultures	characteristics
----------	---------	----------	-----------------

	Tumor	Tumor IDH status	Glutamine metabolism	Molecular subtype	Mice survival
1	GBM IV	Wild-type	High	Mesenchymal	32 days
2	GBM IV	Wild-type	Low	Proliferative	n/a
3	GBM IV	Wild-type	Low	Proliferate	>6 mo
4	GBM IV	Wild-type	High	Mesenchymal	>6 mo
5	GBM IV	Wild-type	Low	Proneural	4.9 mo
6	GBM IV	Wild-type	Low	Proliferative	5.1 mo
7	GBM IV	Wild-type	Low	Proneural	n/a
8	GBM IV	Wild-type	High	Mesenchymal	n/a
10	GBM IV	Wild-type	Low	Proliferative	43 days
11	GBM IV	Wild-type	High	Mesenchymal	4.5 mo
12	GBM IV	Wild-type	High	Mesenchymal	>6 mo
13	GBM IV	Wild-type	Low	Proliferate	>6 mo
14	GBM IV	Wild-type	Low	Proliferate	>6 mo
16	GBM IV	Wild-type	Low	Proliferate	>6 mo

NOTE: Grade and IDH status determined after immunohistological studies are indicated for each tumor sample leading to a primary culture. Metabolic classification (GLN^{High} vs. GLN^{Low}) as well as molecular classification are indicated for each primary culture. Mice survival after orthotopic injection of primary cultures was recorded and indicated for all primary cultures tested.

plateau after 6 hours in all GBM cells with no significant difference between cultures. Of note, all GBM cells were able to generate NADH from a variety of hexoses, some alcohols, nucleosides, and TCA cycle intermediates (Supplementary Table S1). Interestingly, unsupervised clustering of the overall metabolic profiling resulted in a dendrogram clearly separating the samples into 2 clusters (Fig. 1B). In particular, primary GBM-4, -12, -1, -11 cultures were grouped in a cluster (called hereafter GLN^{High}) with globally a wider ability to use different metabolic sources to generate NADH. Importantly, these cells were able to take up glutamine (Fig. 1C) and convert it into NADH (Fig. 1D), in the absence of other nutrients, in contrast to the GBM cells in the second cluster (called hereafter GLN^{Low}). To strengthen these observations, 6 other primary cultures were analyzed for glutamine consumption and NADH generation (Supplementary Fig. S2B). Similarly, primary GBM-8 culture exhibited strong glutamine consumption correlated with high NADH generation whereas the other 5 primary cultures consumed little glutamine and generated less NADH. Following from these observations, we classified GBM-1, -4, -8, -11, and -12 in the GLN^{High} cluster and the other GBM cultures in the GLN^{Low} cluster (Table 1).

Distinct utilization of glutamine between the 2 clusters

Once internalized, glutamine is converted by mitochondrial glutaminase to glutamate, which is further catabolized to α-ketoglutarate to generate ATP through the production of reducing equivalents NADH and FADH2 via the TCA cycle (Fig. 2A). Glutamate is converted to α -ketoglutarate either through the glutamate dehydrogenase (GLUD) leading to ammonia generation, or through several aminotransferases, where nitrogen is transferred to generate other amino acids, in particular aspartate or alanine. In order to investigate the fate of glutamine in GBM cells, aspartate and alanine concentrations as well as expression of several glutamine transporters and enzymes involved in glutamine metabolism were analyzed. First, while there were minor differences in aspartate production among GBM cultures (Supplementary Fig. S2C), the concentration of alanine in culture media was greatly increased in GLN^{High} cells compared with GLN^{Low} cells (Fig. 2B). Furthermore, all GLN^{High} cells had a higher RNA level of the glutamine transporter SLC1A5, glutaminase (GLS), and mitochondrial and cytosolic aminotransferase (GOT1 and 2; Supplementary Fig. S3A). No difference in the expression of GPT1 nor GLUD was observed between GLN^{High} and GLN^{Low} cells (Supplementary Fig. S3A). In addition, with the exception for GBM-9, c-MYC, a master regulator of genes involved in glutamine metabolism, was similarly expressed in all GBM cultures (Supplementary Fig. S3B). To investigate further glutamine metabolism, mitochondrial respiration based on glutamine was measured using the Seahorse technology. Two different profiles of oxygen consumption (OCR) were observed after glutamine addition (Fig. 2C). GBM-1 culture (GLN^{High}) increased its mitochondrial respiration in the presence of glutamine (ΔOCR_{GLN}) while GBM-10 (GLN^{Low}) showed no difference. Interestingly, all GLN^{Low} cultures, with the exception of GBM-7 cells, did not use glutamine to sustain mitochondrial respiration, while all GLN^{High} cultures exhibited a significant increase in mitochondrial respiration after glutamine addition (Fig. 2D). Similar experiments were performed to investigate whether GLN^{Low} cells used glucose as a source for mitochondrial respiration (Fig. 2D). As expected, OCR was mainly sustained through glycolytic pyruvate in GLN^{Low} cells. Of note, the addition of ΔOCR_{GLN} and ΔOCR_{GLC} was only about 45%, clearly suggesting that other substrates fueled mitochondrial respiration besides glucose and glutamine.

Altogether, these results show that GLN^{Low} cells are characterized by a limited ability to use glutamine while GLN^{High} cells metabolize glutamine to sustain their mitochondrial respiration and to generate alanine.

GLN^{Low} GBM cultures require glucose for their proliferation

Besides analyzing the expression of enzymes involved in glutamine metabolism, the level of glucose transporters as well as glycolytic enzymes was evaluated in GBM cultures. No differences were observed in glucose transporters expression between the two groups (data not shown). Expression of both lactate dehydrogenase (LDHA) and pyruvate dehydrogenase (PDHA1), 2 enzymes involved in the conversion of glycolytic pyruvate into either cytosolic lactate or mitochondrial acetyl-CoA, respectively, was highly expressed in GLN^{Low} GBM cultures (Supplementary Fig. S3C). Furthermore, these cells also exhibited a higher RNA level of the M-isoform of pyruvate kinase (PKM), which catalyzes the last but rate-limiting step of glycolysis (Supplementary Fig. S3C). These results prompted



Figure 1.

Metabolic phenotyping of primary GBM cultures. **A**, Schematic Biolog principle. **B**, Unsupervised hierarchical clustering of primary GBM cultures using the metabolic phenotyping results. **C**, Glutamine consumption of 14 primary GBM cells over 48 hours and expressed for 1×10^6 cells. The 2 groups identified in **B** are indicated as dashed bars and black bars. **D**, NADH generation from glutamine metabolism of primary GBM cultures. Left, NADH generation over time of GBM-1 (black line) and GBM-10 (gray line) cultures (mean of triplicate). Right, NADH generation at 1,245 minutes for 8 primary GBM cultures. GLN^{High} cells are indicated as dashed bars and GLN^{Low} cells as plain bars. (n = 3; t test analysis).

a further characterization of glucose metabolism in GBM cultures. First, the addition of glucose in the metabolic phenotype assay significantly increased glutamine-dependent NADH generation in GLN^{High} cells in contrast to GLN^{Low} cells (Fig. 3A). Second, GLN^{Low} cells relied more on glycolysis compared with GLN^{High} cells as shown by the IC₅₀ of 2-deoxyglucose [2-DG; mean \pm SD: GLN^{High} 78 \pm 24 (n = 5) vs. GLN^{Low} 13 \pm 6 (n = 6)], a potent inhibitor of glycolysis (Fig. 3B). Finally, glucose dependency for proliferation of 3 GBM cultures from each group was investigated by completely replacing, in the media, glucose by galactose over 4 weeks. As expected, metabolic analysis showed that glycolysis was significantly decreased while mitochondrial respiration increased in the presence of galactose (Supplementary Fig. S4). Interestingly, GLN^{Low} cells were unable to proliferate under these conditions (Fig. 3C). In contrast, proliferation of GLN^{High} cells was not affected by the absence of glucose. Moreover, these results were confirmed in the metabolic phenotype microarray because only GLN^{High} cells were able to generate NADH directly from galactose (Supplementary Table S1).

Altogether, these results show that GLN^{Low} cells are strictly dependent to glucose while GLN^{High} cells adapt their metabolism to glucose deprivation.

EGCG inhibits cell proliferation in GLN^{High} cells

Various metabolic inhibitors of glutamine metabolism (DON, BPTES, and EGCG) were tested for their ability to inhibit cell proliferation and glutamine-sustained mitochondrial respiration. First, these compounds were tested in U87-MG cells, which recapitulated metabolic GLN^{High} cell behavior (Supplementary Fig. S5). While all inhibitors reduced cell proliferation and mitochondrial respiration in U87-MG cells, EGCG at 110 µmol/L was the most potent inhibitor of these two processes. Interestingly, this compound also significantly reduced cell proliferation in GLN^{High} cultures but had no effect on GLN^{Low} cells (Fig. 4A). Furthermore, the proliferation with EGCG was similar to that observed under glutaminedeprived conditions (Fig. 4B). All these observations led to further investigations into how EGCG altered glutamine metabolism. In all primary GLN^{High} cells, glutamine-based mitochondrial respiration was significantly reduced after a 24-hour pretreatment with EGCG (Fig. 4C). In contrast, the weak mitochondrial glutamine consumption was not affected by EGCG in GLN^{Low} cultures.

Altogether, these data suggest that EGCG inhibits cell proliferation in GLN^{High} cells through mitochondrial glutamine targeting.

EGCG induces a long-term metabolic adaptation from glutamine to glucose

To investigate the ability of GLN^{High} cells to adapt to metabolic deprivation, glucose and glutamine metabolism was investigated after 6 days of EGCG. Under these conditions, $\Delta \text{OCR}_{\text{GLN}}$ was still significantly reduced (Fig. 5A). Interestingly,



Figure 2.

Glutamine metabolism of GLN^{High} and GLN^{Low} cultures. **A**, Schematic representation of glutamine metabolism. RC, Respiratory Chain. **B**, Alanine generation of 14 primary GBM cells over 48 hours and expressed for 1×10^6 cells. GLN^{High} cells are indicated as dashed bars and GLN^{Low} cells as black bars. (n = 3; t test analysis). **C**, Oxygen consumption rate (OCR) profile of GBM-1 (GLN^{High}, black circles) and GBM-10 (GLN^{Low}, white triangles) cells (representative experiment, mean of triplicates \pm SD). **D**, Mitochondrial respiration sustained by glutamine (black) or glucose (gray) in primary GBM cells. Results are expressed as the percentage of OCR after substrate addition compared with basal OCR ($n \ge 3$; t test analysis).

cells compensate this loss of mitochondrial supply through a metabolic shift as shown by the increased in ΔOCR_{GLC} (Fig. 5B). These results suggested that cells adapted to EGCG treatment by favoring the entry of glycolytic pyruvate into mitochondria. To confirm this hypothesis, activation of the mitochondrial pyruvate carrier (MPC) was determined by BRET using the RESPYR biosensor assay (20). We first confirmed using U87-MG cells that addition of exogenous pyruvate triggered the activation of MPC (Supplementary Fig. S6A). Then the activation of MPC was analyzed in the presence of increasing amounts of pyruvate with or without a 6-days EGCG pretreatment in U87-MG cells because these cells undergo a similar mitochondrial metabolic shift after EGCG treatment (Supplementary Fig. S6B). In control U87-MG cells, increasing amounts of pyruvate triggered the activation of MPC (Fig. 5C). When cells were pretreated with EGCG, a significantly stronger BRET signal was detected in the absence or at low concentrations of exogenous pyruvate. At higher concentrations, above 5 mmol/L, EGCG did not affect MPC activation (Fig. 5C). BRET analyses were then performed on primary cells in the absence of pyruvate (Fig. 5D). As expected, EGCG pretreatment did not affect MPC activation in GBM-10 cells, which barely used glutamine to sustain their mitochondrial respiration. However, in GBM-1 cells, EGCG significantly activated MPC in the absence of pyruvate. Altogether, these results demonstrated that EGCG triggered a metabolic shift toward glycolysis in GLN^{High} cells. Actually, this glycolytic shift triggered by EGCG should increase the glucose dependency of GLN^{High} cells. Indeed, when cell proliferation was measured in the presence of increasing amounts of 2-DG, the IC₅₀ of 2-DG for GBM-1 culture was markedly reduced in the presence of EGCG (CTR 286 \pm 51 mmol/L vs. EGCG 87 \pm 17 mmol/L, *P* < 0.01), whereas EGCG did not affect glucose dependency in GBM-10 (CTR 11.8 \pm 1 vs. EGCG 12.5 \pm 1; Fig. 5E). Moreover, 2-DG IC₅₀ was decreased in all GLN^{High} cultures tested and was unaffected in all GBM^{Low} cells (Fig. 5F).

EGCG reduces cell growth of GLN^{High} cells in vivo

Because GLN^{High} cells are able to adapt their metabolism to nutrient restriction and as a wider extent to their microenvironment, the ability of EGCG to specifically reduce the cell proliferation of GLN^{High} cells was investigated in vivo. All primary GBM cultures triggered the growth of a highly invasive tumor (Fig. 6A, top; and Table 1) in NSG immune-deficient mice. Most of the primary GBM cultures tested resulted in a slow growing tumor without any clinical symptoms for more than 6 months. However, some mice exhibited clinical symptoms several weeks after injection, in particular those injected with GLN^{High} GBM-1 and GLN^{Low} GBM-10 cells, associated respectively with a median survival of 30 and 59 days (Fig. 6A). These 2 primary cultures were then treated for 6 days with EGCG prior to intracranial injection. Of note, cell viability was similar in all groups (>90%), regardless of EGCG pretreatment or not. Mice survival was significantly increased when GBM-1 cells were pretreated with EGCG prior to intracranial injection, in contrast to mice injected with GBM-10 cells where EGCG had no significant effect on survival. As these cells exhibited a strong glycolytic phenotype, similar experiments were performed with the glycolytic inhibitor 2-DG. No differences were observed in mice survival in both groups whether cells were pretreated with 2-DG prior to orthotopic injection (Fig. 6A) or when 2-DG was injected three times a week intraperitoneally in tumor-bearing

Figure 3.

Glucose dependency of $\mathsf{GLN}^{\mathsf{High}}$ and $\mathsf{GLN}^{\mathsf{Low}}$ cultures. A, NADH generation overtime from glutamine metabolism in absence (solid line) or in the presence of 0.5 mmol/L glucose (dashed line) in GLN^{High} GBM-1 (left) and GLN^{Low} GBM-10 cells (right; mean of triplicate). B, Glucose dependency of primary GBM cultures. Cell proliferation was assessed over 48 hours in the presence of increasing amounts of 2-DG. Dose-response curves of GLN^{High} GBM-1 and GLN^{Low} GBM-10 cells (left panel; mean of 3 independent experiments) and 2-DG IC_{50} of all primary GBM cells (right). ${\rm GLN}^{\rm High}$ cells are indicated as dashed bars and GLN^{Low} cells as plain bars. Mean value is indicated on top of each bar (mean \pm SD; $n \ge 3$, t test analysis). **C**, Proliferation of 3 GLN^{High} (dashed bars) and 3 $\mathrm{GLN}^{\mathrm{Low}}$ (plain bars) primary GBM cells in the absence of glucose after 4 weeks of cell adaptation to galactose. Cell proliferation was assessed over time in the presence of either glucose only (black) or galactose only (white) after 72 hours by Trypan blue exclusion (mean \pm SD; $n \geq$ 3).



Primary GBM cells

mice (data not shown). Finally, cells from control and EGCG-treated GBM-1 tumors were dissociated, enriched for tumor cells, and analyzed for their mitochondrial respiration. Interestingly, ΔOCR_{GLN} was significantly reduced in tumors arising from EGCG-pretreated cells compare with control cells, even if cells were not exposed to EGCG *in vivo* (Fig. 6B).

These results show that EGCG induced a permanent metabolic shift reducing tumor cell proliferation *in vivo*.

GLN^{High} cells are CD133^{neg} and exhibit a molecular mesenchymal signature

Finally, we investigated molecular and phenotypic differences between GLN^{High} and GLN^{Low} primary GBM cells. First, $\Delta \text{OCR}_{\text{GLN}}$ correlated with cell proliferation because all GLN^{High} cells proliferate faster than GLN^{Low} cells (Fig. 7A). Because these cultures were highly heterogeneous, the presence of CSC was further characterized using extreme limiting dilution assay (ELDA) as well as analysis of stem cell surface markers. ELDA assays showed that all primary cultures contained significant amounts of stem cells with no significant difference between the 2 culture groups (Supplementary Fig. S7A). Furthermore, no difference was observed in CD44 expression between primary cultures (Supplementary Fig. S7B). Interestingly, cells expressing the CD133 marker were easily detected in all GLN^{Low} cells but they were barely present in GLN^{High} cells (Fig. 7B). Of note, none of these primary cells exhibited an IDH1 or IDH2 mutation, or originated from an IDH-mutated tumor (Table 1). Finally, an unsupervised hierarchical transcriptomic analysis of 12 primary cultures using the most variable genes allowed a molecular discrimination between 2 groups mirroring the metabolic phenotype clustering (Fig. 7C). Gene expression profiling and subsequent combined genomic and TCGA analysis revealed that GBM can be subdivided into several main subtypes based on patient prognosis and gene expression clustering. Interestingly, hierarchical clustering using 2 different dataset probes, namely Philips (Fig. 7D) and Verhaak (Fig. 7E) molecular signatures, showed that GLN^{High} cultures correlated with the mesenchymal signature whereas all GLN^{Low} belong to one of the other GBM subtypes. To characterize the 2 primary cultures, which were not included in the transcriptomic analyses, the most discriminant genes were selected and amplified by RT-qPCR. As expected, mesenchymal GLN^{High} and GLN^{Low} cultures clustered as previously observed (Fig. 7F). Both GBM-5 and GBM-6 exhibited a non-

www.aacrjournals.org

Oizel et al.



Figure 4.

EGCG slows down GLN^{High} cell proliferation and inhibits ΔOCR_{GLN} . **A**, Inhibition of proliferation in GLN^{High} cells after addition of inhibitors of glutamine metabolism. Cell proliferation was assessed by cell counting using trypan blue exclusion in primary GBM cells in the presence of 110 µmol/L EGCG after 72 hours (mean \pm SD; $n \geq 3$; two-sided ANOVA). **B**, Proliferation of primary cultures in the presence or absence of glutamine. Primary GLN^{High} cells are indicated as dashed bars and GLN^{Low} cells as plain bars (mean \pm SD; $n \geq 3$; two-sided ANOVA). **C**, Inhibition of mitochondrial respiration fueled with glutamine (ΔOCR_{GLN}) in primary cells. ΔOCR_{GLN} was measured in cells 24 hours after the addition of 110 µmol/L EGCG in GLN^{High} and GLN^{low} primary cells (mean \pm SD; $n \geq 3$; multiple *t* test respectively).

mesenchymal signature, which was in agreement with our metabolic and phenotypic characteristics. Altogether, these results show that metabolic phenotyping closely mirrors molecular classification.

Discussion

Tumors often wire their metabolism to supply metabolic intermediates for new biomass synthesis, energy generation as well as reducing equivalent formation (21). One of the first metabolic alterations observed in tumors is an elevated glycolysis, even in presence of a sufficient oxygen supply, known as the Warburg effect. Recently, the importance of mitochondria and the utilization of alternative oxidizable substrates such as glutamine in tumor cell survival and proliferation have been clearly demonstrated (13, 22). In our study, using transcriptomics, metabolic phenotype assay and mitochondrial respirometry, we show clear metabolic distinctions between 2 clusters of primary GBM cultures. Our data show that glutamine needs and uses differ significantly between the mesenchymal GLN^{High} group, which have a huge glutamine uptake, and a second group with low GLN consumption (GLN^{Low}). Furthermore, in GLN^{High} cells, glutamine-derived glutamate is converted into α -ketoglutarate to generate ATP through the production of reducing equivalents (NADH, FADH2) and mitochondrial respiration, and to generate alanine, in contrast to GLN^{Low} cells. This metabolic difference, independent of *c-myc*, can be explained by a higher expression of several mRNA involved in glutamine metabolism such as the glutamine transporter SLC1A5, glutaminase (GLS), and glutamine aminotransferase (GOT). First, these results challenge the notion that glutamine dependency of cells in vitro relies mostly on the glutamine

OF8 Clin Cancer Res; 2017

Clinical Cancer Research



Figure 5.

Metabolic shift after glutamine metabolism inhibition in GLN^{High} cells. **A**, Mitochondrial respiration sustained with glutamine (ΔOCR_{GLN}) after 6 days of EGCG treatment in GBM-1 cells in the absence (black) or presence (gray) of EGCG (110 µmol/L; mean ± SD; n = 3; t test). **B**, Mitochondrial respiration sustained with glucose (ΔOCR_{GLC}) after 6 days of EGCG treatment in GBM-1 cells in the absence (black) or presence (gray) of EGCG (110 µmol/L; mean ± SD; n = 3; t test). **B**, Mitochondrial respiration sustained with glucose (ΔOCR_{GLC}) after 6 days of EGCG treatment in GBM-1 cells in the absence (black) or presence (gray) of EGCG (110 µmol/L; mean ± SD; n = 3; t test). **C**, MPC activity in transfected U87-MG cells with increasing amounts of pyruvate. Cells were transfected with MPC1 + MPC2, grown for 7 days in the presence or absence of EGCG (110 µmol/L) and then BRET was recorded 2 minutes after pyruvate addition (mean ± SD; n = 3, two-sided ANOVA). **D**, MPC activity in primary GBM-1 and GBM-10 cells in the absence of pyruvate. Primary cells were transfected with MPC1 + MPC2, grown for 7 days in the presence or absence of 110 µmol/L EGCG (**E**) and then BRET was recorded (mean ± SC); n = 3). **E**, Glucose dependency of GBM-1 and GBM-10 cultures. Cell proliferation was assessed using Alamar Blue dye after EGCG treatment (110 µmol/L) for 6 days in the presence of increasing amounts of 2-DG. Results are presented as relative proliferation compared with cells grown in the absence of 2-DG. Each point corresponds to the mean of several experiments ($n \ge 3$; two-sided ANOVA). **F**, Glucose dependency of GLN^{High} and GLN^{Low} cultures. Cell proliferation was assessed as in **E** and 2-DG (C₅₀ was extrapolated. Results are presented as relative proliferation compared with control cells grown in the absence of EGCG. Each point corresponds to the mean of 3 experiments (two-sided ANOVA).

concentration in culture media as previously suggested (23). Indeed, glutamine deprivation does not affect proliferation of GLN^{Low} cells even if these cells do use glutamine in vitro. Second, our study provides a clear example of tumor heterogeneity in fuel utilization pathways between tumors. Our results are not contradictory with the study by Marin-Valencia and colleagues showing mitochondrial oxidation of glucose rather than glutamine by GBM cells in an orthotopic mice model. Indeed, in their study, they cannot exclude the lack of mesenchymal tumor within the 3 tumors tested because this molecular subtype represents only 30% of the GBM (2, 3, 24). Thus, only a restrictive number of tumors might exhibit an oxidative metabolism supported by glutamine. Finally, our data also validate the use of a fluoro-analogue of glutamine (25) for clinical PET imaging, rather than or in complement to the ¹⁸fluoro-2-deoxyglucose (18F-FDG), which capitalizes on enhanced glucose uptake in tumors but is ineffective in evaluating gliomas due to its high background uptake in the brain.

In our study, we showed that GLN^{High} GBM cells are able to generate NADH from a wide variety of oxidizable substrates and

as such display a strong metabolic ability to adapt to their microenvironment. These results are in agreement with a recent publication by Jung and colleagues showing that nicotinamide N-methyltransferase (NNMT), involved in NAD utilization and DNA hypomethylation, was consistently upregulated in mesenchymal GBM stem cells (26). In particular, in our study, inhibition of the mitochondrial glutamine supply increases channeling of glycolytic pyruvate into mitochondria. In contrast, GLN^{Low} cells exhibit a strong dependency on glucose associated with a poor survival in the absence of glucose. Metabolic adaptation is especially relevant in solid tumors where metabolic reprogramming is a key determinant allowing cancer cells, including CSC, to survive drastic changes in the tumor microenvironment such as hypoxia, nutrient storage, and acidic pH. In particular, this singular feature of mesenchymal GLN^{High} GBM cells may allow survival in a nutrient-restricted microenvironment as well as a metabolic coupling between tumor cells within a well-oxygenated microenvironment or hypoxic tumor cells. Furthermore, metabolic cross-talk is not restricted to interactions between cancer cells but also extends to a bidirectional metabolic symbiosis



Figure 6.

Glutamine inhibition retards tumor growth *in vivo* in an orthotopic murine model. **A**, Immunohistochemistry of mouse brain injected with control cells using a human-MHC class I antibody (top) and survival curves of mice after orthotopic injection of GLN^{High} (GBM-1, n = 10, left) and GLN^{Low} (GBM-10, n = 5, right) cultures *in vivo* (bottom). Cells were treated with EGCG (110 µmol/L) for 6 days or 2-DG (5 mmol/L) for 48 hours prior to injection in mouse brain (i.c.). Statistical analyses were performed with the log-rank test compared with control (**, P < 0.01). **B**, Mitochondrial respiration sustained with glutamine (Δ OCR_{GLN}) was recorded after injection of glutamine in isolated tumor cells from GBM1-tumor bearing mice. On the day of sacrifice, tumors from mice injected with control or EGCG-pretreated cells were isolated, enriched and Δ OCR_{GLN} was recorded using the Seahorse technology (n = 2 in triplicate; *t* test, * P < 0.05).

between cancer and stromal cells (27, 28). In fact, Tardito and colleagues recently showed that glutamine required for GBM growth is not supplied by the circulation but rather by astrocytes (8). In this context, alanine, which is highly generated by GLN^{High} cells, could also be used as a carbon source in the TCA cycle following its conversion to pyruvate by other GLN^{High} tumor cells or cells in the microenvironment. This cooperative metabolism coupled to an extensive metabolic plasticity occurring between tumor and stromal cells could be particularly relevant for mesenchymal GLN^{High} GBM cells under nutrient limited conditions and may explain, in part, their very strong aggressiveness.

GBM is an archetype example of a heterogeneous cancer (29) likely underlying the inability of conventional and targeted therapies to achieve long-term remission (30-33). Singlecell RNA sequencing shows that GBM tumors consist of heterogeneous mixtures with individual cells corresponding to different GBM subtypes and this tumor heterogeneity influences clinical outcome (34). Furthermore, these tumors contain CSC adapted to hypoxia and highly resistant to cell death. To overcome the lack of treatment options for GBM, The Cancer Genome Atlas (TCGA) established a comprehensive molecular classification leading to the characterization of four main subtypes, namely, the mesenchymal, classic, neural, and proneural subtypes, based on patient prognosis and distinct genetic, epigenetic and transcriptional alterations (3, 35). Recently, we and others have shown that molecular subtypes of GBM are associated with patient outcome and response to therapy (3, 36). For example, MGMT methylation status is pretty accurate to predict response to temozolomide in the classical subtype but bears little sensitivity in the mesenchymal and proneural subtypes. In our study, we show that the metabolic phenotyping as well as the differential glutamine utilization mirror the molecular classification established by Philips and colleagues and Verhaak and colleagues (2, 3, 37). Furthermore, we show that the pleiotropic metabolic inhibitor EGCG, targeting glutamine metabolism, specifically reduces tumor proliferation, in vitro and in vivo, of mesenchymal GLN^{High} cells. Surprisingly, the glycolytic inhibitor 2-DG does not improve survival of mice bearing highly glycolytic GLN^{Low} tumors or GLN^{High} cells that shifted their metabolism toward glycolysis after EGCG treatment (data not shown). The absence of in vivo effectiveness of 2-DG might be explained by the presence of its natural counterpart glucose, reducing only partially the availability of glucose to tumor cells. In fact, previous publications have shown that whereas 2-DG exhibited cytotoxic effects in cancer cells, administration of 2-DG alone did not lead to significant anticancer activity in vivo (38, 39). Thus, metabolic targeting of glutamine metabolism seems a potential pertinent therapeutic strategy, in contrast to glycolysis targeting. These results have several significant fallouts. First, they highlight the complexity of metabolic targeting of tumor cells as both the choice of the metabolic inhibitor and the targeted metabolic pathway are crucial to improve survival outcome. Second, the efficient metabolic inhibition of tumor growth triggered by the mesenchymal $\mathrm{GLN}^{\mathrm{High}}$ cells is of particular interest because it has been shown that this subtype is the most resistant to therapy (3, 36). Furthermore, a recent study has shown that radiation promotes a molecular shift from the proneural to the mesenchymal subtype (40). In this

Clinical Cancer Research



Figure 7.

Phenotypic and molecular features of GLN^{High} cultures. **A**, Correlation between ΔOCR_{GLN} and proliferation of primary GBM cultures. Proliferation was assessed by cell counting using trypan blue exclusion and recorded over 7 days. ΔOCR_{GLN} was calculated as in **2D**. GLN^{High} cultures are indicated in red. **B**, Expression of CD133 assessed by FACS analysis in primary GBM cells. Representative histograms of CD133 expression in GBM-1 (GLN^{High}) and GBM-10 (GLN^{Low}) cultures (left) and dot plot of CD133 expression in GLN^{High} and GLN^{High} cultures are indicated of CD133 expression in GLN^{High} and GLN^{Low} cultures. Each dot represents one primary culture ($n = 5 GLN^{High}$ cultures and $n = 7 GLN^{Low}$ cultures; mean of 3 experiments; t test, ** P < 0.01). **C-E**, Unsupervised hierarchical clustering of 12 primary cultures using transcriptomic analysis using the top 2,000 most variable genes in **C**, the Philips data set probes in **D** and the Verhaak dataset probes in **E**. **F**, Clustering of the 14 primary GBM cultures by RT-qPCR using a subset of genes included among the most discriminant genes. In all heatmaps, low, medium, and high expressions are represented respectively as green, black, and red colors, respectively.

context, it would be interesting to evaluate whereas a metabolic shift occurs with the development of therapeutic resistance, in particular in the proneural GBM subtype. Finally, in the context where the coexistence of genetically divergent tumor subtypes within a tumor has been recently demonstrated (29), a recent study has shown that enrichment in mesenchymal subtype cells within brain tumor was associated with a significantly worse outcome (34). Thus, a therapeutic strategy targeting the most aggressive tumor cells, namely the mesenchymal GLN^{High} cells, should reduce global tumor progression and be advantageous for the patient. Altogether, our results reinforce subtype identification as a fundamental basis for GBM classification and provide a proof of concept of theranostic metabolic targeting opening potential clinical application for a personalized medicine.

In conclusion, the diversity of carbon substrate utilization pathways in tumors is indicative of metabolic heterogeneity that is not only relevant across different cancer types but also within a group of tumors that otherwise share the same diagnosis. Furthermore, our findings provide a functional validation of metabolic targeting associated with molecular signature, prevailing the metabolic plasticity of tumor cells. Thus, further metabolic studies may provide a unique opportunity to evaluate synergistic improvements of actual therapies or designed personalized therapies in GBM, but also in other tumor types.

Disclosure of Potential Conflicts of Interest

No potential conflicts of interest were disclosed.

www.aacrjournals.org

Authors' Contributions

Conception and design: F.M. Vallette, C. Pecqueur

Development of methodology: C. Chauvin, E. Scotet, V. Compan, C. Pecqueur

Acquisition of data (provided animals, acquired and managed patients, provided facilities, etc.): K. Oizel, C. Chauvin, C. Gratas, F. Geraldo, U. Jarry, E. Scotet, M. Rabe, F. Gautier, D. Loussouarn, C. Pecqueur

Analysis and interpretation of data (e.g., statistical analysis, biostatistics, computational analysis): K. Oizel, C. Chauvin, L. Oliver, C. Gratas, M. Rabe, R. Teusan, F. Gautier, J.-C. Martinou, F.M. Vallette, C. Pecqueur

Writing, review, and/or revision of the manuscript: K. Oizel, C. Chauvin, L. Oliver, C. Gratas, M. Rabe, M.-C. Alves-Guerra, V. Compan, F.M. Vallette, C. Pecqueur

Administrative, technical, or material support (i.e., reporting or organizing data, constructing databases): L. Oliver, F. Geraldo, F.M. Vallette, C. Pecqueur

Study supervision: F.M. Vallette, C. Pecqueur

References

- 1. Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJB, et al. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. N Engl J Med 2005;352:987–96.
- 2. Phillips HS, Kharbanda S, Chen R, Forrest WF, Soriano RH, Wu TD, et al. Molecular subclasses of high-grade glioma predict prognosis, delineate a pattern of disease progression, and resemble stages in neurogenesis. Cancer Cell 2006;9:157–73.
- 3. Verhaak RGW, Hoadley KA, Purdom E, Wang V, Qi Y, Wilkerson MD, et al. Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. Cancer Cell 2010;17:98–110.
- Brennan CW, Verhaak RGW, McKenna A, Campos B, Noushmehr H, Salama SR, et al. The somatic genomic landscape of glioblastoma. Cell 2013;155:462–77.
- Morfouace M, Lalier L, Bahut M, Bonnamain V, Naveilhan P, Guette C, et al. Comparison of spheroids formed by rat glioma stem cells and neural stem cells reveals differences in glucose metabolism and promising therapeutic applications. J Biol Chem 2012;287:33664–74.
- Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. Cell 2011;144:646–74.
- Hensley CT, Faubert B, Yuan Q, Lev-Cohain N, Jin E, Kim J, et al. Metabolic Heterogeneity in Human Lung Tumors. Cell 2016;164:681–94.
- Tardito S, Oudin A, Ahmed SU, Fack F, Keunen O, Zheng L, et al. Glutamine synthetase activity fuels nucleotide biosynthesis and supports growth of glutamine-restricted glioblastoma. Nat Cell Biol 2015; 17:1556–68.
- Lyssiotis CA, Son J, Cantley LC, Kimmelman AC. Pancreatic cancers rely on a novel glutamine metabolism pathway to maintain redox balance. Cell Cycle 2013;12:1987–8.
- Marin-Valencia I, Yang C, Mashimo T, Cho S, Baek H, Yang X-L, et al. Analysis of tumor metabolism reveals mitochondrial glucose oxidation in genetically diverse human glioblastomas in the mouse brain in vivo. Cell Metab 2012;15:827–37.
- 11. Palm W, Park Y, Wright K, Pavlova NN, Tuveson DA, Thompson CB. The utilization of extracellular proteins as nutrients is suppressed by mTORC1. Cell 2015;162:259–70.
- Porporato PE, Payen VL, Pérez-Escuredo J, De Saedeleer CJ, Danhier P, Copetti T, et al. A mitochondrial switch promotes tumor metastasis. Cell Rep 2014;8:754–66.
- Caro P, Kishan AU, Norberg E, Stanley IA, Chapuy B, Ficarro SB, et al. Metabolic signatures uncover distinct targets in molecular subsets of diffuse large B cell lymphoma. Cancer Cell 2012;22:547–60.
- Gross MI, Demo SD, Dennison JB, Chen L, Chernov-Rogan T, Goyal B, et al. Antitumor activity of the glutaminase inhibitor CB-839 in triple-negative breast cancer. Mol Cancer Ther 2014;13:890–901.
- de Hoon MJL, Imoto S, Nolan J, Miyano S. Open source clustering software. Bioinforma Oxf Engl 2004;20:1453–4.
- Zeeberg BR, Feng W, Wang G, Wang MD, Fojo AT, Sunshine M, et al. GoMiner: a resource for biological interpretation of genomic and proteomic data. Genome Biol 2003;4:R28.

Acknowledgments

We thank Myriam Robard from the Cellular and Tissular Imaging Core Facility of Nantes University (MicroPICell) for expert technical assistance in the acquisition of imaging data and the human and environmental genomic platform of Rennes. We would like to thank Benoît Vanderperre for providing MPC plasmids. We would like to thank Emeline Brocard, Christian Renaud, Marine Amouriq, and Bryan Caballero for technical help, as well as Jacques Lebreton for providing BPTES. This work was supported by grants from "Ligue contre le cancer," Region Pays de la Loire and LABEX IGO.

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked *advertisement* in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

Received December 9, 2016; revised April 24, 2017; accepted July 13, 2017; published OnlineFirst July 18, 2017.

- Ashburner M, Ball CA, Blake JA, Botstein D, Butler H, Cherry JM, et al. Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. Nat Genet 2000;25:25–9.
- Bochner BR, Siri M, Huang RH, Noble S, Lei X-H, Clemons PA, et al. Assay of the multiple energy-producing pathways of mammalian cells. PLoS One 2011;6:e18147.
- Gratas C, Séry Q, Rabé M, Oliver L, Vallette FM. Bak and Mcl-1 are essential for Temozolomide induced cell death in human glioma. Oncotarget 2014;5:2428–35.
- Compan V, Pierredon S, Vanderperre B, Krznar P, Marchiq I, Zamboni N, et al. Monitoring mitochondrial pyruvate carrier activity in real time using a BRET-based biosensor: investigation of the Warburg effect. Mol Cell 2015;59:491–501.
- Pavlova NN, Thompson CB. The emerging hallmarks of cancer metabolism. Cell Metab 2016;23:27–47.
- Rossignol R, Gilkerson R, Aggeler R, Yamagata K, Remington SJ, Capaldi RA. Energy substrate modulates mitochondrial structure and oxidative capacity in cancer cells. Cancer Res 2004;64:985–93.
- Davidson SM, Papagiannakopoulos T, Olenchock BA, Heyman JE, Keibler MA, Luengo A, et al. Environment impacts the metabolic dependencies of Ras-driven non-small cell lung cancer. Cell Metab 2016;23:517–28.
- Kim Y-W, Koul D, Kim SH, Lucio-Eterovic AK, Freire PR, Yao J, et al. Identification of prognostic gene signatures of glioblastoma: a study based on TCGA data analysis. Neuro-Oncol 2013;15:829–39.
- Venneti S, Dunphy MP, Zhang H, Pitter KL, Zanzonico P, Campos C, et al. Glutamine-based PET imaging facilitates enhanced metabolic evaluation of gliomas in vivo. Sci Transl Med 2015;7:274ra17.
- Jung J, Kim LJY, Wang X, Wu Q, Sanvoranart T, Hubert CG, et al. Nicotinamide metabolism regulates glioblastoma stem cell maintenance. JCI Insight 2017;2.
- Pavlides S, Whitaker-Menezes D, Castello-Cros R, Flomenberg N, Witkiewicz AK, Frank PG, et al. The reverse Warburg effect: aerobic glycolysis in cancer associated fibroblasts and the tumor stroma. Cell Cycle Georget Tex 2009;8:3984–4001.
- Quail DF, Joyce JA. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. Nat Med 2013;19:1423–37.
- Sottoriva A, Spiteri I, Piccirillo SGM, Touloumis A, Collins VP, Marioni JC, et al. Intratumor heterogeneity in human glioblastoma reflects cancer evolutionary dynamics. Proc Natl Acad Sci U S A 2013;110: 4009–14.
- Nathanson DA, Gini B, Mottahedeh J, Visnyei K, Koga T, Gomez G, et al. Targeted therapy resistance mediated by dynamic regulation of extrachromosomal mutant EGFR DNA. Science 2014;343:72–6.
- Gilbert MR, Dignam JJ, Armstrong TS, Wefel JS, Blumenthal DT, Vogelbaum MA, et al. A randomized trial of bevacizumab for newly diagnosed glioblastoma. N Engl J Med 2014;370:699–708.
- 32. Stommel JM, Kimmelman AC, Ying H, Nabioullin R, Ponugoti AH, Wiedemeyer R, et al. Coactivation of receptor tyrosine kinases affects the response of tumor cells to targeted therapies. Science 2007;318: 287–90.

OF12 Clin Cancer Res; 2017

Clinical Cancer Research

- Chen J, Li Y, Yu T-S, McKay RM, Burns DK, Kernie SG, et al. A restricted cell population propagates glioblastoma growth after chemotherapy. Nature 2012;488:522–6.
- Patel AP, Tirosh I, Trombetta JJ, Shalek AK, Gillespie SM, Wakimoto H, et al. Single-cell RNA-seq highlights intratumoral heterogeneity in primary glioblastoma. Science 2014;344:1396–401.
- 35. Noushmehr H, Weisenberger DJ, Diefes K, Phillips HS, Pujara K, Berman BP, et al. Identification of a CpG island methylator phenotype that defines a distinct subgroup of glioma. Cancer Cell 2010; 17:510–22.
- 36. Ducray F, de Reyniès A, Chinot O, Idbaih A, Figarella-Branger D, Colin C, et al. An ANOCEF genomic and transcriptomic microarray study of the response to radiotherapy or to alkylating first-line chemotherapy in glioblastoma patients. Mol Cancer 2010;9:234.
- 37. Verhaak RGW. Moving the needle: optimizing classification for glioma. Sci Transl Med 2016;8:350fs14.
- Maher JC, Krishan A, Lampidis TJ. Greater cell cycle inhibition and cytotoxicity induced by 2-deoxy-D-glucose in tumor cells treated under hypoxic vs. aerobic conditions. Cancer Chemother Pharmacol 2004;53: 116–22.
- 39. Maschek G, Savaraj N, Priebe W, Braunschweiger P, Hamilton K, Tidmarsh GF, et al. 2-deoxy-D-glucose increases the efficacy of adriamycin and paclitaxel in human osteosarcoma and non-small cell lung cancers in vivo. Cancer Res 2004;64:31–4.
- Halliday J, Helmy K, Pattwell SS, Pitter KL, LaPlant Q, Ozawa T, et al. In vivo radiation response of proneural glioma characterized by protective p53 transcriptional program and proneural-mesenchymal shift. Proc Natl Acad Sci U S A 2014;111:5248–53.

	Tumor	Tumor Gutamine		Molecular	Mice	
		IDH status	metabolism	subtype	survival	
1	GBM IV	wild-type	High	Mesenchymal	32 days	
2	GBM IV	wild-type	Low	Proliferative	n/a	
3	GBM IV	wild-type	Low	Proliferative	> 6 mo	
4	GBM IV	wild-type	High	Mesenchymal	> 6 mo	
5	GBM IV	wild-type	Low	Proneural	4.9 mo	
6	GBM IV	wild-type	Low	Proliferative	5.1 mo	
7	GBM IV	wild-type	Low	Proneural	n/a	
8	GBM IV	wild-type	High	Mesenchymal	n/a	
10	GBM IV	wild-type	Low	Proliferative	43 days	
11	GBM IV	wild-type	High	Mesenchymal	4.5 mo	
12	GBM IV	wild-type	High	Mesenchymal	>6 mo	
13	GBM IV	wild-type	Low	Proliferative	>6 mo	
14	GBM IV	wild-type	Low	Proliferative	>6 mo	
16	GBM IV	wild-type	Low	Proliferative	>6 mo	

Table 1 Primary cultures characteristics

Grade and IDH status determined after immunohistological studies are indicated for each tumor sample leading to a primary culture. Metabolic classification (GLNHigh vs GLNLow) as well as molecular classification are indicated for each primary culture. Mice survival after orthotopic injection of primary cultures was recorded and indicated for all primary cultures tested.

	GBM-3	GBM-5	GBM-10	GBM-6	GBM-11	GBM-1	GBM-4	GBM-12
aCyclodextrin	-266	-167	-141	-208	-249	-171	-180	-200
Dextrin	19	27	27	34	98	17	25	47
Glycogen	-288	-176	-142	-233	-326	-174	-183	-228
D-Turanose	-251	-187	-112	-182	-337	-284	-345	-322
Pectin	19	71	30	-39	265	226	295	262
L-Rhamnose	4	29	74	32	165	162	213	180
L-Fucose	-259	-198	-111	-212	-363	-338	-393	-364
D-Fucose	4	37	78	-3	113	173	237	174
D-Glucosaminic Acid	-71	-94	-88	-105	-11	-49	-54	-38
D-Glucuronic Acid	-184	-46	2	-57	-210	-87	-65	-121
Melibionic Acid	33	67	86	-42	174	211	291	225
N-Acetyl Neuraminic Acid	-289	-141	-162	-169	-524	-392	-458	-458
Citric Acid	-195	-97	-43	-17	-327	-284	-297	-303
Tricarballytic Acid	-101	40	21	-207	54	119	136	103
D,L Lactic acid	-112	-176	-123	30	-229	-266	-279	-258
Methyl D-Lactate	-149	22	0	-244	-23	98	115	63
Pyruvic Acid	-81	14	2	-243	117	129	125	124
a-ketoglutaric acid	-163	-69	-30	40	-330	-304	-302	-312
Succinamic Acid	-71	11	0	-233	176	139	149	155
Succinic Acid	-196	-174	-128	18	-417	-318	-324	-353
L-Malic Acid	-241	-183	-129	33	-463	-331	-350	-381
D-Malic Acid	-45	24	1	-246	190	165	174	176
Meso-Tartaric Acid	-243	-178	-118	21	-466	-326	-340	-377
AcetoAcetic Acid	-16	31	6	-218	191	159	173	174
Propionic Acid	-334	-175	-120	19	-476	-323	-333	-377
Acetic Acid	73	21	0	-221	213	152	169	178
Hexanoic acid	-329	-168	-107	35	-478	-315	-329	-374
gAminoN-Butyric Acid	-272	-179	-130	8	-450	-327	-338	-372
aKeto Butyric Acid	-34	39	5	-214	222	157	174	184
a-HydroxyButyric Acid	-272	-187	-125	4	-446	-337	-350	-378
D, L b HydroxyButyric Acid	18	35	-1	-199	217	165	179	187
g-Hydroxybutyric Acid	-282	-192	-130	0	-470	-336	-347	-384
Butyric Acid	45	40	-3	-244	193	151	168	170
Thymidine	7	71	78	-56	273	222	286	260
Uridine	-211	-124	-127	-135	-419	-358	-424	-400
Adenosine	9	102	84	-42	248	282	340	290
Inosine	-203	-215	-235	-130	-420	-396	-449	-422
Maltitol	18	9	18	40	89	10	9	36
Maltotriose	-289	-262	-242	-235	-299	-172	-179	-217
D-Maltose	44	11	21	58	107	18	16	47
D-Trehalose	-300	-262	-229	-236	-338	-174	-182	-231
D-Cellobiose	46	7	3	50	93	20	22	45
b-Gentobiose	-306	-246	-220	-209	-320	-160	-171	-217
D-Glucose 6 Phosphate	56	-1	19	19	130	54	94	93
aD-Glucose 1 Phosphate	-317	-226	-234	-191	-336	-181	-219	-245
L-Glucose	61	-29	4	-11	109	16	44	56
aD-Glucose	182	187	231	141	183	167	164	205
3-O-Methyl D Glucose	-12	-106	-82	-114	-6	-53	-61	-40
a-Methyl-D-Glucoside	-244	-68	-56	-95	-242	-124	-121	-162
b-Methyl-D-Glucoside	-32	-105	-82	-111	-17	-49	-57	-41
D-Salicin	-102	-58	-37	-89	-234	-123	-117	-158
D-Sorbitol	-53	-111	-99	-105	-19	-50	-64	-44
N-Acetyl-D Glucosamine	-103	-59	-30	-87	-222	-113	-112	-149
Mannan	-213	-47	-8	-52	-212	-88	-58	-119
D-Mannose	27	-48	-17	-47	101	13	29	47
a-Methyl-D-Mannoside	-274	-122	-111	-149	-331	-178	-194	-234
D-Mannitol	6	-49	-30	-66	78	5	22	35
N-Acetyl-bD-Mannosamine	-267	-126	-101	-158	-329	-181	-200	-237
D-Melezitose	5	-55	-44	-67	61	-2	13	24

Sucrose	-264	-115	-88	-159	-337	-182	-196	-238
Palatinose	28	34	23	100	104	140	190	144
D-Tagatose	20	87	30	56	171	220	309	233
L-Sorbose	-264	-190	-208	-233	-406	-335	-390	-377
D-Fructose-6 Phosphate	-242	-166	-185	-143	-312	-279	-312	-301
D-Fructose	29	57	18	-13	189	203	284	225
Stacyose	-289	-234	-261	-189	-445	-383	-459	-429
D-Raffinose	29	59	78	-33	179	208	288	225
D-Lactitol	-290	-129	-148	-180	-437	-386	-466	-429
Lactulose	28	61	79	-34	178	211	288	226
aD-Lactose	-292	-223	-247	-161	-427	-374	-452	-417
D-Melibiose	-293	-222	-148	-160	-419	-368	-439	-409
D-Galactose	-34	-20	-29	-49	260	217	288	255
a-Methyl D-Galactoside	-290	-234	-152	-162	-503	-387	-453	-448
ba-Methyl D-Galactoside	30	16	18	-39	262	209	272	248
Adonitol	-60	56	110	-67	176	237	300	238
L-Arabinbose	-201	-200	-213	-109	-409	-366	-410	-395
D-Arabinose	-60	54	96	-86	162	200	247	203
Xylitol	-47	48	97	-45	176	210	242	209
MypInositol	-216	-218	-232	-158	-424	-390	-420	-411
Meso-Erythritol	-69	47	95	-70	157	215	236	202
Methyl Pyruvate	-109	-81	-133	36	-227	-274	-285	-262
Mono-Methyl Succinate	-40	12	-1	-242	217	148	165	177
2,3-Butanediol	-325	-188	-125	24	-475	-324	-328	-376
3-Hydroxy-2-Butanone	70	30	1	-236	204	151	166	174
Propylene Glycol	-200	-117	-134	-145	-418	-394	-419	-410
D,L a Glycerol Phosphate	-162	-117	-155	-32	-321	-290	-307	-306
Glycerol	-118	-46	-20	-188	60	112	127	100
A	-5	6	1	6	-3	-3	-27	0
R	-3	2	-12	7	-4	-3	-29	-12
N	15	17	-13	21	8	-10	-18	-9
D	-7	-4	-25	-2	-5	-3	-10	-9
E	-9	-10	-8	-14	5	6	15	7
Q	9	2	8	9	56	46	82	48
G	-20	-15	-34	-12	-26	-13	48	-15
Н	-18	-6	-40	-6	-16	-15	-39	-12
S	-24	-21	-20	-21	-28	-12	-27	-20
P	-17	-17	-21	-16	-23	-15	-37	-16
1	-28	-23	-30	-20	-23	-7	-46	-25
L	-18	-11	-19	-9	-23	-12	-35	-18
K	-6	4	-24	6	-17	-8	-21	-16
M	-6	-9	-27	0	-14	-9	4	-13
0	-14	-10	-16	-7	-5	-2	3	-4
F	-12	-11	-25	-8	-12	-11	-22	0
1	-27	-26	-36	-20	-34	-16	-40	-20
W	-33	-35	-12	-40	-50	-18	-37	-54
Y	-33	-31	-26	-24	-48	-10	-48	-35
V	-22	-16	24	-15	-37	3	-38	-21
Glc	288	227	271	241	249	254	217	277

Supplementary Table 2 Metabolic phenotyping of 8 primary GBM cells

NADH generation from various substrates using PM-M1 and PM-M2 Biolog microplates. Metabolic activity was recorded at 595nm 20 hours after additionof the Redox Dye. Results are presented as the difference between NADH generation in wells with substrate minus the background (no substrate in the well).

Gene	Primers
PDK1	TGTCACCAGCCAGAATGTTCAG
	GATGAGATGGACTTCCTTTGCCT
GLS	GCTTTCCATGTTGGTCTTCCT
	ACACTGTTGCCCATCTTATCCA
LDHA	CAGTGTGCCTGTATGGAGTG
	CCTGCTTGTGAACCTCTTTCC
PDHA1	GACCATCTCATCACAGCCTACC
	CCTCCTTTCCCTTTAGCACAACC
PKM	GGTGTTTGCGTCATTCATCC
	GATTTCATCAAACCTCCGAACC
GPT	TACTCTCCAGATTGGAGATTCCA
	TCACCTCCATGTAGCCTCCT
SNCG	CCGAGAAGACCAAGGAGCAG
	CAGATGGCCTCAAGTCCTCC
ERBB3	TGAAGTACCAGACCTGCTAGAG
	AATCATCCAACACTTGACCATCAC
FGFR3	CAAATGGGAGCTGTCTCGGG
	GTCAGTGGCATCGTCTTTCAG
AKT2	CCCTTAAACAACTTVTCCGTAGCA
	CATCCACTCCTCCCTCTCGT
NKX2-2	TCGCTGACCAACACAAAGACGG
	CACAGAGCCCTCCTCATCGT
SOX-2	AAACGAGGGAAATGGGAGG
	GTGAGTGTGGATGGGATTGG
TRADD	GTTTGAGTTGCATCCTAGCCCA
	GCCGCACTTCAGATTTCGCA
MBP-1	CATGTACAAGAACTCACACCA
	CTTGAAGAAGTGGACTACGGG
Housekeeping	genes
TATA	CAAGAGTGAAGAACAGTCCAG
	ACAAGGCCTTCTAACCTTATAGG
HGPRT	GAAGGTGAAGGTCGGAGCT
	GAAGATGGTGATGGGATTTC
RPLPO	GATTACACCTTCCCACTTGCT
	TAGTCAAAGAGACCAAATCCCA

Supplementary Table 3 Primers used in RTqPCR

A

в

GBM-10

GRM



(white field x20)

GBM-1

GBM-4

Supplementary Figure 1 Morphology of primary GBM cultures

A/ Pictures of primary GBM cultures with phase-contrast microscopy of primary cultures (white field images x20). B/ Images of neurosphere using light sheet microscopy. Arrow indicates neurosphere necrotic core.



Supplementary Figure 2 Glucose phenotyping of primary GBM cultures NADH generation over time from glucose metabolism of 8 primary GBM cultures (mean of triplicate).



Supplementary Figure 3 Glutamine consumption and NADH generation

A/ Glutamine consumption of 5 primary GBM cells over 48 hours and expressed for 1.10⁶ cells. GLN^{High} and GLN^{Low} cultures are indicated as dashed bars and black bars respectively. B/ NADH generation for 5 primary GBM cultures. GLN^{High} and GLN^{Low} cultures are indicated as dashed bars and black bars respectively.



Supplementary Fig. 4 Aspartate utilization

Aspartate utilization of 14 primary GBM cells over 48 hours and expressed for 1.10⁶ cells. GLN^{High} cells are indicated as dashed bars and GLN^{Low} cells as black bars. (n=3; t-test analysis).



Supplementary Fig. 5 Expression of enzymes involved in glutamine metabolism

Expression of glutamine transporter SLC1A5, glutaminase (GLS), aspartate (GOT) and alanine aminotransferase (GPT), glutamate dehydrogenase (GLUD) in GLN^{High} and GLN^{Low} primary GBM cells by RTqPCR (mean of triplicate). All primary cultures are presented in the following order : GBM-4, 12, 8, 1, 11 for GLN^{High} and 7, 14, 10, 16, 9, 3, 5, 6, 13 for GLN^{Low} cells. Normalized results are presented as the $\Delta\Delta$ CT of primary culture compared to universal RNA. GLN^{High} cells are indicated as dashed bar and GLN^{Low} cells as black bars. Multiple t-test.



Supplementary Fig. 6 cMYC expression in primary GBM cultures

Expression of c-MYC in primary GBM cells by RT-qPCR (mean of triplicate). Normalized results are presented as the $\Delta\Delta$ CT between primary cultures and universal RNA.



Supplementary Fig. 7 Expression of enzymes involved in glucose metabolism

Expression of M- isoform of pyruvate kinase (PKM), Pyruvate Dehydrogenase (PDHA1), and Lactate Dehydrogenase (LDHA) in GLN^{High} and GLN^{Low} primary GBM cells by RT-qPCR (mean of triplicate). Normalized results are presented as the $\Delta\Delta$ CT of primary culture compared to universal RNA. All primary cultures are presented in the following order : GBM-4, 12, 8, 1, 11 for GLN^{High} and 7, 14, 10, 16, 9, 3, 5, 6, 13 for GLN^{Low} cells. GLN^{High} cells are indicated as dashed bar and GLN^{Low} cells as plain bars.



Supplementary Fig. 8 Mitochondrial respiration and glycolysis of primary GBM-1 and GBM-10 cultures in galactose

Galactose was progressively replaced with glucose over three weeks in culture media of GBM-1 and GBM-10 cultures to reach respectively a final concentration of 13mM and 4mM. OCR and ECAR were measured in presence of galactose (13mM) and glucose (4mM) in these cells. Cells cultured under control conditions (17mM glucose) are indicated in black whereas cells cultured in galactose (13mM galactose and 4mM glucose) are in white.



Supplementary Figure 9 Glutamine metabolism inhibitors in U87 cells

A/ Mitochondrial respiration sustained by glutamine (black) or glucose (grey). Results are expressed as the percent of OCR after substrate addition compared to basal OCR (n=3). B/ Cell proliferation was assessed using Alamar Blue dye in presence of EGCG (110 μ M), BPTES (10mM) or DON (10 μ M)(n=3, two-way ANOVA). C-E/ Mitochondrial respiration sustained with glutamine was measured after a 24 hours-treatment with EGCG, BPTES and DON at different doses (n=3, two-way ANOVA).





Activity of the mitochondrial carrier (MPC) was recorded with time by BRET analysis in presence of pyruvate (5 mM) in U87 cells transfected with either MPC2 alone (white circles) or MPC1+MPC2 (black circles). Results are expressed as the percent of initial BRET activity. B/ Mitochondrial respiration sustained with glutamine (left panel) or glucose (right panel) at day 6 in absence (black) or presence of EGCG in U87 cells.

p=0.002



Supplementary Figure 11 Stemness features of primary GBM cultures

В

A

A/ Stem cell enrichment determined with ELDA webtool software. Each point corresponds to one primary cultures (mean of 3 experiments). B/ Expression of CD44 assessed by FACS analysis in primary GBM cells. Representative histograms of GBM-1 and GBM-10 cultures are presented on the left. Dot plot with in GLN^{High} and GLN^{Low} cultures. Each dot represents one primary culture (mean of 3 experiments).

B. Résultats complémentaires sur les modèles murins

En plus des modèles murins obtenus avec les cultures primaires GBM-1 et GBM10 (**Article 1, Fig. 6**), d'autres cultures ont été implantées en intracrânien par stéréotaxie chez la souris NSG, conduisant au développement d'un large panel de modèles murins de tumeurs cérébrales humaines. L'ensemble des cultures primaires injectées à ce jour (n=11) a conduit à la formation d'une tumeur, dont les profils d'infiltration sont hétérogènes et souvent similaires à ceux observés chez les patients (**Figure 23**).



Figure 23 : Développement de modèles murins de tumeurs cérébrales humaines. Courbes de survies obtenues après implantation intracrânienne par stéréotaxie de 10x10³ cellules primaires de GBM chez la souris NSG (graphique à gauche). Coupes immunohistochimiques de cerveaux de souris NSG après un marquage avec un anticorps dirigé contre le CMH de classe I humain, et prélevés à 167 jours (GBM-13 et GBM-11) ou 61 jours (GBM-9) après implantation tumorale.

Il est intéressant de noter que la grande majorité des xénogreffes humaines (> 78%) mettent plus de 6 mois à se développer sans induire le moindre signe clinique chez l'animal, bien que la tumeur envahisse le parenchyme cérébral sain, allant parfois jusqu'à infiltrer l'hémisphère controlatéral. Au vu de ces résultats, notre choix s'est porté sur les cultures primaires GBM-1 (GLN^{high}, MES) et GBM-10 (GLN^{low}, CNP), qui ont ensuite été utilisées dans la majorité de nos études, en raison notamment de leur croissance tumorale rapide (médianes de survie respectivement de 30 et 59 jours) permettant d'envisager la réalisation d'études précliniques *in vivo*.

En conclusion, la caractérisation des cultures primaires nous a permis (i) de distinguer deux grands groupes de cultures primaires d'après leurs profils métaboliques et moléculaires, les MES (GLN^{high}) et les CNP (GLN^{low}); et (ii) de valider l'utilisation des cultures primaires de GBM comme modèle préclinique pertinent *in vivo*.

<u>Partie 2</u> : Faisabilité préclinique d'une immunothérapie associant le transfert adoptif de LTVγ9Vδ2 allogéniques au zolédronate pour le GBM

Article 2 : « Stereotaxic administrations of allogeneic human Vγ9Vδ2 T cells efficiently control the development of human glioblastoma brain tumors » - publié : Oncoimmunology 2016

Ulrich Jarry^{*}, <u>Cynthia Chauvin^{*}</u>, Noémie Joalland, Alexandra Léger, Sandrine Minault, Myriam Robard, Marc Bonneville, Lisa Oliver, François M. Vallette, Henri Vié, Claire Pecqueur & Emmanuel Scotet

* These authors contributed equally to the work

L'objectif de cette étude a été d'évaluer, dans le cas du GBM, la faisabilité d'un transfert adoptif de LT V γ 9V δ 2 allogéniques associés à un ABP, le zolédronate. Il a d'abord été mis en évidence la capacité des cellules T V γ 9V δ 2 humaines à survivre et à patrouiller dans le parenchyme cérébral murin durant plusieurs jours. Puis leur efficacité anti-tumorale a été évaluée à la fois *in vitro* et *in vivo* sur une lignée (U-87MG) et une culture primaire de GBM (GBM-10) humaines. Dans ces deux modèles, les LT V γ 9V δ 2 associés au zolédronate, sont capables d'éliminer spécifiquement et efficacement les cellules tumorales de GBM. Cette étude met en exergue l'éradication des tumeurs par ces lymphocytes, qu'elles soient localisées et compactes (U-87MG) ou diffuses et infiltrantes (GBM-10), signe de leur capacité à patrouiller dans le parenchyme cérébral et à éliminer les cellules cancéreuses résiduelles à distance du site tumoral d'origine.

A terme, il pourrait être envisagé chez le patient, une administration de cellules T Vγ9Vδ2 allogéniques immédiatement après la résection, via de multiples micro-injections effectuées directement dans la zone péritumorale.

ORIGINAL RESEARCH



Stereotaxic administrations of allogeneic human V γ 9V δ 2 T cells efficiently control the development of human glioblastoma brain tumors

Ulrich Jarry^{a,b,*}, Cynthia Chauvin^{a,b,*}, Noémie Joalland^{a,b}, Alexandra Léger^{a,b}, Sandrine Minault^a, Myriam Robard^c, Marc Bonneville^{a,b}, Lisa Oliver^{a,b,d}, François M. Vallette^{a,b}, Henri Vié^{a,b}, Claire Pecqueur^{a,b}, and Emmanuel Scotet^{a,b}

^aINSERM, U892, Nantes, France, Univ Nantes, Nantes, France, CNRS, UMR 6299, Nantes, France; ^bLabEx IGO, "Immunotherapy Graft Oncology", Nantes, France; ^cCellular and Tissular Imaging Core Facility of Nantes University (MicroPICell), Structure Fédérative de Recherche François Bonamy, University of Nantes, Nantes, Nantes, France; ^dHotel Dieu, Hôpital de Nantes, Nantes, F-44000, France

ABSTRACT

Glioblastoma multiforme (GBM) represents the most frequent and deadliest primary brain tumor. Aggressive treatment still fails to eliminate deep brain infiltrative and highly resistant tumor cells. Human $V_{\gamma}9V\delta2$ T cells, the major peripheral blood $\gamma\delta$ T cell subset, react against a wide array of tumor cells and represent attractive immune effector T cells for the design of antitumor therapies. This study aims at providing a preclinical rationale for immunotherapies in GBM based on stereotaxic administration of allogeneic human $V_{\gamma}9V\delta2$ T cells. The feasibility and the antitumor efficacy of stereotaxic $V_{\gamma}9V\delta2$ T cell injections have been investigated in orthotopic GBM mice model using selected heterogeneous and invasive primary human GBM cells. Allogeneic human $V_{\gamma}9V\delta2$ T cells survive and patrol for several days within the brain parenchyma following adoptive transfer and can successfully eliminate infiltrative GBM primary cells. These striking observations pave the way for optimized stereotaxic antitumor immunotherapies targeting human allogeneic $V_{\gamma}9V\delta2$ T cells in GBM patients.

Abbreviations: ADCC, antibody-dependent cellular cytotoxicity; BrHPP, bromohydrin pyrophosphate; CSCs, cancer stem cells; E:T, effector-to-target ratio; $\gamma \delta T$ cells, gamma delta T cells; GBM, glioblastoma multiforme; IPP, isopentenyl pyrophosphate; NBP, aminobisphosphonates; PAg, phosphoantigens

Introduction

GBM represents the most aggressive glioma (WHO grade IV) with a dismal prognosis (median survival of 9.4 mo and 2 y-mortality > 86%).¹ Surgery followed by radiotherapy and temozolomide-based chemotherapy represents the current standard of care for patients and modestly improves their median survival.² Moreover, rapid tumor relapse often takes place in the vicinity of the resected tumor ³ and could be attributed to a high molecular/cellular heterogeneity in GBM combined with a diffuse and deep invasion of highly radio- and chemoresistant cell subsets,^{4,5} called cancer stem cells (CSC), which share phenotypic features with normal stem cells.^{6,7}

Chemotherapies remain associated with important toxicities and their efficiency is strongly reduced due to inadequate target drug delivery. In this context, immunotherapies represent effective therapeutic options with minimal toxicities.⁸ Cellular immunotherapies have been explored ⁹ and could allow the elimination of deep brain infiltrative tumor cells. GBM-specific tumor antigens (Ag) recognized by $\alpha\beta$ T cells,¹⁰ stress-induced molecules activating $\gamma\delta$ T cells or specific surface molecules that can trigger ADCC have been identified and proposed for

© 2016 Taylor & Francis Group, LLC

ARTICLE HISTORY

Received 6 January 2016 Revised 11 March 2016 Accepted 14 March 2016

KEYWORDS

Aminobisphosphonate; human glioblastoma; immunotherapy; mice model; $V_{\gamma}9V\delta2$ T cells

effective immunotherapies in GBM.¹¹ Clinical trials have been performed by systemic or intracranial infusion of *ex vivo*-amplified T lymphocytes from either the GBM tumor, draining lymph nodes, or HLA-mismatched T cells from healthy donors, ¹² but have had limited success. Post-resection administrations of selected GBM-reactive cytotoxic T cells in the vicinity of the primary tumor could represent a unique opportunity to deliver concentrated cellular immunotherapy directly to the site of residual malignancy.

 $V\gamma 9V\delta 2$ T cell, characterized by V $\delta 2$ paired to V $\gamma 9$ chains TCR,¹³ represents about 5% of CD3⁺ cells in peripheral blood and more than 80% of the peripheral $\gamma \delta$ T cell population in healthy human.¹⁴ $V\gamma 9V\delta 2$ T cells are rapidly activated during infection and tumor contexts associated with strong functional responses (e.g., proliferation, cytotoxicity, cytokine release).¹⁵ The antigenic activation of $V\gamma 9V\delta 2$ T cells is both a speciesspecific and cell-to-cell contact-dependent process that requires the engagement of the $\gamma \delta$ TCR complex. Most $V\gamma 9V\delta 2$ T cells are specifically activated by small organic pyrophosphate molecules (phosphoantigens (PAg)) such as isopentenyl pyrophosphate (IPP), which could be produced endogenously as

CONTACT Emmanuel Scotet Semmanuel.Scotet@inserm.fr

B Supplemental data for this article can be accessed on the publisher's website.

^{*}These authors contributed equally to this work.

intermediates of the mammalian mevalonate pathway. PAg can accumulate intracellularly upon cell distress induced by transformation or infection events. Aminobisphosphonate (NBP), a pharmacologic inhibitor of the mevalonate pathway, increases IPP levels in cells with elevated pinocytotic activity and/or deregulated metabolism such as tumor cells. NBP efficiently sensitize tumor cells for $V\gamma 9V\delta 2$ T cell recognition *in vitro*, a process regulated by both adhesion (e.g., ICAM-1) and NK receptors (e.g., NKG2D) axes. Zoledronate (Zometa[®]; GMPgrade) is a third generation NBP compound used in humans for the treatment of bone disorders (e.g., metastases from solid tumors).¹⁶

The antitumor functions and the physiological roles played by human $\gamma\delta$ T cells *in vivo* have been severely hampered due to: (i) the lack of $V\gamma 9V\delta 2$ T cell counterparts in non-primate species, (ii) the lack of tumor models in non-human primates, and (iii) the strict species-specificity requirements for antigenic activation.¹⁵ Both passive and active immunotherapies targeting $\gamma \delta$ T cells in cancer patients have yielded encouraging clinical responses.¹⁷ Passive cancer immunotherapies are based on adoptive transfers of PBL-V γ 9V δ 2 T cells previously amplified using both GMP-grade agonist compounds and IL-2, while active immunotherapy aims at directly activating and expanding $V\gamma 9V\delta 2$ T cells in vivo by using administrations of GMP-grade agonist compounds and IL-2. Under these conditions, most side effects are attributed to the toxicity of IL-2, used at high doses to support the peripheral expansion of $\gamma \delta$ T cells.

Our group has recently shown that combined administration of NBP and allogeneic *ex vivo*-amplified human $V\gamma 9V\delta 2$ T cells efficiently controls the development of *sc* tumors in xenografted mice.¹⁸ Moreover, NBP-treated human glioma tumor cells are efficiently recognized by $V\gamma 9V\delta 2$ T cells ^{19,20} illustrating the practicality of using human $\gamma\delta$ T cells as an attractive tool for immunotherapies of GBM. In this study, we have investigated the feasibility and the antitumor efficacy of local allogeneic $V\gamma 9V\delta 2$ T cell immunotherapies in murine models of orthotopic human GBM tumors using commercial cell line (U-87MG) and highly infiltrative primary GBM cells (GBM-10).

Materials and methods

Expansions of human V γ **9V** δ **2 T cells**

Human PBMCs were isolated from informed consented healthy blood donors obtained from the Etablissement Français du Sang (Nantes, France). For specific expansions of V γ 9V δ 2 T cells, PBMCs were incubated with 3 μ M BrHPP (bromohydrin pyrophosphate), kindly provided by Innate Pharma (Marseille, France) in RPMI supplemented with 10% heat inactivated FCS, 2 mM L-glutamine, 10 mg/mL streptomycin, 100 IU/mL penicillin (all from Gibco, Carlbad, CA) and 100 IU/mL recombinant human IL-2 (rhIL-2) (Chiron, Emeryville, CA). 4 d cultures were supplemented with rhIL-2 (300 IU/mL). Specific amplification of V δ 2⁺ T cells was estimated by flow cytometry (resting V γ 9V δ 2 T cell lines purity > 85–95% (Fig. S1)).

Immunodeficient mice

NSG (*NOD.Cg-Prkdcscid Il2rgtm1Wjl/SzJ*) mice (Charles River Laboratories; Wilmington, MA), were bred in the animal facility of the University of Nantes (UTE, SFR F. Bonamy) under SPF status and used at 6–12 weeks of age, accordingly to institutional guidelines (Agreement # 00186.02; Regional ethics committee of the Pays de la Loire (France)).

Human GBM tumor cells

U-87MG cell line (HTB-14TM, ATCC, Manassas, VA) was cultured in DMEM low glucose (Gibco) supplemented with 10% heat inactivated FCS, 2 mM L-glutamine, 10 mg/mL streptomycin and 100 IU/mL penicillin. GBM-10 primary culture was grown in defined medium (DEF) containing DMEM/Ham-F12 (Gibco) supplemented with 2 mM L-glutamine, N2 and B27 supplements (Gibco), 2 μ g/mL heparin (Sigma-Aldrich, Louis, MO), 20 ng/mL EGF (Peprotech, Rocky Hill, NJ), 25 ng/mL bFGF (Peprotech), 10 mg/mL streptomycin and 100 IU/mL penicillin.

Stereotaxic implantation of human GBM and T cells in mouse

Human GBM cells (10^4 in 2 μ L PBS) were injected using a stereotactic frame (Stoelting,Wood Dale, IL) at 2 mm on the right of the medial suture and 0.5 mm in front of the bregma, depth: 2.5 mm. For *in vivo* sensitization assay, 0.4 or 1 μ g of zoledronate were injected into the tumor bed of 14 d tumor bearing mice. For adoptive T cell transfer assays, 2 × 10⁷ human V γ 9V δ 2 T cells were stereotaxically injected, either in 10 μ L sterile PBS or 40 μ g/mL zoledronate solution (Zometa[®]; Novartis, Basel, Switzerland), into the GBM tumor bed, 7 (1 injection) or 7 and 14 d (2 injections) after tumor implantation.

Flow cytometry

For cell surface staining, human GBM cells were incubated with 10 µg/mL of APC-labeled anti-human CD44 mAb (clone G44-26; BD Biosciences, Franklin lakes, NJ), PE-Cy5-labeled antihuman CD90 mAb (clone Thy1/310; Beckman Coulter, Fullerton, CA), PE-labeled anti-human CD133 mAb (clone AC133; Myltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, Germany), AF488-labeled antihuman SSEA1 mAb (clone MC480, BD Biosciences) or associated isotype controls. For intracellular staining, human GBM cells were permeabilized, incubated with anti-human Nestin mAb (clone 10C2, Millipore, Billerica, MA), anti-human Olig2 mAb (clone ab81093, Abcam, Cambridge, UK), anti-human Tuj polyclonal Rabbit Ab (Sigma-Aldrich), anti-human GFAP mAb (clone 52, BD Biosciences) or associated isotype controls, followed with secondary staining with AF488-labeled or AF647-labeled antibodies. Acquisition was performed using a FACSCalibur flow cytometer (BD Biosciences) and the events were analyzed using the FlowJo software (Treestar, Ashland, OR).

Limiting dilution assay (LDA)

For LDA analysis, cells were dissociated and seeded at an initial concentration of 2×10^3 cells / mL from which serial dilutions

were performed in 96-well plate. Cells were cultured for 15 d, after which the fraction of wells that did not contain neuro-spheres for each cell-plating density was calculated as described by Das and colleagues.²¹

Immunohistochemistry (IHC) analysis

Brains were fixed with 4% paraformaldehyde-PBS, embedded in paraffin wax and serially sectioned. Sections were incubated with 2% BSA and then with polyclonal Rabbit anti-human CD3 Ab (Dako, Agilent Technologies, Santa Clara, CA) or rabbit anti-human MHC class I Ab (clone EPR1394Y; Abcam). Revelation was performed by using polymer histofine rabbit to mouse coupled to HRP (Microm Microtech France, Francheville, France) and DAB detection system (Leica, Wetzlar, Germany). Slides were scanned using the NanoZoomer 2.0 HT (Hamamatsu Photonics K.K., Hamamatsu, Japan).

Isolation and staining of fresh brain cells

For human T cell detection assays, cells collected from the brains, by using the adult brain dissociation kit (Myltenyi Biotec), were labeled with PE-labeled anti-human CD3 mAb (clone UCHT1; Beckman Coulter) and analyzed by flow cytometry. For GBM cells isolations, cells were collected from the brains by using the human tumor dissociation kit (Myltenyi Biotec) followed by a discontinuous 30/70% isotonic Percoll gradient (Sigma-Aldrich)²² and isolated by using anti-human HLA mAb (clone w6/32; BioXCell, West Lebanon, NH) and the "CELLectionTM Pan Mouse IgG Kit" (Gibco), accordingly to the manufacturer's instructions. Cell purity was assessed by flow cytometry using APC-labeled mouse anti-human HLA-ABC mAb (clone G46–2.6; BD Biosciences) and routinely rated higher than 85%. Isolated cells were then used for *in vitro* functional assays.

In vitro functional assays

Cultured or mouse brain isolated human GBM cells were pretreated 16 h with zoledronate (at the indicated concentrations). For CD107a surface mobilization assays, GBM cells were cocultured 0, 24 or 72 h after zoledronate-sensitization, with $V\gamma 9V\delta 2$ T cells (E/T ratio: 1/1) in culture medium containing 5 μ M monensin (Sigma) and APC-labeled anti-human CD107a mAb (clone H4A3; BD Biosciences) for 4 h. $V\gamma 9V\delta 2$ T cells were then labeled with FITC-labeled anti-human V δ 2 TCR mAb (IMMU389; Beckman Coulter) and analyzed by flow cytometry. For cytolytic activity assays, GBM cells were incubated 1 h with 51 Cr (2,77 μ Ci / 10⁶ cells), washed and cocultured 4 h with $V\gamma 9V\delta 2$ T cells (E/T ratio: 10/1). ⁵¹Cr release activity was measured in supernatants using a MicroBeta counter (PerkinElmer, Waltham, MA). Percentage of tumor target cell lysis = (experimental release - spontaneous release)/(maximum release - spontaneous release) × 100. Maximum and spontaneous releases were determined by adding 1% Triton X-100 or medium respectively, to ⁵¹Cr-labeled tumor target cells in the absence of T cells.

Statistical analysis

Data are expressed as mean \pm SEM and were analyzed using GraphPad Prism 6.0 software (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA). *In vitro* dose-response experiments were analyzed by calculating log effective concentration 50% (logEC50) using nonlinear regression and variable slope. Student's *t* (**p* <0.05; ****p* <0.0005; ****p* < 0.0005) or log rank tests (see indicated *p* value) were used to reveal significant differences.

Results

Adoptively-transferred human PBL $V\gamma$ 9V δ 2 T cells survive and patrol within the brain

We aimed to evaluate whether $V\gamma 9V\delta 2$ T cells, amplified from PBLs of healthy donors, survived and moved within the brain parenchyma following a stereotaxic injection. Then, IHC analysis of human CD3 expression was performed on sections prepared from the brains of NSG mice previously injected with resting V γ 9V δ 2 T cells (2 × 10⁶ cells). As expected, at day 1, CD3⁺ T cells were preferentially localized in the brain tissue surrounding the injection site (Fig. 1A). Interestingly, at day 7 those cells were detected not only in the regions adjacent to the injection site (Fig. 1B, upper panel), but also in the second brain hemisphere that did not receive $\gamma\delta$ T cell injection (Fig. 1B, lower panel). Cytometry analysis, performed on cells isolated from mice stereotaxically injected with $V\gamma 9V\delta 2$ T cells (10⁷ cells), showed high frequency values of CD3⁺ T cells on day 1 $(40 \pm 8\%$ of total isolated brain cells) which progressively decreased to reach 8% at day 7 (32 \pm 3% and 8 \pm 2% on day 3 to day 7, respectively) (Fig. 1C). Moreover, CD3⁺ T cells isolated from the mouse brains could also be activated and expanded, following sorting and antigenic stimulation, indicating that T lymphocytes can survive within the brain (data not shown). Similar results were obtained using $\gamma\delta$ T cells prepared from different healthy donor samples but also using human $\alpha\beta$ T cells. These results indicate that resting human $V\gamma 9V\delta 2$ T cells, amplified from PBLs of healthy donors, can survive and patrol within mouse brain parenchyma for several days following their stereotaxic injection.

Human allogeneic $V\gamma$ 9V δ 2 T cells react against U-87MG tumor cells

Based on these physiological features and their unique intrinsic characteristics, cytotoxic $V\gamma 9V\delta 2$ T lymphocytes represent attractive effector candidates for immunotherapies against GBM, especially for the eradication of highly resistant and infiltrative brain tumor cells. The antitumoral reactivity of human allogeneic $V\gamma 9V\delta 2$ T cells against the prototypical commercially available U-87MG human glioma cell line was analyzed *in vitro* (⁵¹Cr-release assays) (Fig. 2A). As expected, no natural reactivity of allogeneic $V\gamma 9V\delta 2$ T cells against U-87MG cells was detected and zoledronate pre-treatments of U-87MG induced a significant $V\gamma 9V\delta 2$ T cells dose-dependent antigenic activation (logEC₅₀ = 0.12 μ M). Similar reactivity patterns were established by measuring CD107a expression and IFN γ production in co-culture assays (Fig. S2A and S2B). Blocking assays performed using the antagonist 103.2 mAb,²³ indicate



Figure 1. Human $V_{\gamma}9V\delta2$ T cells survive and patrol within the brain of NSG mice. NSG mice underwent intracranial injection of 2×10^6 (A–B) or $10^7 V_{\gamma}9V\delta2$ T cells (C). Human-CD3 expression was analyzed by IHC on brain sections on days 1 (A) and 7 (B), or by flow cytometry on brain cells on days 1, 3 and 7 (C). Results are expressed as % of CD3⁺ cells among total brain cells (mean \pm SEM, n = 3; ns: not significant, **p < 0.005).

that BTN3A/CD277 molecules expressed by these GBM tumor cells mainly contribute to the antigenic reactivity of human V γ 9V δ 2 T cells (Fig. S3). As expected, NK (CD3⁻CD56⁺) and $\alpha\beta$ T cells, which frequently contaminate the amplified peripheral V γ 9V δ 2 T cells preparations (~5–10%), were not activated by untreated or zoledronate treated U-87MG (*data not shown*).

To determine the duration and stability of zoledronate sensitizations, the activation of $V\gamma 9V\delta 2$ T cells was assessed at increasing time points following U-87MG zoledronate treatments. CD107a expression on V γ 9V δ 2 T cells did not vary during the first 24 h post-treatment, while a marked reduction was measured when GBM tumor cells were sensitized with 0.1, 0.5 or 1 μ M of zoledronate 72 h before co-culture (Fig. 2B). No significant modulation was detected for high doses of zoledronate (5 and 10 μ M). This indicates that the dose-dependent sensitization step, though transient, can last for several days. We further investigated whether zoledronate efficiently sensitizes human GBM cells in vivo to $V\gamma 9V\delta 2$ T cell recognition. Two weeks after brain implantation of U-87MG cells, the mice received stereotaxic injections of zoledronate (0.4 μ g vs. 1 μ g). After 24 h, tumor cells were collected and used in in vitro functional assay. Only U-87MG tumor cells isolated from zoledronate-injected mice strongly activated $V\gamma 9V\delta 2$ T cells (Fig. 2C). As a control, no effect was observed with the MHC class I-specific mAb (clone w6/32), used for human GBM cells sorting. This indicates that human allogeneic $V\gamma 9V\delta 2$ T cells can strongly react against zoledronate sensitized human GBM cells and that this reactivity can last for several days.

Adoptively-transferred allogeneic $V\gamma 9V\delta 2$ T cells eradicate U-87MG cells in vivo

We next investigated whether allogeneic human $V\gamma 9V\delta 2$ T cells react against human GBM tumor cells *in vivo*. Following orthotopic implantation of U-87MG cells, mice were treated with either one (day 7) or two cycles (days 7 and 14) of

stereotaxic injections of $\nabla\gamma 9V\delta 2$ T cells and/or zoledronate (Fig. 2D). Untreated mice died within 40 d after tumor grafting (median survival = 27 d) (Fig. 2E) with no significant delay after injection(s) of either zoledronate or $\nabla\gamma 9V\delta 2$ T cells alone. However, a single combined co-administration of zoledronate and $\nabla\gamma 9V\delta 2$ T cells already improved the survival of approximately 50% of the treated mice and most of GBM tumor-bearing mice survived after the successive co-administration of zoledronate and $\nabla\gamma 9V\delta 2$ T cells. Interestingly, no tumor cell was detected in mice brain by IHC at day 90, indicating a complete tumor rejection (*data not shown*). Then stereotaxic administration(s) of human allogeneic $\nabla\gamma 9V\delta 2$ T cells efficiently eradicates orthotopic human GBM tumors *in vivo* and also highlights the opportunity to target allogeneic specific cytotoxic human cells for immunotherapies against GBM.

Primary human GBM cells as cellular tools for the establishment of physiological orthotopic GBM mouse models

One of the main limits of in vivo models established with cell lines is their relative homogeneity associated with the establishment of a compact and poorly invasive tumor while the main clinical features of human GBM is their cellular heterogeneity associated with a very invasive character. An alternative of human GBM cell lines is to use primary cells isolated from human tumor fragments screened, selected ²⁴ and grown under defined media to maintain cellular heterogeneity. Then, primary GBM-10 cells grow as spheres and express high levels of "stemness" markers (e.g., CD133, CD90, CD44) (Fig. 3A). Furthermore, limiting dilution and cell differentiation assays, to determine the presence of CSC, showed that \sim 25% of this primary GBM cells are able to give rise to new neurospheres (Fig. 3B). Furthermore, the cells lost the expression of "stemness" markers, such as Nestin, CD133 and SSEA1 upon seruminduced differentiation (Fig. 3C), while expression of the



differentiation markers GFAP, TUJ and Olig-2 were significantly increased (Fig. 3D). Finally, stereotaxic implantation in NSG mice of GBM-10 cells led to a disseminated (some tumor cells detected in the second non-injected hemisphere) and slow-growing brain tumors (Fig. 4), as opposed to U-87MG cells that rapidly grow to form a compact well-defined tumor mass. These results indicate that heterogeneous human GBM-10 primary cells, containing a fraction of CSC, can reproduce physiological features of human GBM and represent a tool for establishing a robust orthotopic GBM model in mouse.

Adoptively-transferred allogeneic human $V\gamma 9V\delta 2$ T cells efficiently eliminate invasive GBM-10 primary tumor cells

The direct reactivity of allogeneic human $V\gamma 9V\delta 2$ T cells against primary GBM-10 tumor cells was next assessed *in vitro*. As for U-87MG cells, $V\gamma 9V\delta 2$ T cells did not naturally react against GBM-10 tumor cells, while zoledronate triggered a strong and dose-dependent antigenic activation of these effectors (Fig. 5A). Of note, higher doses of zoledronate were required to sensitize primary GBM-10 cells (logEC₅₀ = 6.20 μ M and maximal cytotoxicity at 10 μ M), as compared to U-87MG cells. Similar reactivity features were established for CD107a expression and IFN γ production (Figs. S2C, S2D and S3). Next, the ability of $V\gamma 9V\delta 2$ T cells to react against GBM-10 cells was evaluated in vivo. GBM-10 bearing-NSG mice were treated with one (day 7) or two cycles (days 7 and 14) of stereotaxic administrations of allogeneic human $V\gamma 9V\delta 2$ T cells and/or zoledronate. Untreated mice died within 60 d (median survival = 54.5 d) and no significant variation was measured after single/double stereotaxic injection(s) of either zoledronate or $V\gamma 9V\delta 2$ T cells alone (Fig. 5B). Importantly, single and also double administrations of zoledronate and $V\gamma 9V\delta 2$ T cells strongly improved the survival of mice (respectively 20 and 70%). As for U-87MG model, no



Figure 3. Primary GBM-10 cells as cellular tools for the establishment of a physiological orthotopic human GBM graft model in NSG mice. (A) U-87MG cells and GBM-10 cells were analyzed by flow cytometry for CD133, CD90 and CD44 expression. Gray histograms correspond to isotype control mAbs. (B) GBM-10 cells were seeded with an initial concentration of 2×10^3 cells/mL in 96-well plate. 15 d later the fraction of wells not containing neurospheres for each cell-plating density was calculated. (C–D) GBM-10 primary cells were cultured in DEF or in medium containing FCS and were analyzed by flow cytometry for the Nestin, CD133, SSEA1 (C), Olig2, Tuj and GFAP expression (D). Results are expressed as the median fluorescence intensity (MFI) ratio (MFI test/isotype control) (mean \pm SEM, n = 3; *p <0.05, **p <0.005, ***p <0.005). Inserts show representative histograms from one experiment of three performed.

tumor cell was detected in brain by IHC at day 200, indicating that tumor rejection seemed complete (*data not shown*). Altogether, these results indicate that stereotaxic administration(s) of allogeneic human $\nabla\gamma$ 9V δ 2 T cells *plus* zoledronate efficiently eliminate heterogeneous primary human GBM tumors characterized by "stemness" and invasive properties.

Discussion

Adoptive transfer of tumor-specific T lymphocytes represent promising approaches to efficiently cure malignant infiltrative brain tumors with limited deleterious effect on healthy cells.⁸ Using orthotopic xenograft mouse models of human GBM cells from either commercially available cell lines or primary GBM cells, our study indicates that stereotaxic administrations of allogeneic *ex vivo*-amplified human $V\gamma 9V\delta 2$ T cell effectors *plus* zoledronate efficiently eradicate brain tumors.

Our results support that cytotoxic human T cells efficiently eliminate most residual tumoral cells which have deeply infiltrated the brain parenchyma, including highly resistant GBM CSC.²⁵ CSC may be involved in tumor recurrence, due to their ability to both infiltrate brain parenchyma and to resist to aggressive chemo- and radiotherapy.²⁶ GBM-10 primary cells, isolated from a fresh biopsy and cultured in defined media maintain the cellular heterogeneity and especially the presence of CSC,²⁴ have been used for establishing new and robust human GBM xenograft mouse model. In contrary to U-87MG cell line triggering a compact and homogenous tumor mass, primary GBM-10 cells are highly infiltrative and exhibiting typical morphological features of human GBM,²⁷ representing new tools for establishing the next-generation animal models of human GBM tumors.

V γ 9V δ 2 T lymphocytes, the most frequent and conserved human peripheral $\gamma\delta$ T cell subset in adults,^{15,28} react against a wide range of tumor cell targets.¹⁵ Both active and passive $V\gamma 9V\delta 2$ T cell immunotherapies have been considered for patients with solid or circulating malignancies.¹⁷ While yielding promising results, these phase 0/I trials revealed some issues that will need to be resolved, such as the reduced reactivity of $V\gamma 9V\delta 2$ T cells against fresh tumors and their possible exhaustion in some patients. Importantly, as for some other non-conventional T cell subsets, the antigenic activation process of $V\gamma 9V\delta 2$ T cells is TCR- and contact-dependent, involving the expression of key molecules (eg., PAg and butyrophilins),²⁹ but not restricted by MHC class I/II molecules, then eliminating any risk of deleterious direct alloreactive responses toward non-transformed cells.^{30,31} Therefore, the constitution of clinical allogeneic human V γ 9V δ 2 T cell banks, established from healthy donors, could represent a unique opportunity for designing adoptive transfer antitumor immunotherapies. Administration of effector T cells could be further hampered by the particular immunological status of the central nervous



Figure 4. In vivo development of orthotopic human-GBM brain model in NSG mice. Human-MHC class I expression was analyzed by IHC on NSG mouse brain sections performed at days 5, 10, 15 and 25 after U-87MG brain implantation (left pictures) or at days 7, 14, 28 and 45 after GBM-10 implantation (right pictures).

system, notably characterized by the presence of the bloodbrain barrier (BBB) and the absence of classical lymphatic drainage system,^{32,33} then limiting T cell trafficking within the brain parenchyma and representing an additional obstacle to intravenous injections. Clinical trials of adoptive immunotherapy of GBM with human T lymphocytes were based on either intravascular or intracavitary administrations.³⁴⁻³⁶ However, the survival and activity of T cells within the cerebro-spinal fluid remains unclear as no studies have been performed to describe their behavior or their ability to move and infiltrate the brain parenchyma. Our approach is based on the direct injection of allogeneic amplified $\gamma\delta$ T cells in the parenchyma, all around the resection cavity. Such per-operative administrations are already carried out during surgery delivering local chemo- or gene-therapies to GBM patients.³⁷ Supporting this possibility, this study unambiguously shows that a significant fraction of $\nabla \gamma 9 \nabla \delta 2$ T cells survive for several days following a stereotaxic injection into the mouse brain parenchyma and subsequently deeply infiltrate brain tissue. Both *in vitro* and *in vivo* assays were carried out with dose-dependent zoledronate sensitizations of a GBM cell line and primary human GBM cells in order to trigger strong $\nabla \gamma 9 \nabla \delta 2$ T cell recognition, as already used for enhancing such reactivities in other oncological contexts.³⁸ Phase I/II trials ³⁹ have shown that zoledronate, indicated for other human pathologies (eg. osteoporosis, multiple myeloma),⁴⁰ leads to significant IL-2-dependent $\gamma \delta$ T cell expansions, correlating to partial or complete clinical responses, thus indicating the feasibility and efficacy of this



Figure 5. Adoptively-transferred allogeneic $V\gamma 9V\delta 2$ T cells efficiently eliminate invasive GBM-10 primary tumor cells (A) GBM-10 cells were pretreated overnight with different concentrations of zoledronate, loaded with ⁵¹Cr and then co-cultured 4 h with $V\gamma 9V\delta 2$ T cells (E/T ratio: 10/1). ⁵¹Cr release was measured in culture supernatants and the results are expressed as % cytotoxicity (mean \pm SEM, n = 3). (B) Survival curves of GBM-10 brain tumor-bearing NSG mice treated, or not (—; n = 10), with single injection (day 7) of zoledronate (—•••••; n = 7), $V\gamma 9V\delta 2$ T cells (—••••••; n = 7), or with double injections (days 7 and 14) of zoledronate (—•••••; n = 7), $V\gamma 9V\delta 2$ T cells (—••••••; n = 10). Statistical analysis was performed by log-rank test compared with control (see the indicated *p* value).

approach in some cancer patients. Preclinical approaches suggested that NBP-injection could be combined with $V\gamma 9V\delta 2$ T cells administration in order to induce/enhance their antitumor reactivity.¹⁸ As zoledronate does not cross the BBB,⁴¹ administrations for GBM immunotherapies required direct brain injections. As expected, stereotaxic administrations of zoledronate and $V\gamma 9V\delta 2$ T cells did not induced deleterious effects in mice.⁴² The toxicity of such effective antitumor associations cannot be ruled out in GBM patients and will need to be extensively investigated. Some studies have described that zoledronate, like some other bisphophonate molecules, might induce the depletion of macrophages ⁴³ and act on microglia,⁴⁴ the main brain myeloid-immune cells. Then, to avoid the use of zoledronate it might be interesting to select particular $V\gamma 9V\delta 2$ T cells that could naturally and specifically react more efficiently against GBM cells.

In conclusion, this study highlights the feasibility and the antitumor effect of immunotherapies based on local administrations of allogeneic human $V\gamma 9V\delta 2$ T cells using novel and

robust orthotopic human GBM *in vivo* models. Altogether, these results demonstrate that adoptive allogeneic immunotherapies could represent a promising and effective approach for the treatment of human GBM that remains one of the faster spreading and deadliest cancers.

Disclosure of potential conflicts of interest

No potential conflicts of interest were disclosed.

Acknowledgments

We thank the staff of University Hospital animal facility of Nantes for animal husbandry and care, the cellular and tissular imaging core facility of Nantes university (MicroPICell) for imaging, and the Cytometry Facility Cytocell from Nantes for their expert technical assistance. We thank also F. Cadeau and R.N. Hellman for the correction of the manuscript.

Funding

This work has been supported by INSERM, CNRS, Université de Nantes, Association pour la Recherche contre le Cancer (#R10139NN), Institut National du Cancer (#V9V2THER, INCa #PLBio2013-201, #PLBio2014-155), Agence Nationale de la Recherche (ANR, #GDSTRESS), Ligue Nationale contre le Cancer (AO InterRegional 2012). This work was realized in the context of the LabEX IGO and the IHU-Cesti programs, supported by the National Research Agency Investissements d'Avenir via the programs ANR-11-LABX-0016-01 and ANR-10-IBHU-005, respectively. The IHU-Cesti project is also supported by Nantes Metropole and the Pays de la Loire Region. The authors declare no competing financial interests. M.B. is currently vice president of the Institut Mérieux (Institut Mérieux, Lyon, F-69002, France) in charge of scientific and medical affairs.

References

- Ricard D, Idbaih A, Ducray F, Lahutte M, Hoang-Xuan K, Delattre JY. Primary brain tumours in adults. Lancet 2012; 379(9830):1984-96; PMID:22510398; http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(11)61346-9
- Stupp R, Hegi ME, Mason WP, van den Bent MJ, Taphoorn MJ, Janzer RC, Ludwin SK, Allgeier A, Fisher B, Belanger K et al. Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. Lancet Oncol 2009; 10(5):459-66; PMID:19269895; http://dx.doi.org/10.1016/ S1470-2045(09)70025-7
- Buckner JC, Brown PD, O'Neill BP, Meyer FB, Wetmore CJ, Uhm JH. Central nervous system tumors. Mayo. Clin. Proc. 2007; 82 (10):1271-86; PMID:17908533; http://dx.doi.org/10.4065/ 82.10.1271
- Bao S, Wu Q, McLendon RE, Hao Y, Shi Q, Hjelmeland AB, Dewhirst MW, Bigner DD, Rich JN. Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. Nature 2006; 444(7120):756-60; PMID:17051156; http://dx.doi.org/10.1038/ nature05236
- Singh SK, Clarke ID, Terasaki M, Bonn VE, Hawkins C, Squire J, Dirks PB. Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. Cancer Res. 2003; 63(18):5821-8; PMID:14522905
- Singh SK, Hawkins C, Clarke ID, Squire JA, Bayani J, Hide T, Henkelman RM, Cusimano MD, Dirks PB. Identification of human brain tumour initiating cells. Nature 2004; 432(7015):396-401; PMID:15549107; http://dx.doi.org/10.1038/nature03128
- Yuan X, Curtin J, Xiong Y, Liu G, Waschsmann-Hogiu S, Farkas DL, Black KL, Yu JS. Isolation of cancer stem cells from adult glioblastoma multiforme. Oncogene 2004; 23(58):9392-9400; PMID:15558011; http:// dx.doi.org/10.1038/sj.onc.1208311

- Vauleon E, Avril T, Collet B, Mosser J, Quillien V. Overview of cellular immunotherapy for 18 patients with glioblastoma. Clin. Dev. Immunol. 2010; vol. 2010, Article ID 689171, 18 pages; PMID:20953324; http://dx.doi.org/10.1155/2010/689171
- Chow KH, Gottschalk S. Cellular immunotherapy for high-grade glioma. Immunotherapy 2011; 3(3):423-34; PMID:21395383; http://dx. doi.org/10.2217/imt.10.110
- Dutoit V, Herold-Mende C, Hilf N, Schoor O, Beckhove P, Bucher J, Dorsch K, Flohr S, Fritsche J, Lewandrowski P et al. Exploiting the glioblastoma peptidome to discover novel tumour-associated antigens for immunotherapy. Brain 2012; 135(Pt 4):1042-54; PMID:22418738; http://dx.doi.org/10.1093/brain/aws042
- Gerber DE, Laterra J. Emerging monoclonal antibody therapies for malignant gliomas. Expert Opin. Investig. Drugs. 2007; 16(4):477-94; PMID:17371196; http://dx.doi.org/10.1517/13543784.16.4.477
- Chung DS, Shin HJ, Hong YK. A new hope in immunotherapy for malignant gliomas: adoptive T cell transfer therapy. J. Immunol. Res. 2014; 2014:326545; PMID:25009822; http://dx.doi.org/10.1155/2014/ 326545
- Lefranc MP, Rabbitts TH. A nomenclature to fit the organization of the human T-cell receptor gamma and delta genes. Res. Immunol. 1990; 141(7):615-8; PMID:2151348; http://dx.doi.org/10.1016/0923-2494(90)90068-A
- Silva-Santos B, Serre K, Norell H. gammadelta T cells in cancer. Nat. Rev. Immunol. 2015; 15(11):683-91; PMID:26449179; http://dx.doi. org/10.1038/nri3904
- Bonneville M, Scotet E. Human Vgamma9Vdelta2 T cells: promising new leads for immunotherapy of infections and tumors. Curr. Opin. Immunol. 2006; 18(5):539-46; PMID:16870417; http://dx.doi.org/ 10.1016/j.coi.2006.07.002
- Yeh DC, Chen DR, Chao TY, Chen SC, Wang HC, Rau KM, Feng YH, Chang YC, Lee KD, Ou-Yang F et al. EORTC QLQ-BM22 quality of life evaluation and pain outcome in patients with bone metastases from breast cancer treated with zoledronic acid. In vivo 2014; 28 (5):1001-4; PMID:25189922
- Fournie JJ, Sicard H, Poupot M, Bezombes C, Blanc A, Romagné F, Ysebaert L, Laurent G. What lessons can be learned from gammadelta T cell-based cancer immunotherapy trials? Cell. Mol. Immunol. 2013; 10(1):35-41; PMID:23241899; http://dx.doi.org/10.1038/cmi.2012.39
- Santolaria T, Robard M, Leger A, Catros V, Bonneville M, Scotet E. Repeated systemic administrations of both aminobisphosphonates and human Vgamma9Vdelta2 T cells efficiently control tumor development in vivo. J. Immunol. 2013; 191(4):1993-2000; PMID:23836057; http:// dx.doi.org/10.4049/jimmunol.1300255
- Nakazawa T, Nakamura M, Park YS, Motoyama Y, Hironaka Y, Nishimura F, Nakagawa I, Yamada S, Matsuda R, Tamura K et al. Cytotoxic human peripheral blood-derived gammadeltaT cells kill glioblastoma cell lines: implications for cell-based immunotherapy for patients with glioblastoma. J. Neurooncol. 2014; 116(1):31-9; PMID:24062140
- Cimini E, Piacentini P, Sacchi A, Gioia C, Leone S, Lauro GM, Martini F, Agrati C. Zoledronic acid enhances Vdelta2 T-lymphocyte antitumor response to human glioma cell lines. Int. J. Immunopathol. Pharmacol. 2011; 24(1):139-48; PMID:21496396
- Das AV, James J, Zhao X, Rahnenfuhrer J, Ahmad I. Identification of c-Kit receptor as a regulator of adult neural stem cells in the mammalian eye: interactions with Notch signaling. Dev. Biol. 2004; 273(1):87-105; PMID:15302600; http://dx.doi.org/10.1016/j. ydbio.2004.05.023
- Donnou S, Fisson S, Mahe D, Montoni A, Couez D. Identification of new CNS-resident macrophage subpopulation molecular markers for the discrimination with murine systemic macrophages. J. Neuroimmunol. 2005; 169(1-2):39-49; PMID:16169092; http://dx.doi.org/ 10.1016/j.jneuroim.2005.07.016
- Harly C, Guillaume Y, Nedellec S, Peigné CM, Mönkkönen H, Mönkkönen J, Li J, Kuball J, Adams EJ, Netzer S et al. Key implication of CD277/butyrophilin-3 (BTN3A) in cellular stress sensing by a major human gammadelta T-cell subset. Blood 2012; 120 (11):2269-79; PMID:22767497; http://dx.doi.org/10.1182/blood-2012-05-430470

- Brocard E, Oizel K, Lalier L, Pecqueur C, Paris F, Vallette FM, Oliver L. Radiation-induced PGE2 sustains human glioma cells growth and survival through EGF signaling. Oncotarget 2015; 6(9):6840-9; PMID:25749386; http://dx.doi.org/10.18632/oncotarget.3160
- Cho DY, Lin SZ, Yang WK, Lee HC, Hsu DM, Lin HL, Chen CC, Liu CL, Lee WY, Ho LH. Targeting cancer stem cells for treatment of glioblastoma multiforme. Cell Transplant. 2013; 22(4):731-9; PMID:23594862; http://dx.doi.org/10.3727/096368912X655136
- Thon N, Damianoff K, Hegermann J, Grau S, Krebs B, Schnell O, Tonn JC, Goldbrunner R. Presence of pluripotent CD133+ cells correlates with malignancy of gliomas. Mol. Cell. Neurosci. 2010; 43(1):51-9; PMID:18761091; http://dx.doi.org/10.1016/j.mcn.2008.07.022
- Silver DJ, Siebzehnrubl FA, Schildts MJ, Yachnis AT, Smith GM, Smith AA, Scheffler B, Reynolds BA, Silver J, Steindler DA. Chondroitin sulfate proteoglycans potently inhibit invasion and serve as a central organizer of the brain tumor microenvironment. J Neurosci 2013; 33(39):15603-17; PMID:24068827; http://dx.doi.org/10.1523/ JNEUROSCI.3004-12.2013
- Morita CT, Jin C, Sarikonda G, Wang H. Nonpeptide antigens, presentation mechanisms, and immunological memory of human Vgamma2Vdelta2 T cells: discriminating friend from foe through the recognition of prenyl pyrophosphate antigens. Immunol. Reviews 2007; 215:59-76; PMID:17291279; http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-065X.2006.00479.x
- Sandstrom A, Peigne CM, Leger A, Crooks JE, Konczak F, Gesnel MC, Breathnach R, Bonneville M, Scotet E, Adams EJ. The intracellular B30.2 domain of butyrophilin 3A1 binds phosphoantigens to mediate activation of human Vgamma9Vdelta2 T cells. Immunity 2014; 40 (4):490-500; PMID:24703779; http://dx.doi.org/10.1016/j. immuni.2014.03.003
- Pereboeva L, Harkins L, Wong S, Lamb LS. The safety of allogeneic innate lymphocyte therapy for glioma patients with prior cranial irradiation. Cancer Immunol. Immunother 2015; 64(5):551-62; PMID:25676710; http://dx.doi.org/10.1007/s00262-015-1662-z
- Lamb LS, Jr., Musk P, Ye Z, van Rhee F, Geier SS, Tong JJ, King KM, Henslee-Downey PJ. Human gammadelta(+) T lymphocytes have in vitro graft vs leukemia activity in the absence of an allogeneic response. Bone Marrow Transplant. 2001; 27(6):601-6; PMID:11319589; http://dx.doi.org/10.1038/sj.bmt.1702830
- Bailey SL, Carpentier PA, McMahon EJ, Begolka WS, Miller SD. Innate and adaptive immune responses of the central nervous system. Critical Rev. Immunol. 2006; 26(2):149-88; PMID:16700651; http:// dx.doi.org/10.1615/CritRevImmunol.v26.i2.40
- Louveau A, Smirnov I, Keyes TJ, Eccles JD, Rouhani SJ, Peske JD, Derecki NC, Castle D, Mandell JW, Lee KS et al. Structural and functional features of central nervous system lymphatic vessels. Nature 2015; 523 (7560):337-41; PMID:26030524; http://dx.doi.org/10.1038/nature14432
- 34. Jung G, Brandl M, Eisner W, Fraunberger P, Reifenberger G, Schlegel U, Wiestler OD, Reulen HJ, Wilmanns W. Local immunotherapy of glioma patients with a combination of 2 bispecific antibody fragments and resting autologous lymphocytes: evidence for in situ t-cell activation and therapeutic efficacy. Int. J. Cancer 2001; 91(2):225-30; PMID:11146449; http://dx.doi.org/10.1002/ 1097-0215(200002)9999:9999%3c::AID-IJC1038%3e3.3.CO;2-7
- Quattrocchi KB, Miller CH, Cush S, Bernard SA, Dull ST, Smith M, Gudeman S, Varia MA. Pilot study of local autologous tumor infiltrating lymphocytes for the treatment of recurrent malignant gliomas. . Neuro-oncol. 1999; 45(2):141-57; PMID:10778730
- 36. Sloan AE, Dansey R, Zamorano L, Barger G, Hamm C, Diaz F, Baynes R, Wood G. Adoptive immunotherapy in patients with recurrent malignant glioma: preliminary results of using autologous whole-tumor vaccine plus granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and adoptive transfer of anti-CD3-activated lymphocytes. Neurosurg. Focus. 2000; 9(6):e9; PMID:16817692; http://dx.doi.org/10.3171/foc.2000.9.6.10
- 37. Westphal M, Yla-Herttuala S, Martin J, Warnke P, Menei P, Eckland D, Kinley J, Kay R, Ram Z; ASPECT Study Group. Adenovirus-mediated gene therapy with sitimagene ceradenovec followed by intravenous ganciclovir for patients with operable high-grade glioma (ASPECT): a randomised, open-label, phase 3 trial. Lancet Oncol
2013; 14(9):823-33; PMID:23850491; http://dx.doi.org/10.1016/S1470-2045(13)70274-2

- Rogers MJ, Crockett JC, Coxon FP, Monkkonen J. Biochemical and molecular mechanisms of action of bisphosphonates. Bone 2011; 49(1):34-41; PMID:21111853; http://dx.doi.org/10.1016/j. bone.2010.11.008
- 39. Kobayashi H, Tanaka Y, Yagi J, Minato N, Tanabe K. Phase I/ II study of adoptive transfer of gammadelta T cells in combination with zoledronic acid and IL-2 to patients with advanced renal cell carcinoma. Cancer Immunol. Immunother. 2011; 60 (8):1075-84; PMID:21519826; http://dx.doi.org/10.1007/s00262-011-1021-7
- Coleman RE. Risks and benefits of bisphosphonates. Br. J. Cancer 2008; 98(11):1736-40; PMID:18506174; http://dx.doi.org/10.1038/sj. bjc.6604382

- Weiss HM, Pfaar U, Schweitzer A, Wiegand H, Skerjanec A, Schran H. Biodistribution and plasma protein binding of zoledronic acid. Drug Metab. Dispos. 2008; 36(10):2043-9; PMID:18625688
- Kato Y, Tanaka Y, Tanaka H, Yamashita S, Minato N. Requirement of species-specific interactions for the activation of human gamma delta T cells by pamidronate. J. Immunol. 2003; 170(7):3608-13; PMID:12646624; http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.170.7.3608
- Sabatino R, Antonelli A, Battistelli S, Schwendener R, Magnani M, Rossi L. Macrophage depletion by free bisphosphonates and zoledronate-loaded red blood cells. PloS One 2014; 9(6):e101260; PMID:24968029; http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0101260
- Rietkotter E, Menck K, Bleckmann A, Farhat K, Schaffrinski M, Schulz M, Hanisch UK, Binder C, Pukrop T. Zoledronic acid inhibits macrophage/ microglia-assisted breast cancer cell invasion. Oncotarget 2013; 4(9):1449-60; PMID:24036536; http://dx.doi.org/10.18632/oncotarget.1201

<u>Partie 3</u> : Etude de la réactivité naturelle des LT Vγ9Vδ2 allogéniques vis-à-vis de cultures primaires de GBM

A. Reconnaissance et élimination sélective des cultures primaires de GBM de signature moléculaire mésenchymateuse

Faisant suite aux résultats prometteurs obtenus à la fois *in vitro* et *in vivo* lors de l'association entre les LT V γ 9V δ 2 et le zolédronate, nous avons cherché à optimiser les conditions du traitement. Le but ultime de ce projet de recherche étant le transfert vers la clinique, une injection directe de zolédronate en intracrânien chez l'homme semble hasardeuse principalement en raison de l'absence d'étude concernant sa toxicité sur le parenchyme cérébral sain. De plus, des résultats préliminaires nous indiquaient une immunoréactivité naturelle des LT V γ 9V δ 2 vis-à-vis de certaines lignées (LN18) et cultures primaires (GBM-1). Nous avons donc généré un large panel de populations lymphocytaires T V γ 9V δ 2 allogéniques, dont la réactivité naturelle vis-à-vis de cultures primaires de GBM a été évaluée.

Ainsi, 44 populations de LT V γ 9V δ 2 ont été spécifiquement amplifiées à partir de PBMC de donneurs sains via l'utilisation de BrHPP ou de zolédronate, puis placées en co-culture avec GBM-10 ou GBM-1. L'activation des lymphocytes a d'abord été analysée par cytométrie en flux via l'expression du marqueur fonctionnel CD107a à la surface des LT V γ 9V δ 2. De façon très intéressante, GBM-1 est significativement mieux reconnue que GBM-10 par l'ensemble des LT V γ 9V δ 2 testés (**Figure 24A**). Le potentiel cytotoxique de ces effecteurs a ensuite été mesuré, montrant une lyse sélective de la culture primaire GBM-1 avec 30% de mort au ratio effecteurs/cibles de 10/1, contre 5% dans le cas de GBM-10 (**Figure 24B**). D'après l'**article 1** (**Partie I**, p.73), les cultures primaires GBM-1 et GBM-10 appartiennent chacune à un sous-type moléculaire différent, respectivement MES et CNP. Nous avons donc cherché à savoir si cette réactivité naturelle des LT V γ 9V δ 2 vis-à-vis de GBM-1 pouvait être retrouvée contre d'autres cultures primaires de GBM de sous-type MES.

Sur la base d'une quarantaine de gènes discriminants, une analyse transcriptomique a été réalisée par RT-qPCR sur 12 cultures primaires de GBM, en plus de GBM-1 et GBM-10, permettant de les répartir en 2 groupes selon leur profils moléculaires : 5 MES et 9 CNP (**Figure 24C**). Puis, la réactivité de diverses populations de LT V γ 9V δ 2 vis-à-vis des cultures primaires de GBM a été mesurée par cytométrie en flux, mettant en évidence une reconnaissance préférentielle des cultures GBM de sous-type MES (**Figure 24D**).



Figure 24 : Selective recognition and elimination of mesenchymal primary GBM cultures.

(A) Differential recognition of primary GBM-10 and GBM-1 cultures by Vγ9Vδ2 T lymphocytes. Vγ9Vδ2 T cells were co-cultured 4 h with primary GBM cultures (E/T ratio 1:1) and analyzed by flow cytometry for CD107a cell surface protein expression. Left panel: Representative cytometry profile of CD107a expression (%) of one $V\gamma 9V\delta 2$ T cell line over 44. Frequencies are indicated in each quadrant. *Right panel*: Frequency of CD107a⁺ Vγ9Vδ2 T cells (%). Each dot corresponds to one individual allogeneic PBMC-derived Vγ9Vδ2 T cell line (n=44, mean +/- SD, Wilcoxon matched-pairs signed Rank test, ****p<0.0001). (B) Specific elimination of primary GBM-1 culture by $V\gamma 9V\delta 2$ T lymphocytes. Primary GBM cultures were loaded with 51 Cr and co-cultured 4 h with V γ 9V δ 2 T cells at indicated E/T ratios. 51 Cr release was measured in culture supernatants. Experiments were realized in triplicates using 2 different Vy9V82 T cell lines. Results are expressed as % of cytotoxicity (mean +/- SD, Sidak's multiple comparison test, ***p<0.001, ****p<0.0001). (C) Clustering of 14 primary GBM cultures in MES and CNP subtypes. Expression of 47 genes selected among the most discriminant genes were amplified by RT-qPCR and subsequently analyzed using unsupervised hierachical clustering with XLSTAT software. Low, medium and high expression are represented respectively as red, black and green colors. (D) $\underline{V\gamma 9V\delta 2}$ T cells selectively recognize mesenchymal primary <u>GBM cultures</u>. Frequency of CD107a⁺ among TCRV δ 2⁺ cells (%) tested against 14 different primary GBM cultures. Each dot corresponds to an individual $V\gamma 9V\delta 2$ T cell line (n \geq 4, mean +/- SEM).

B. Hétérogénéité des populations de LT Vγ9Vδ2 allogéniques

En plus de la variabilité des cellules cibles, nos résultats suggèrent une hétérogénéité de réactivité naturelle des LT V γ 9V δ 2. L'analyse systématique des 44 populations LT V γ 9V δ 2 vis-à-vis des cultures primaires de GBM nous a d'abord permis de confirmer la réactivité naturelle de ces derniers contre une même population de cellules cibles tumorales de sous-type MES (**Figure 25A**). Puis nous avons identifié une population lymphocytaire T L2 qui non seulement reconnaît mieux l'ensemble des cultures primaires de GBM que la population L7 (**Figure 25B**), mais les élimine également plus efficacement comme le montre le test de cytotoxicité (**Figure 25C**).

A noter que nos LT V γ 9V δ 2 générés *in vitro* sont tous fonctionnels et non anergiques, du fait de leur capacité à reconnaître et à éliminer efficacement les cultures primaires de GBM prétraitées au zolédronate (**Figure 25C** et données non montrées). De plus, aucune différence de réactivité n'a été observée entre les populations de LT V γ 9V δ 2 générées avec du BrHPP ou du zolédronate (données non montrées).

Nous avons ensuite souhaité déterminer si L2 était capable d'éliminer efficacement GBM-1 *in vivo*, en l'absence de prétraitement au zolédronate. Après implantation cérébrale des cellules tumorales GBM-1 ou GBM-10, les souris NSG ont été traitées ou non, avec 3 injections intracrâniennes de LT V γ 9V δ 2, directement au niveau du site tumoral. Quelque soit le modèle (GBM-1 ou GBM-10), le transfert adoptif de cellules T V γ 9V δ 2 naturellement réactives (L2) semble ralentir la progression tumorale (**Figure 26**). En l'absence de traitement, GBM-1 induit la mort des animaux en une trentaine de jours, tandis qu'une triple injection de la population lymphocytaire T L2 permet de prolonger la survie de 2 souris dont une longue survivante (**Figure 26A**). Aucune souris survivante n'a été observée dans le même modèle avec la population lymphocytaire T L7, ni dans le cas de GBM-10 (**Figure 26B**).



Figure 25 : Allogeneic PBMC-derived V γ 9V δ 2 T lymphocytes display heterogeneous reactivity towards primary GBM cultures. (A) Heterogeneity of reactivity between V γ 9V δ 2 T cell lines. Representative reactivity of 10 V γ 9V δ 2 T cell lines (L1 to L10) among 44 cell lines towards MES (white) and CNP (black) primary GBM cultures. V γ 9V δ 2 T cells were co-cultured 4 h with primary GBM cultures (E/T ratio 1:1) and analyzed by flow cytometry for CD107a cell surface protein expression. Results are presented as frequency of CD107a⁺ among TCRV δ 2⁺ cells. Each dot correspond to one individual primary GBM culture (n \geq 6). The dash corresponds to the mean of CD107a⁺ T cells for one T cell line against either the MES (white) and the CNP (black) GBM cultures (n=14). MES cells are presented as white dot and CNP as black dot (mean, Wilcoxon matched-pairs signed Rank test, ***p<0.001). (C) GBM-10 (CNP) and GBM-1 (MES) primary cultures were loaded with ⁵¹Cr and co-cultured 4 h with either the non-reactive L7 or the naturally reactive L2 V γ 9V δ 2 T cell lines (E/T ratio: 10/1). Cytotoxicity was measured as the ⁵¹Cr release in culture supernatants. Positive controls were obtained after overnight pretreatement of primary GBM cultures with 20 μ M of zoledronate (white bars). Results are expressed as % of cytotoxicity (n=3 in triplicates, mean +/- SD, 2 ways ANOVA test, ****p<0.0001).



Figure 26 : Adoptively-transferred allogeneic PBMC-derived V γ 9V δ 2 T lymphocytes slightly reduce invasive primary GBM tumor progression *in vivo*. Survival curves of (A) GBM-1 (MES) and (B) GBM-10 (CNP) brain tumor bearing NSG mice treated, or not (n=15), with non-reactive V γ 9V δ 2 T cells L7 (n \geq 10) or naturally reactive V γ 9V δ 2 T cells L2 (n=8), weekly injected into tumoral site at day 7, 14 and 21 after tumor cell implantation.

Bien que les effets *in vivo* restent modestes, l'ensemble des résultats obtenus *in vitro* et *in vivo* sur le transfert adoptif d'une population de LT V γ 9V δ 2 naturellement réactive sont encourageants. Les LT V γ 9V δ 2 générés à partir de sang périphérique de volontaires sains sont hétérogènes et polyclonaux. Une analyse approfondie de ces populations effectrices, notamment par un phénotypage de surface et/ou l'établissement de clones cellulaires, pourrait permettre d'identifier et d'amplifier spécifiquement les LT V γ 9V δ 2 naturellement réactifs vis-à-vis des cultures primaires de GBM. De plus, il existe des molécules capables d'influer sur le potentiel cytotoxique des LT V γ 9V δ 2. C'est notamment le cas de l'IL-21, qui pourrait être utilisé afin d'augmenter leur réactivité naturelle.

C. Article 3 : « *IL-21 increases the reactivity of allogeneic human Vγ9Vδ2 T cells against primary glioblastoma tumors »* - en préparation

Noémie Joalland^{*}, <u>Cynthia Chauvin^{*}</u>, Lisa Oliver, François M. Vallette, Claire Pecqueur, Ulrich Jarry & Emmanuel Scotet

* co-first authors

L'objectif de cette étude a été d'évaluer la capacité de la cytokine IL-21 à potentialiser les fonctions effectrices anti-tumorales de LT V γ 9V δ 2. La culture primaire mésenchymateuse GBM-1, naturellement reconnue et éliminée par l'ensemble des cellules T V γ 9V δ 2, a donc été choisie afin d'analyser, à la fois *in vitro* et *in vivo*, la réactivité naturelle d'une population T V γ 9V δ 2 préalablement pré-traitée ou non à l'IL-21. Nous avons ainsi montré que le pré-traitement des LT V γ 9V δ 2 à l'IL-21 entraîne une augmentation significative de leur cytotoxicité, et améliore significativement la survie des animaux traités.

IL-21 increases the reactivity of allogeneic human $V\gamma 9V\delta 2$ T cells against primary glioblastoma tumors

Noémie Joalland^{1,2,*}, Cynthia Chauvin^{1,2,*}, Lisa Oliver^{1,2,3}, François M. Vallette^{1,2}, Claire Pecqueur^{1,2}, Ulrich Jarry^{1,2,†} and Emmanuel Scotet^{1,2,†}

¹ CRCINA, INSERM, CNRS, Université d'Angers, Université de Nantes, Nantes, France

² LabEx IGO "Immunotherapy, Graft, Oncology", Nantes, F-44000, France

³ Hotel Dieu, Hôpital de Nantes, Nantes, F-44000, France

* co-first authors

⁺ co-senior authors

Running title: IL-21 enhances Vy9V82 T cell responses against brain tumors

Correspondence: E. Scotet, INSERM UMR1232, Centre de Recherche en Cancérologie et Immunologie Nantes-Angers, IRS_UN, 8 quai Moncousu, 44007 Nantes cedex 1, France Emmanuel.Scotet@inserm.fr

Keywords: Human, Vγ9Vδ2 T lymphocytes, IL-21, Immunotherapy, Glioblastoma, Cancer

Funding: This work was supported by INSERM, CNRS, Université de Nantes, Association pour la Recherche contre le Cancer (R10139NN), Institut National du Cancer (INCa, PLBio2013-201, PLBio2014-155), Agence Nationale de la Recherche (ANR, GDSTRESS), Ligue Nationale contre le Cancer (AO InterRegional 2012). This work was realized in the context of the LabEX IGO and the IHU-Cesti programs, supported by the National Research Agency Investissements d'Avenir via the programs ANR-11-LABX-0016-01 and ANR-10-IBHU-005, respectively. The IHU-Cesti project is also supported by Nantes Metropole and the Pays de la Loire Region.

Conflicts of Interest: The authors disclose no potential conflicts of interest

Abbreviations: GBM, glioblastoma multiforme; CSC, cancer stem cells; $\gamma\delta$ T cells, gamma delta T cells; PAg, phosphoantigen; NBP, aminobisphosphonate; NSG, NOD.Cg-Prkdcscid Il2rgtm1Wjl/SzJ; rhuIL21, recombinant human interleukin 21; GzmB, Granzyme B.

Abstract

Glioblastoma multiforme (GBM) remains the most frequent and deadliest primary brain tumor in adults despite aggressive treatments that fail to eradicate highly infiltrative and resistant tumor cells. Non-alloreactive human V γ 9V δ 2 T lymphocytes, which constitute the main peripheral $\gamma\delta$ T cell subset in adults, are attractive effectors for designing immunotherapeutic strategies that aim at tracking infiltrative tumor cells and have limited side effects. To optimize the safety of these therapeutic approaches, we investigated the impact of modulating cytokines on the natural cytolytic activity of V γ 9V δ 2 T cells against human GBM tumors. *In vitro* experiments indicate that human IL-21 increases intracellular granzyme B levels and anti-GBM tumor cytotoxicity of allogeneic human V γ 9V δ 2 T lymphocytes. This enhancement lasts for several days, even after cytokine removal, which supports the development of sensitization steps of $\gamma\delta$ T lymphocytes prior adoptive transfer(s). Finally, our results show that IL-21-sensitized allogeneic V γ 9V δ 2 T cells significantly and naturally eliminate GBM tumor cells that develop in the brain, after orthotopic administrations. Together these observations pave the way for efficient and less toxic stereotaxic immunotherapies in GBM patients by using allogeneic human V γ 9V δ 2 T cells.

Introduction

Glioblastoma Multiform (GBM), is the most frequent human glioma, is highly aggressive and has a dismal prognosis (WHO grade IV; median survival of 9.4 months and 2 year-mortality > 86%) (1). Current treatment is surgery followed by radiotherapy and chemotherapy (2), modestly improves survival but patients die of rapid tumor relapse. The efficacy of combined treatment lines is strongly hampered by the incompleteness of surgical excision and the toxicity of radio- and chemotherapies (3). The highly proliferative and infiltrative nature of GBM cells, associated with cellular heterogeneity, as illustrated by the presence of cancer stem cells (CSC), also strongly contribute contribute to these limitations (3-6). Cellular immunotherapies have been proposed to eradicate deep brain infiltrative tumor cells with minimal toxicities (7). Various cellular immunotherapies for GBM using different target T cell effectors such as $\alpha\beta$ or $\gamma\delta$ T lymphocytes have been investigated (8-10). Peripheral V γ 9V δ 2 T cells, only found in primates, represent the most frequent $\gamma\delta$ T lymphocyte subset in adults (5-10 % of CD3⁺ lymphocytes) and carry a T cell receptor (TCR) composed of V82 chains which are systematically paired to Vy9 chains (11, 12). Antigenic activation of Vy9Vδ2 T cells is both species-specific and contact-dependent, but not restricted by MHC molecules excluding alloreactivity (13). $V\gamma 9V\delta 2$ T cell activation involves low molecular weight phosphorylated nonpeptidic molecules, called phosphoantigens (PAg), that are metabolites produced as intermediates of mevalonate microbial or mammalian pathways. Accordingly, cells either treated with aminobisphosphonates (NBP) which are pharmacologic inhibitors of the mevalonate pathway, or with a dysregulated metabolism (e.g. tumor cells) express higher amounts of PAg and activate

 $V\gamma 9V\delta 2$ T cells. The specific antigenic activation of $V\gamma 9V\delta 2$ T cells is tightly regulated by adhesion molecules and Natural Killer receptors axes and is controlled by butyrophilin BTN3A1 molecules, which are expressed by target cells (14-16). Numerous studies report that human allogeneic $V\gamma 9V\delta 2$ T cells might recognize a broad range of infected or transformed target cells from various tissular origins in vitro, including brain tumors. From a clinical standpoint, both passive and active immunotherapies targeting $\gamma\delta$ T cells in cancer patients have yielded encouraging, yet insufficient, clinical responses (17). In a recent work, we have shown both the feasibility and the anti-tumor efficacy of combined orthotopic administrations of NBP and allogeneic human $V_{\gamma}9V\delta 2$ T cell in mice carrying orthotopic primary human GBM tumors (10). To avoid any local use of NBP, which could potentially induce deleterious effects on healthy brain cells, we envisage immunotherapeutic strategies enhancing natural $V\gamma 9V\delta 2$ T cell responses towards fresh tumor cells using sensitizing cytokines (e.g. IL-21 (18)). Several studies show that IL-21 significantly enhances antitumor reactivity of NK and CD8⁺ T cells through perforin/granzyme-dependent mechanisms (19, 20). This pleiotropic type 1 cytokine belongs to the IL-2 family cytokines and is mostly produced by T lymphocytes (21). Upon interaction with its heterodimeric receptor, the JAK/STAT-3 signaling pathway is activated. Interestingly, our group has demonstrated that exogenous recombinant human IL-21 (rhuIL21) improves the anti-tumoral cytotoxicity of Vγ9Vδ2 T cells in vitro (18). In this study, we extend these observations by investigating the effects of rhuIL21 on the natural reactivity of allogeneic Vy9V82 T cells towards GBM tumor cells both in vitro and in vivo.

Material and Methods

<u>Cells</u>

Human mononuclear cells were isolated from healthy donor blood samples obtained from the Etablissement Français du Sang (EFS, Nantes, France) by Ficoll density centrifugation (Eurobio, Les Ullis, France). For specific expansions of V γ 9V δ 2 T cells, peripheral mononuclear cells were incubated with 3 μ M BrHPP (bromohydrin pyrophosphate), kindly provided by Innate Pharma (Marseille, France) in RPMI supplemented with 10% heat inactivated FCS, 2 mM L-glutamine, 10 mg/mL streptomycin, 100 IU/mL penicillin (Gibco, Carlbad, CA) and 100 IU/mL recombinant human IL-2 (Chiron, Emeryville, CA). Cultures were supplemented with 300 IU/mL IL-2 at day 4 and purity was measured by flow cytometry at week 3 (purity \geq 95%). For rhuIL21 sensitization, resting IL-2-*expanded* human V γ 9V δ 2 T lymphocytes were incubated with 30 ng/mL of premium grade recombinant human IL-21 (Myltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, Germany). V γ 9V δ 2 T cells were washed with fresh RPMI before performing experiments.

U-87MG cell line (HTB-14TM, ATCC, Manassas, VA) was cultured in DMEM medium (Gibco) supplemented with 10 % heat inactivated FCS, 2 mM L-glutamine, 10 mg/ml streptomycin and 100

IU/ml penicillin. GBM-1 are human primary astrocytic cancer cells (GBM, grade IV WHO 2016) which are derived from fresh tumor fragments (i.e. biopsy & mechanical dissociation) collected from a GBM patient. GBM-1 primary culture was grown in defined medium containing DMEM/Ham-F12 (Gibco) supplemented with 2 mM L-glutamine, N2 and B27 supplements (Gibco), 2 mg/mL heparin (Sigma Aldrich, Saint-Louis, MO), 20 ng/mL EGF (Peprotech, Rocky Hill, NJ), 25 ng/mL bFGF (Peprotech), 10 mg/mL streptomycin and 100 IU/mL penicillin. For limiting dilution assays, cells were dissociated and seeded at an initial concentration of $2x10^3$ cells / mL from which serial dilutions were performed in 96-well plate. Brain-derived cells were cultured for 2 weeks, after which the fraction of wells that did not contain neurospheres for each cell-plating density was calculated as described (22). Cells were cultured at 37° C in humidified atmosphere with 5 % CO₂.

Flow Cytometry

For human GBM cell surface staining, primary cells were incubated with 10 μ g/mL of APC-labeled anti-human CD44 mAb (clone #G44-26; BD Biosciences, Franklin lakes, NJ) or associated isotype controls. For intracellular staining, primary GBM cells were fixed with PBS-PFA 4%, incubated with permeabilization buffer (eBiosciences) and then stained with anti-human Nestin mAb (clone #10C2; Milipore, Billerica, MA). For V γ 9V δ 2 T cells intracellular staining, cells were fixed with PBS-PFA 4%, incubated with permeabilization buffer and then stained with PE-labeled anti-human granzymeB mAb (clone MHGB04; Invitrogen, Frederick, MD). Acquisition was performed using a FACSCalibur flow cytometer (BD Biosciences) and the events were analyzed using the FlowJo software (Treestar, Ashland, OR).

⁵¹Cr Release Assays

Target cells were sensitized, or not, overnight with zoledronic acid (10 μ M; Sigma Aldrich, Saint-Louis, MO) before incubation 1h with ⁵¹Cr (2,77 mCi/1x10⁶ cells), washed and cocultured for 4 h with allogeneic V γ 9V δ 2 T cells, at the indicated effector to target ratios. ⁵¹Cr release activity was measured in supernatants using a MicroBeta counter (Perkin Elmer, Waltham, MA). The percentage of tumor target cell lysis = (experimental release - spontaneous release)/(maximum release - spontaneous release)*100. Maximum and spontaneous release were determined by adding 1% Triton X-100 or medium, respectively, to ⁵¹Cr-labeled target cells in the absence of T cells.

Immunodeficient Mice

This study was carried out in accordance with the recommendations of the french Regional Ethics Committee of the Pays de la Loire (Approvement #00186.02). Immunodeficient NSG (*NOD.Cg-Prkdcscid Il2rgtm1Wjl/SzJ*) mice were obtained from Charles River Laboratories (Wilmington, MA) and bred in the animal facility of the University of Nantes (UTE, SFR F. Bonamy) under SPF status. Mice were used at 6–12 weeks of age. Human GBM cells were injected (1x10⁴ cells resuspended in 2 μ L PBS) using a stereotaxic frame (Stoelting,Wood Dale, IL) at 2 mm on the right of the medial suture and 0.5 mm in front of the bregma, depth: 2.5 mm. For adoptive T cell transfers, $2x10^7$ allogeneic human V γ 9V δ 2 T cells were stereotaxically injected into the tumor bed either at days 7 and 14 after tumor implantation with 1 μ g zoledronate or at days 7, 14 and 21 after tumor implantation.

Immunohistochemistry

Brains were fixed with 4% paraformaldehyde-PBS, embedded in paraffin wax and serially sectioned. Sections were incubated with 2% BSA and then with polyclonal rabbit anti-human CD3 Ab (Dako, Agilent Technologies, Santa Clara, CA) or rabbit anti-human MHC class I Ab (clone EPR1394Y; Abcam). Revelation was performed by using polymer histofine rabbit to mouse coupled to HRP (Microm Microtech France, Francheville, France) and a DAB detection system (Leica, Wetzlar, Germany). Slides were scanned using the NanoZoomer 2.0 HT (Hamamatsu Photonics K.K. Hamamatsu, Japan).

Statistical Analysis

Data are expressed as mean \pm SEM and were analyzed using GraphPad Prism 6.0 software (GraphPad Software, Inc. San Diego, CA). Mann and Withney (* p < 0.05; ** p < 0.005; *** p < 0.0005) or log rank tests (see indicated p value) were used to reveal significant differences. Relative Risk (RR) was calculated using the following formula RR=(experimental event/total subjects)/(control event/total subject) with experimental and control event which represent the number of long time surviving mice in each experimental group. RR of > 1 means the event is more likely to occur in the experimental group than in the control group.

Results

Primary human glioblastoma cells for analyzing the natural reactivity of $V\gamma 9V\delta 2$ T cells

Owing to the strict species specificity of primate $V\gamma 9V\delta 2$ T cells and the lack of natural counterparts in rodents, we first aimed at designing an orthotopic model of human tumor xenograft in immunodeficient NSG mice to measure the impact of rhuIL21 sensitization. The objective of these initial experiments was to set up a reliable *in vivo* model that recapitulates human GBM features to assess the anti-tumor efficacy of $\gamma\delta$ T cell-based immunotherapies. Among various criteria, the following main requirements were chosen to select tumor cell candidates: they should naturally activate allogeneic human V γ 9V δ 2 T cells, grow *in vivo* to induce the death of orthopically engrafted mice and form an infiltrative tumor. Most commercial human brain tumor cell lines, like U-87MG, are characterized by a relative cellular homogeneity triggering a compact and poorly invasive tumor mass in vivo (10). In contrast, primary human tumor cells, which are established from fresh tumor biopsies and grown in defined media, retain cellular heterogeneity which is associated to invasive properties. Mouse brain IHC analysis, performed 7, 14, 28 and 45 days after stereotaxic implantation of primary GBM-1 cells, indicated the formation of infiltrative tumors (Fig. 1A). GBM-1 cell cultures contained a significant amount of CSC, as shown by both cytometric analyses against CD44 and Nestin, which are two stemness markers (Fig. 1B) and limiting dilution assays (~26% of CSC, *Fig. 1C*). ⁵¹Cr-release assays indicated that allogeneic human $V\gamma 9V\delta 2$ T cells spontaneously recognize and eliminate primary GBM-1 cells in vitro, as compared to U87-MG cells which are only killed upon NBP sensitization (Fig. 1D). After stereotaxic engraftment, primary GBM-1 cells grow to induce the death of mice (Fig. 1E). In line with our previously published observations (10), two successive combined local administrations of NBP and human allogeneic Vy9V82 T cells protected half of tumor-engrafted mice. Importantly, these experiments also showed that a significant fraction of mice was protected when human allogeneic $V\gamma 9V\delta 2$ T cells were administrated alone, in the absence of any NBP. Together our results indicate that brain invasive primary human GBM-1 cells, which contain a significant fraction of CSC, can be further used for establishing invasive orthotopic GBM models and for testing immunotherapeutic strategies that exclusively rely on administration(s) of allogeneic human Vy9V82 T cell effectors in vivo.

IL-21 rapidly induces a long-lasting natural cytolytic activity of allogeneic human $V\gamma 9V\delta 2$ T cells towards tumor target cells in vitro

To investigate whether IL-21 modulates the reactivity of human V γ 9V δ 2 T cells towards GBM tumor cells, T lymphocytes were first sensitized by rhuIL21 for one day and analyzed for intracellular granzyme B (GzmB) expression by flow cytometry (18). rhuIL21 increased GzmB levels within human V γ 9V δ 2 T cells (*Fig. 2A*) without affecting their viability (*Supplemental Fig. S1*). Of note, these approaches were also extended to PBL-V γ 9V δ 2 T cells that originate from distinct human healthy blood donors (n>5; *Fig. 2B*). The cytolytic activity of allogeneic human V γ 9V δ 2 T cells, sensitized or not by rhuIL21, against either U87-MG or primary GBM-1 cells was measured in ⁵¹Cr-release cytolytic assays. As shown in *Fig. 2C*, rhuIL21 sensitization increased V γ 9V δ 2 T cells (respectively, 43% and 67% of increase). These results were next confirmed in experiments which have been performed using various effector to GBM-1 target ratios (*Fig. 2D*). Together these data indicate that rhuIL21 increases the cytolytic activity of V γ 9V δ 2 T cells against GBM tumor cells *in vitro*, in the absence of NBP, mainly through an increase of GzmB levels.

To optimize efficiency of stereotaxic administration(s) of rhuIL21-treated allogeneic human V γ 9V δ 2 T cells, kinetic parameters were analyzed. First, allogeneic human PBL-V γ 9V δ 2 T lymphocytes were incubated with rhuIL21 for 1, 3, 5 or 7 days and intracellular GzmB expression was measured by flow cytometry. GzmB levels rapidly increased and remained at this level for at least 5 days (*Fig.*

3*A*). Of note, increased expression of GzmB was not strictly correlated with-tumor cytolysis (*Fig.* 3*B*). Second, V γ 9V δ 2 T lymphocytes were incubated with rhuIL21 for one day and next washed to determine how long T cells remain sensitized in absence of this cytokine. Interestingly, the absence of IL-21 for 24 hours did not significantly affect GzmB levels in V γ 9V δ 2 T lymphocytes nor their cytotoxic activity towards human GBM cells (*Fig.* 3*C* and 3*D*). However, extended culture time of sensitized V γ 9V δ 2 T lymphocytes cultured in the absence of IL-21 progressively reduced GzmB level to finally reach its initial level after 7 days. This indicates that a short-term rhuIL21 treatment rapidly enhances the natural antitumor reactivity of human allogeneic V γ 9V δ 2 T cells, through a long-lasting increase of intracellular GzmB levels.

IL-21 augments the natural activity of human $V\gamma 9V\delta 2$ T cells against tumor cells in vivo

Finally, we investigated whether or not rhuIL21 enhances the antitumor activity of allogeneic human V γ 9V δ 2 T cells *in vivo*. Human GBM-1 tumor bearing-mice were treated with three successive cycles of stereotaxic administrations of allogeneic human V γ 9V δ 2 T cells (at days 7, 14 and 21) that have been sensitized or not with rhuIL21. Three days after stereotaxic administration of V γ 9V δ 2 T cells on the tumor site, brains were collected from mice and immunohistochemical analyses were performed using an anti-human CD3 ϵ mAb. The results of this analysis indicate that allogeneic human V γ 9V δ 2 T cells, sensitized or not by rhuIL21, mainly stayed in the vicinity of the GBM tumor (*Fig. 4A*). Of note, administrated V γ 9V δ 2 T cells also colonized the second hemisphere which did not receive either tumor or T cells. This suggested that rhuIL21 does not alter the mobility of $\gamma\delta$ T cells (*right panel Fig. 4A* and *data not shown*).

While untreated mice died rapidly (mean survival = 27 days), 3 administrations of V γ 9V δ 2 T cells modestly, but significantly, improved the survival of treated mice (mean survival = 41 days). This value was increased to 66 days when V γ 9V δ 2 T cells were sensitized with rhuIL-21 prior to stereotaxic injection (RR=4; *Fig. 4B*). Strikingly, under these experimental conditions, 3 mice survived more than 150 days after GBM-1 cells injection which indicated that this treatment eradicated GBM disease. Immunohistochemical analyses with an anti-human MHC class I mAb showed that no tumor cell was detected in the brain of these long-time surviving mice (*right panel, Fig. 4B*). Altogether, our results indicated that rhuIL21 significantly enhances the natural reactivity of stereotaxically administrated allogeneic human V γ 9V δ 2 T cells towards invasive heterogeneous primary human GBM tumors.

Discussion

Adoptive immunotherapies that rely on stereotaxic transfer(s) of cellular immune effectors, such as allogeneic human $V\gamma 9V\delta 2$ T cells, represent novel promising approaches for eradicating highly aggressive, resistant and brain-infiltrated GBM tumor cells, with limited side effects on healthy tissues (9). Following a previous proof-of-concept study that showed both the feasibility and anti-tumor efficacy of such strategies (10), this study aimed at first evaluating the spontaneous reactivity of allogeneic human $V\gamma 9V\delta 2$ T lymphocytes against primary human GBM tumor cells and showed its enhancement by rhuIL21 *in vitro* and *in vivo*.

Taking account of our previous observations which evidenced that commercial human U-87MG cells grow by forming non-infiltrative, compact and poorly physiological tumors *in vivo* (10), we focused our work on distinct primary human GBM cell cultures. These tumor cells which originate from GBM biopsies (23) were phenotypically and functionally characterized to finally design proper *in vivo* models. Among several candidates, GBM-1 cells were initially selected as they are characterized by a cellular heterogeneity and the presence of CSC, which might be involved in rapid tumor recurrence and resistance to aggressive radio- and chemotherapies (24). The stereotaxic implantation of these human tumor cells led to the death of mice, associated to a massive infiltration. Importantly, a significant fraction of xenografted mice were protected upon two administrations of human $V\gamma 9V\delta 2$ T cells, even in the absence of NBP. This was in line with *in vitro* cytolysis assays that revealed the spontaneous recognition of GBM-1 by allogeneic $V\gamma 9V\delta 2$ T cells. These results on cells with typical features of human GBM cancer showed the natural recognition of brain tumor cells by $V\gamma 9V\delta 2$ T lymphocytes *in vitro* and *in vivo*, suggesting that GBM-1 cells might constitute a tumor cell basis for the development of immunotherapeutical GBM cell models *in vivo*.

We previously described that the efficiency of GBM therapies based on allogeneic human V γ 9V δ 2 T cells administrations is maximal upon co-injection with NBP (zoledronic acid) (10). In this therapeutical setting, clinical-grade NBP molecules, which are already indicated for the treatment of calcemia and bone disorders (25), require direct injections in the brain as they do not cross over the blood-brain barrier (26). Their potential deleterious effects as well as their pharmacodynamic parameters within healthy human brain tissues have not been carefully studied which renders ethically delicate any therapeutical use within the brain. Importantly, our study evidences that some *ex vivo*-amplified human allogeneic V γ 9V δ 2 T lymphocytes kill primary GBM cells, in the absence of any NBP molecules *in vitro* and *in vivo*. We next demonstrated that IL-21, which is a strong regulatory cytokine (21), enhances the natural anti-GBM tumor cytotoxicity of human V γ 9V δ 2 effector T cells *in vitro* and *in vivo*, in the absence of any potentially deleterious compound. IL-21 is an IL-2 family cytokine which is mainly highly produced by T helper lineages and by selected tumor cells like Hodgkin's lymphoma cells. It specifically binds heterodimeric type I receptors that are expressed on the membrane of T, B and NK lymphocytes which leads to the activation of the JAK/STAT pathway. This cytokine axis has been implicated in various pathological

situations including allergies, autoimmunity, viral infections and cancer (27, 28). The most well known direct effects of IL-21 are linked to its boosting effect on cytotoxic immune effectors, such as T and NK cells, and pro-proliferative actions on target cells. In the former case, IL-21 can increase the ability of T, B and NK cells to kill target cells through upregulation of granzymes and perforin. Accordingly, the cytotoxic activity increase of $V\gamma 9V\delta 2$ T cells is strongly correlated with a rapid augmentation of GzmB expression in vitro (18). The direct administration of IL-21 for tumor treatment in vivo remains debated as studies demonstrated that it may favor tumor growth and migration in breast cancer (29) and myeloma (30), which explains why IL-21 has been considered as an ex vivo sensitization molecule. Here, we show that the beneficial effect of IL-21 on GzmB expression and cytolytic properties of allogeneic human amplified Vy9V $\delta 2$ T cells towards primary GBM-1 tumor cells. This effect can be detected from the first hours of treatment and lasts for several days, even after starvation. Based on these observations, the antitumor activity of rhuIL21-sensitized $V\gamma 9V\delta 2$ T cells has been assessed in a GBM-1 brain tumor mice model. First, $V\gamma 9V\delta 2$ T cells are still detected in different areas within the tumor, three days after their stereotaxic administration and their brain mobility was not altered by IL-21 treatment. However, this treatment greatly improves the survival of treated mice with a complete remission for almost 33 % of them. Collectively, our data demonstrate that IL-21 is a molecule that can enhance, through a rapid and safe ex vivo sensitization step, the antitumor cytolytic activity of $V\gamma 9V\delta 2$ T cells, in the absence of any other molecule like NBP. These effects were observed using peripheral $V\gamma 9V\delta 2$ T cells from various healthy donors. Whether or not this apply to other types of tumors from distinct patients remains to be established.

The antigenic activation of $V\gamma 9V\delta 2$ T cells is both TCR- and contact-dependent, requires the expression of ubiquitous Self-expressed molecules such as butyrophilins (15) but is not restricted by MHC class I or -II molecules which excludes the risk of deleterious alloreactive responses (31, 32). Therefore, the constitution of $V\gamma 9V\delta 2$ T cells batches in banks prepared from selected healthy donors and sensitized by boosting compounds, such as IL-21, remains an attractive therapeutical option for tumors like GBM.

In conclusion, our study highlights for the first time the feasibility and the antitumor effect of stereotaxic immunotherapies which are based on local administrations of rhuIL21-sensitized allogeneic human $V\gamma 9V\delta 2$ T cells for the treatment of GBM tumors. In this therapeutical setting, deleterious effects are limited, if not excluded, by: (i) the lack of alloreactivity mediated by allogeneic human $V\gamma 9V\delta 2$ T cells, (ii) the rapid *ex vivo* cytokine-sensitization steps and (iii) the absence of NBP-administrations.

Acknowledgements

We thank the staff of University Hospital animal facility of Nantes for animal husbandry and care, the cellular and tissular imaging core facility of Nantes university (MicroPICell) for imaging, and the Cytometry Facility Cytocell from Nantes for their expert technical assistance. We thank Richard N. Hellman for carefully reading and correcting the manuscript.

References

- 1. Weller, M. T. Cloughesy, J. R. Perry, and W. Wick. 2013. Standards of care for treatment of recurrent glioblastoma--are we there yet? *Neuro Oncol* 15: 4-27.
- 2. Stupp, R. and F. Roila. 2009. Malignant glioma: ESMO clinical recommendations for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 20 Suppl 4: 126-128.
- 3. Buckner, J. C. P. D. Brown, B. P. O'Neill, F. B. Meyer, C. J. Wetmore, and J. H. Uhm. 2007. Central nervous system tumors. *Mayo Clin Proc* 82: 1271-1286.
- 4. Yuan, X. J. Curtin, Y. Xiong, G. Liu, S. Waschsmann-Hogiu, D. L. Farkas, K. L. Black, and J. S. Yu. 2004. Isolation of cancer stem cells from adult glioblastoma multiforme. *Oncogene* 23: 9392-9400.
- 5. Singh, S. K. C. Hawkins, I. D. Clarke, J. A. Squire, J. Bayani, T. Hide, R. M. Henkelman, M. D. Cusimano, and P. B. Dirks. 2004. Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature* 432: 396-401.
- 6. Bao, S. Q. Wu, R. E. McLendon, Y. Hao, Q. Shi, A. B. Hjelmeland, M. W. Dewhirst, D. D. Bigner, and J. N. Rich. 2006. Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature* 444: 756-760.
- 7. Vauleon, E. T. Avril, B. Collet, J. Mosser, and V. Quillien. 2010. Overview of cellular immunotherapy for patients with glioblastoma. *Clin Dev Immunol* 2010.
- Dutoit, V. C. Herold-Mende, N. Hilf, O. Schoor, P. Beckhove, J. Bucher, K. Dorsch, S. Flohr, J. Fritsche, P. Lewandrowski, J. Lohr, H. G. Rammensee, S. Stevanovic, C. Trautwein, V. Vass, S. Walter, P. R. Walker, T. Weinschenk, H. Singh-Jasuja, and P. Y. Dietrich. 2012. Exploiting the glioblastoma peptidome to discover novel tumour-associated antigens for immunotherapy. *Brain* 135: 1042-1054.
- Bryant, N. L. G. Y. Gillespie, R. D. Lopez, J. M. Markert, G. A. Cloud, C. P. Langford, H. Arnouk, Y. Su, H. L. Haines, C. Suarez-Cuervo, and L. S. Lamb, Jr. 2011. Preclinical evaluation of ex vivo expanded/activated gammadelta T cells for immunotherapy of glioblastoma multiforme. *J Neurooncol* 101: 179-188.
- Jarry, U. C. Chauvin, N. Joalland, A. Leger, S. Minault, M. Robard, M. Bonneville, L. Oliver, F. M. Vallette, H. Vie, C. Pecqueur, and E. Scotet. 2016. Stereotaxic administrations of allogeneic human Vgamma9Vdelta2 T cells efficiently control the development of human glioblastoma brain tumors. Oncoimmunology 5: e1168554.
- 11. Lefranc, M. P. and T. H. Rabbitts. 1990. A nomenclature to fit the organization of the human T-cell receptor gamma and delta genes. *Res Immunol* 141: 615-618.
- 12. Hayday, A. C. 2000. [gamma][delta] cells: a right time and a right place for a conserved third way of protection. *Annu Rev Immunol* 18: 975-1026.
- 13. Chien, Y. H. C. Meyer, and M. Bonneville. 2014. gammadelta T cells: first line of defense and beyond. *Annu Rev Immunol* 32: 121-155.
- Harly, C. Y. Guillaume, S. Nedellec, C. M. Peigne, H. Monkkonen, J. Monkkonen, J. Li, J. Kuball, E. J. Adams, S. Netzer, J. Dechanet-Merville, A. Leger, T. Herrmann, R. Breathnach, D. Olive, M. Bonneville, and E. Scotet. 2012. Key implication of CD277/Butyrophilin-3 (BTN3A) in cellular stress sensing by a major human gammadelta T cell subset. *Blood* 120: 2269-2279.
- 15. Harly, C. C. M. Peigne, and E. Scotet. 2014. Molecules and Mechanisms Implicated in the Peculiar Antigenic Activation Process of Human Vgamma9Vdelta2 T Cells. *Front Immunol* 5: 657.
- Sandstrom, A. C. M. Peigne, A. Leger, J. E. Crooks, F. Konczak, M. C. Gesnel, R. Breathnach, M. Bonneville, E. Scotet, and E. J. Adams. 2014. The intracellular B30.2 domain of butyrophilin 3A1 binds phosphoantigens to mediate activation of human Vgamma9Vdelta2 T cells. *Immunity* 40: 490-500.
- Fournie, J. J. H. Sicard, M. Poupot, C. Bezombes, A. Blanc, F. Romagne, L. Ysebaert, and G. Laurent.
 2013. What lessons can be learned from gammadelta T cell-based cancer immunotherapy trials? *Cell Mol Immunol* 10: 35-41.
- Thedrez, A. C. Harly, A. Morice, S. Salot, M. Bonneville, and E. Scotet. 2009. IL-21-mediated potentiation of antitumor cytolytic and proinflammatory responses of human V gamma 9V delta 2 T cells for adoptive immunotherapy. *J Immunol* 182: 3423-3431.
- 19. Skak, K. K. S. Frederiksen, and D. Lundsgaard. 2008. Interleukin-21 activates human natural killer cells and modulates their surface receptor expression. *Immunology* 123: 575-583.
- Casey, K. A. and M. F. Mescher. 2007. IL-21 promotes differentiation of naive CD8 T cells to a unique effector phenotype. *J Immunol* 178: 7640-7648.
- 21. Leonard, W. J. and C. K. Wan. 2016. IL-21 Signaling in Immunity. F1000Res 5: 224.

- 22. Das, A. V. J. James, X. Zhao, J. Rahnenfuhrer, and I. Ahmad. 2004. Identification of c-Kit receptor as a regulator of adult neural stem cells in the mammalian eye: interactions with Notch signaling. *Dev Biol* 273: 87-105.
- 23. Brocard, E. K. Oizel, L. Lalier, C. Pecqueur, F. Paris, F. M. Vallette, and L. Oliver. 2015. Radiationinduced PGE2 sustains human glioma cells growth and survival through EGF signaling. *Oncotarget* 6: 6840-6849.
- 24. Cho, D. Y. S. Z. Lin, W. K. Yang, H. C. Lee, D. M. Hsu, H. L. Lin, C. C. Chen, C. L. Liu, W. Y. Lee, and L. H. Ho. 2013. Targeting cancer stem cells for treatment of glioblastoma multiforme. *Cell Transplant* 22: 731-739.
- 25. Coleman, R. E. 2009. Zoledronic acid ameliorates the effects of endocrine therapy on bone health in women with early-stage breast cancer. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* 5: 72-73.
- 26. Weiss, H. M. U. Pfaar, A. Schweitzer, H. Wiegand, A. Skerjanec, and H. Schran. 2008. Biodistribution and plasma protein binding of zoledronic acid. *Drug Metab Dispos* 36: 2043-2049.
- 27. Spolski, R. and W. J. Leonard. 2008. The Yin and Yang of interleukin-21 in allergy, autoimmunity and cancer. *Curr Opin Immunol* 20: 295-301.
- 28. Spolski, R. and W. J. Leonard. 2008. Interleukin-21: basic biology and implications for cancer and autoimmunity. *Annu Rev Immunol* 26: 57-79.
- 29. Wang, L. N. Y. X. Cui, F. Ruge, and W. G. Jiang. 2015. Interleukin 21 and Its Receptor Play a Role in Proliferation, Migration and Invasion of Breast Cancer Cells. *Cancer Genomics Proteomics* 12: 211-221.
- 30. Brenne, A. T. T. B. Ro, A. Waage, A. Sundan, M. Borset, and H. Hjorth-Hansen. 2002. Interleukin-21 is a growth and survival factor for human myeloma cells. *Blood* 99: 3756-3762.
- 31. Lamb, L. S. Jr. P. Musk, Z. Ye, F. van Rhee, S. S. Geier, J. J. Tong, K. M. King, and P. J. Henslee-Downey. 2001. Human gammadelta(+) T lymphocytes have in vitro graft vs leukemia activity in the absence of an allogeneic response. *Bone Marrow Transplant* 27: 601-606.
- 32. Pereboeva, L. L. Harkins, S. Wong, and L. S. Lamb. 2015. The safety of allogeneic innate lymphocyte therapy for glioma patients with prior cranial irradiation. *Cancer Immunol Immunother* 64: 551-562.



Figure 1: Primary human GBM-1 cells as tools for the establishment of orthotopic human glioblastoma models. **(A)** Human MHC class I (hMHC cl I) expression was analyzed by IHC on NSG mouse brain sections prepared at days (D) 7, 14, 28 and 45 after orthotopic implantation of GBM-1 cells. **(B)** GBM-1 cells were analyzed by flow cytometry for CD44 and Nestin expression. Grey histograms correspond to stainings obtained using isotype control mAb. **(C)** GBM-1 cells were seeded with an initial concentration of 2×10^3 cells/mL in 96-well plates. After 15 days of culture, the fraction of wells that do not contain neurospheres was calculated for each cell-plating density condition. **(D)** Human V γ 9V δ 2 T cells were co-cultured for 4 h with ⁵¹Cr-loaded U-87MG (*blue*) or GBM-1 (*orange*) cells after sensitization, or not, with 10 µM of zoledronic acid (n=3; ^{***}p<0.001). **(E)** Survival curves of GBM-1 brain tumor-bearing NSG mice untreated (*grey*) or treated at days 7 and 14 with V γ 9V δ 2 T cells alone ($\gamma\delta$ T cells x2, *blue*) or combined with zoledronic acid (*zol* + $\gamma\delta$ T cells x2, *green*) (n=10 mice). Statistical analysis was performed by log-rank test compared with controls (^{***}p<0.001; ^{***}p<0.001).



Figure 2: IL-21 increases both granzyme B levels in $V\gamma 9V\delta 2$ T cells and their cytotoxic activity against glioblastoma cells. In these experiments, human $V\gamma 9V\delta 2$ T cells were sensitized, or not, with recombinant human IL-21 for 1 day. (A) Representative flow cytometry histogram of intracellular granzyme B (GzmB) expression in human $V\gamma 9V\delta 2$ T cells (grey histograms indicate the staining obtained with isotype control mAb). (B) Representative picture of GzmB expression (gMFI) in non-treated (control) and IL-21-sensitized $V\gamma 9V\delta 2$ T cells (n=5 donors; **p<0.01). (C) $V\gamma 9V\delta 2$ T cells were co-cultured for 4 h with ⁵¹Cr-loaded U-87MG and GBM-1 target cells at effector to target (E:T) ratio 10:1 (n=4) or (D) with ⁵¹Cr-loaded GBM-1 cells at E:T ratio 1:3, 1:1, 10:1 and 25:1 (n=3). Results are expressed as percentage (%) of cytotoxicity (*p<0.05).



Figure 3: IL-21-increased granzyme B levels in $V\gamma 9V\delta 2$ T cells and their anti-tumor cytolytic activity are long lasting events. Human $V\gamma 9V\delta 2$ T cells were sensitized, or not, with recombinant human IL-21 for either 1, 3, 5, 7 days **(A-B)** or for 1 day. In this condition, cells were next washed and cultured for 1, 3 or 7 days after starvation **(C-D)** (n=3). Intracellular GzmB expression was measured in $V\gamma 9V\delta 2$ T cells by flow cytometry. **(A-C)** Results are expressed as gMFI ratio (gMFI of IL-21 sensitized cells/gMFI of control cells) (n=3). **(B-D)** $V\gamma 9V\delta 2$ T cells were co-cultured 4 h with ⁵¹Cr-loaded GBM-1 cells (ratio 10/1) (n=3). ⁵¹Cr release was measured in culture supernatants. Results are expressed as percentage (%) of cytotoxicity.



Figure 4: Adoptively-transferred allogeneic human V γ 9V δ 2 T cells sensitized with IL-21 efficiently eliminate orthotopic GBM-1 cells *in vivo*. (A) Human CD3e (hCD3) expression was analyzed by IHC on NSG mouse brain sections prepared three days after V γ 9V δ 2 T cells injection in mice carrying orthotopic GBM-1 tumors. Dotted line delineates GBM-1 tumor mass. (B) Survival curves of GBM-1 brain tumor-bearing NSG mice untreated (*grey lines*, n=15 mice) or successively treated at days 7, 14 and 21 with either allogeneic human V γ 9V δ 2 T cells (gd T cells x3, *blue line*, n=15 mice) or IL-21-sensitized V γ 9V δ 2 T cells (IL-21 gd T cells x3, *red line*, n=11 mice). Statistical analyses are indicated, log-rank (***p<0.001; ****p<0.0001) and relative risk (RR) tests were calculated to assess statistical significance of the survival differences among experimental groups. *right panels*: human MHC class I (hMHC cl I) expression was analyzed by IHC on brain sections prepared from untreated mice and long time surviving mice.

<u>Partie 4</u> : Identification des voies moléculaires impliquées dans la réactivité naturelle des LT Vγ9Vδ2 allogéniques contre les cultures primaires de GBM

A. Implication du récepteur NKG2D et du TCR Vγ9Vδ2 dans la reconnaissance naturelle des cultures primaires de GBM

Face à la réactivité naturelle et sélective des LT V γ 9V δ 2 vis-à-vis des cultures primaires de GBM présentant une signature moléculaire MES, identifier les différences phénotypiques qui existent entre les cultures MES et les CNP était primordial. Nous avons dans un premier temps réanalysé l'étude transcriptomique réalisée sur 12 cultures primaires de GBM (5 MES et 7 CNP) (**Partie I, article 1**, p.73). Nous avons ainsi observé la surexpression de gènes impliqués dans les voies de processus immuns, de la réponse immunitaire ou encore de la réponse au stress cellulaire dans les cultures MES (**Figure 27A**). Parmi ces gènes sont notamment retrouvés ceux codant pour des ligands du récepteur NKG2D dont MICA/B et ULBPs. Un phénotypage de surface a donc ensuite été réalisé par cytométrie en flux, en collaboration avec le Dr Christelle Retière (EFS-Nantes, France), mettant

en évidence une surexpression globale des ligands de NKG2D (Figure 27B), et plus particulièrement de MICA/B et ULBP 2/5/6 (Figure 27C), à la surface des cultures primaires MES.



Figure 27 : Mesenchymal primary GBM cultures highly express NKG2D ligands. (A) Top 10 highest upregulated pathways in 5 MES primary GBM cultures compared to 7 CNP. Clusters obtained after unsupervised hierarchical transcriptomic analysis (DNA microarrays) followed by gene ontology analysis (GO: Gene Ontology) with indicated number of changed genes. (B-C) Tumor cell surface phenotyping performed by flow cytometry. MES (n=4) and CNP (n=7) primary GBM cultures were stained with either recombinant human NKG2D-immunoglobulin fusion protein to assess whole NKG2D ligand expression (B) or for ULBP 1, ULBP 2/5/6, ULBP 3 and MIC A/B expression (C). Left panel: Representative ligand expression in MES (white) and CNP (grey) GBM cells are presented. Right panel: Data are expressed as specific median fluorescence intensity (MFI). Statistical analyses were peformed using Mann-Whitney test, **p<0.01 for (B) and 2 ways ANOVA test ***p<0.001, ****p<0.0001 for (C).

Parallèlement, l'expression du récepteur activateur NKG2D à la surface des LT V γ 9V δ 2 a été évaluée par cytométrie en flux. L'ensemble des populations lymphocytaires T V γ 9V δ 2 phénotypées (n=18) présentent le récepteur NKG2D à leur surface (positives à plus de 98%, données non montrées). Cependant, des variations de l'intensité d'expression ont été observées. En effet, certaines populations de LT V γ 9V δ 2 semblent exprimer plus fortement le récepteur NKG2D que d'autres (**Figure 28A**). De manière intéressante, le niveau d'expression de NKG2D à la surface des LT V γ 9V δ 2 semble positivement corrélé à leur réactivité (**Figure 28B**). Ayant précédemment montré que les cultures primaires de sous-type MES expriment formtement les ligands de NKG2D, nous avons souhaité déterminer si cette voie pouvait jouer un rôle dans la réactivité et l'élimination naturelle des cultures primaires de GBM par les LT V γ 9V δ 2.

Afin de valider l'implication du récepteur activateur NKG2D, des co-cultures entre la population T V γ 9V δ 2 réactive L2 et la culture primaire naturellement reconnue GBM-1, ont été réalisées en présence ou non d'anticorps neutralisants dirigés contre un ligand de NKG2D (MICA/B) ou le récepteur NKG2D lui-même. L'implication du TCR V γ 9V δ 2 a également été évaluée avec l'utilisation d'un anticorps bloquant spécifique de la molécule BTN3A1, puisque l'interaction avec le TCR V γ 9V δ 2 est indispensable à la transduction du signal. Si la présence de l'anticorps neutralisant dirigé contre MICA/B ne semble pas avoir d'effet sur la lyse de la cible tumorale, le blocage du récepteur NKG2D ou de la molécule BTN3A1, diminuent au moins de moitié le potentiel cytotoxique des LT V γ 9V δ 2 (**Figure 28C**). Ces résultats démontrent l'implication de ces deux protéines dans l'interaction entre les LT V γ 9V δ 2 et GBM-1. Enfin, la combinaison des deux anticorps, anti-NKG2D et anti-BTN3A1, tend à réduire encore la cytotoxicité des LT V γ 9V δ 2, bien que cette dernière observation reste à confirmer.

L'ensemble de ces résultats démontre à la fois l'implication des couples récepteur/ligand de NKG2D et TCR-V γ 9V δ 2/BTN3A1 dans la reconnaissance et la lyse des cultures primaires de GBM par les lymphocytes T V γ 9V δ 2.



Figure 28 : Natural elimination of mesenchymal GBM-1 cells through TCRyð and NKG2D pathways. (A) Naturally reactive (n=4) and non-reactive (n=14) V γ 9V δ 2 T cell lines were analyzed by flow cytometry for NKG2D receptor expression. Results are expressed as specific median fluorescence intensity (MFI). (mean +/-SD; Mann-Whitney test, ***p<0.001). (B) Positive correlation between NKG2D receptor expression measured in (A) and the % of CD107a⁺ among TCRV δ 2⁺ cells in independant V γ 9V δ 2 T cell lines (n=18) co-cultured with GBM-1 (left panel: r²=0.5313, *p=0.0009). (C) GBM-1 primary cultures were loaded with ⁵¹Cr and co-cultured 4 h with the naturally reactive V γ 9V δ 2 T cell line L2 (E/T ratio: 10/1) in the presence of the indicated blocking antibodies. Relative cytotoxicity was calculated as ⁵¹Cr release in culture supernatants and expressed compared to isotype control (mean +/- SEM; n>=2 in triplicates, Mann-Whitney test, *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001).

B. Analyses fonctionnelles de clones générés à partir d'une population de LT Vγ9Vδ2 naturellement réactive

Les populations de LT V γ 9V δ 2 polyclonales, générées à partir de PBMC de donneurs sains, présentent une hétérogénéité de réactivité vis-à-vis des cultures primaires de GBM, avec certaines populations T V γ 9V δ 2 naturellement plus réactives que d'autres. L'analyse approfondie de ces effecteurs immunitaires, notamment par clonage, pourrait permettre d'établir et d'identifier des clones cellulaires naturellement plus réactifs que la population parentale.

Suite à des dilutions limites, 17 clones ont été générés à partir de la population polyclonale de LT V γ 9V δ 2 naturellement réactive L2 (**Figure 29A**). La capacité de ces clones à lyser naturellement les cultures primaires GBM-1 et GBM-10 a été analysée. A l'instar de la population T V γ 9V δ 2 polyclonale, aucun des clones générés n'est capable de lyser efficacement la culture primaire GBM-10 (**Figure 29B**). A l'inserve, dans le cas de la culture GBM-1, 4 clones présentent un potentiel cytotoxique inféreur à la population polyclonale L2, 5 d'entre eux répondent de façon similaire, tandis que 8 clones sont significativement plus efficaces, avec un pourcentage de lyse pouvant atteindre des valeurs jusqu'à 2 fois supérieures à celles de la population polyclonale parentale (**Figure 29C**).

Ainsi, de façon très intéressante, les clones générés à partir d'une population polyclonale de LT V γ 9V δ 2 naturellement réactive, présentent une hétérogénéité de potentiel cytotoxique vis-à-vis de la culture primaire GBM-1. Il n'est pas exclu que parmi ces 17 clones, certains soient identiques. Un séquençage des régions variables CDR3 de leurs TCR V γ 9V δ 2 est actuellement en cours et permettra d'identifier les clones redondants.



Figure 29 : Reactivity of T cell clones from the polyclonal and naturally reactive L2 V γ 9V δ 2 T cells. (A) Generation of V γ 9V δ 2 T cell clones from the naturally reactive PBMC-derived V γ 9V δ 2 T cell line L2 by limiting-dilution assay (LDA). The score negative wells (*top panel*) and a representative purity analysis for TCRV δ 2⁺ expression (*bottom panel*) are shown. (B-C) GBM-10 (B) and GBM-1 (C) primary cultures were loaded with ⁵¹Cr and co-cultured 4 h with the 17 distinct V γ 9V δ 2 T cell clones (in grey) or with the parental polyclonal L2 population (in black) (E/T ratio: 10/1). Cytotoxicity was measured as ⁵¹Cr release in culture supernatants and results are expressed as % of cytotoxicity. Statistical analysis were performed compared to parental polyclonal condition (n=3 in triplicates, mean +/- SEM, Mann-Whitney test, *p<0.05, **p<0.01, ****p<0.001).

Enfin, nous avons cherché à déterminer si les clones générés engageaient des voies moléculaires similaires à celles identifiées précédemment lors de l'élimination de la culture primaire GBM-1 par la population polyclonale parentale de LT V γ 9V δ 2 naturellement réactive L2.

Des tests de cytotoxicité ont été réalisés avec des anticorps neutralisants dirigés contre le récepteur activateur NKG2D et/ou la molécule BTN3A1, entre le clone C15 et la culture primaire GBM-1. La présence des anticorps bloquants spécifiques du récepteur NKG2D, ou de la molécule BTN3A1, diminue significativement le pourcentage de lyse induit par le clone T V γ 9V δ 2 C15. Enfin, l'association des 2 anticorps, anti-NKG2D et anti-BTN3A1, réduit encore plus la cytotoxicité du clone C15.

A l'instar de la population parentale, le récepteur activateur NKG2D et le TCR $V\gamma9V\delta2$ semblent impliqués dans la réactivité naturelle et sélective du clone C15 vis-à-vis de la culture primaire GBM-1.



Figure 30 : V γ **9V\delta2 T cell clone C15 spontaneously eliminates GBM-1 culture through TCR\gamma\delta and NKG2D pathways.** GBM-1 cells were loaded with ⁵¹Cr and co-cultured 4 h with the V γ 9V δ 2 T cell clone C15 (E/T ratio: 10/1) in the presence of the indicated blocking antibodies. Cytotoxicity was measured as ⁵¹Cr release in culture supernatants and results are expressed as % of cytotoxicity (n=2 in triplicates, mean +/- SEM, Mann-Whitney test, ** p<0.01).

En conclusion, nous avons généré à partir d'une population T V γ 9V δ 2 naturellement réactive, des clones qui présentent une variabilité importante de potentiel cytotoxique naturel vis-à-vis de la culture primaire GBM-1. Nos résultats montrent l'implication des couples récepteur/ligand de NKG2D et TCR-V γ 9V δ 2/BTN3A1 dans la reconnaissance et la lyse de GBM-1 par le clone C15. Ce clone qui présente une réactivité supérieure à celle de la population parentale pourra par la suite être testé *in vivo* afin d'évaluer son impact sur la progression tumorale.

Experimental procedure for unpublished data

Human primary GBM cultures

Human primary GBM cultures were derived from high-grade glioma operated on 14 patients. All procedures involving human participants were in accordance with the ethical standards of the ethic national research committee and with the 1964 Helsinki declaration and its later amendments or comparable ethical standards. Informed consent was obtained from all individual participants included in this study. After mechanical dissociation, primary GBM cells were cultured in define medium (DMEM/Ham F12, 2 mM L-glutamine, N2- and B27-supplement, 2 µg/ml heparin, 20 ng/ml EGF and 25 ng/ml bFGF, 100 IU/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin) at 37 °C in a humidified atmosphere with 5% CO₂. All experiments were performed at early passages and cells were checked for mycoplasma regularly.

Generation and expansion of allogeneic PBMC-derived human Vγ9Vδ2 T lymphocytes

Human peripheral-blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated from informed consent healthy adult volunteers recruited at the Blood Transfusion Center (EFS, Nantes, France). For specific expansions of V γ 9V δ 2 T cells, PBMCs were incubated with either 5 μ M of zoledronic acid monohydrate (#82712, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, US) or with 3 μ M of BrHPP (bromohydin pyrophosphate), kindly provided by Innate Pharma (Marseille, France) in RPMI 1640 culture medium supplemented with 10 % heat inactivated FCS, 2 mM L-glutamine, 100 μ g/ml streptomycin, 100 IU/ml penicillin (all from Gibco, Cergy Pontoise, France) and 100 IU/mL recombinant human IL-2 (rhIL-2) (Chiron Corporation, Emeryville, US). After 4 days of culture, cells were supplemented with rhIL-2 (300 IU/mL). Specific amplification of V δ 2⁺ T cells was estimated by flow cytometry (resting V γ 9V δ 2 T cell lines purity > 80–95 %). After 25 days, non-specific expansion was performed using PHA-feeders, Leucoagglutinin PHA-L (#L4144, Sigma-Aldrich) and irradiated allogeneic feeder cells including PBMCs and Epstein Barr Virus (EBV)-transformed B-lymphoblastoid cell lines (BLCLs), derived from PBMCs by *in vitro* infection with EBV-containing culture supernatant from the Marmoset B95-8 cell line (ATCC) in the presence of 1 μ g/ml cyclosporin-A.

RT and qPCR

Quantitative real-time PCR assays were performed in triplicate using the real-time thermal cycler qTOWER (Analytic Jena, DE) after total RNA isolation and reverse transcription. Three housekeeping genes were amplified and used to normalize with other gene transcripts. Relative

transcript expression was calculated compared to the mean of all primary GBM for the corresponding gene. Primers used in the study are indicated in the table below.

Table 4 : Primers used in RT-qPCR.

Genes	Primers		
PDK1	TGTCACCAGCCAGAATGTTCAG		
	GATGAGATGGACTTCCTTTGCCT		
PGM3	GAGTGCTTATTGACATCAGCGA		
	TTCCATTGCCTTCTCTTTCCC		
	TTCCATTGCCTTTCTCTTTCCC		
DLAT	TTGCCATATAACACTCCTCCAG		
GLS	GCTTTCCATGTTGGTCTTCCT		
	ACACTGTTGCCCATCTTATCCA		
SNAT2	TTCCCTGTATTCTGTTCATCTCC		
	GCTTTCCAACTAATCCAAATGCC		
	AAATCACCACTATCTCCCAATCCT		
GOT	ACACCTCCTACCCCCTTCTC		
	ACACCICCIACCOGCITCIC		
OGDH	CATCAGGGCATATCAGATACGAGG		
	TGTGGATGAGATAATGTCAGCGG		
LDHA	CAGTGTGCCTGTATGGAGTG	Cones	Primers
	CCTGCTTGTGAACCTCTTTCC	Genes	CCGAGAAGACCAAGGAGCAG
LDHB	GGATTCTGCTAGATTTCGCTACC	SNCG	CAGATGGCCTCAAGTCCTCC
	AAACACCTGCCACATTCACAC		CTTATATGGTGAGCGTGTAGGAG
ENO1	TCACCATGTCTATTCTCAAGATCC	GOT-M	ATCTTCAACTGTGACTCTACCC
	TATAGCGAGTCTTATCATTGTCCC		GAAGAAGCCTTTCACCGAG
PFKM	CCCTTCACCATTCGAGACCT	GPT	CATCGTCAGGGGAAGTTGGG
	TTTCATTCCTTAACACCAAGCCC	ADU	TGTATGAGCTGCTAGAGAAGGA
PFKP	CTGTATTCAGAAGAGGGCAAAGG	ABLI	GATTCCACTGCCAACATGCT
	AGTTTCTATCAAATGGAGAGGGTG	DNMT1	ATGAACTCAAGACCCACCC
HK2	AGCCACCACTCACCCTACTG	TOP1	CATAACCTCTCAAAGCCAGACTCG
	ACTCTCCGTGTTCTGTCCCA		GAAGTCCAAAGAGATGAAAGTCC
PDHA1	GACCATCTCATCACAGCCTACC	FGFR3	GGIGIAGATIGATGIGCICC
	CCTCCTTTCCCTTTAGCACAACC		GTCAGTGGCATCGTCTTTCAG
GLUT	GATGATGCGGGGAGAAGAAGG	AKT2	CCCTTAAACAACTTVTCCGTAGCA
	GTGGAGTAATAGAAGACAGCGT		CATCCACTCCTCCCTCTCGT
PKM	GGTGTTTGCGTCATTCATCC	NKX2-2	TCGCTGACCAACACAAAGACGG
	GATTTCATCAAACCTCCGAACC		CACAGAGCCCTCCTCATCGT
PGK1	CCAAGTCCGTAGTCCTTATGAG	SOX-2	AAACGAGGGAAATGGGAGG
	AACAGAACATCCTTGCCCAG		GTGAGTGTGGATGGGATTGG
PGAM	CGCTCCTATGATGTCCCACC	TRADD	GTTTGAGTTGCATCCTAGCCCA
	GCTGATCTTCTGTGAGGCTG		GCCGCACTTCAGATTTCGCA
SLC1A5	CTTTCGCTCATACTCTACCACC	MBP1	CATGTACAAGAACTCACACCA
			CIIGAAGAAGIGGACIACGGG
PGC1 cMYC	AAACACITACAAGCCAAACCA		Housekeeping genes
	ACAACACITTACAAGCCAAACCA		GATTACACCTTCCCACTTGCT
	GGIGCGIICAAIAGICIIGIICIC	RPLPO	TAGTCAAAGAGACCAAATCCCA
	GAGGAGGAACAAGAAGATGAGG		CAAGAGTGAAGAACAGTCCAG
	CAGCAGAAGGTGATCCAGAC	TATA	ACAAGGCCTTCTAACCTTATAGG
GPT-M	TACTCTCCAGATTGGAGATTCCA	HGPRT	GAAGGTGAAGGTCGGAGCT
	TCACCTCCATGTAGCCTCCT		GAAGATGGTGATGGGATTTC

CD107a mobilization assay detected by flow cytometry

GBM cells were co-cultured with V γ 9V δ 2 T cell lines at the indicated Effector to Target ratio (E/T) in define culture medium containing 5 μ M monensin (Sigma-Aldrich) and APC-labeled anti-human CD107a mAb (clone H4A3 from BD Biosciences, Franklin lakes, NJ, and BioLegend, San Diego, CA) for 4 h at 37 °C in a humidified atmosphere with 5% CO₂. V γ 9V δ 2 T cells were then stained with FITC-labeled anti-human V δ 2-TCR mAb (clone IMMU389; Beckman Coulter, Fullerton, CA) or associated isotype controls and analyzed by flow cytometry. Acquisition was performed using a FACSCalibur flow cytometer (BD Biosciences) and the events were analyzed using the FlowJo software 10 (Treestar, Ashland, OR).

Stereotaxic implantation of human GBM and Vy9Vo2 T cells in mouse brain

NSG (*NOD.Cg-Prkdcscid Il2rgtm1Wjl/SzJ*) mice (Charles River Laboratories; Wilmington, MA), were bred in the animal facility of the University of Nantes (UTE, SFR F. Bonamy) under SPF status and used at 6–12 weeks of age, accordingly to institutional guidelines (Agreement # 00186.02; Regional ethics committee of the Pays de la Loire (France)). Primary GBM-1 or GBM-10 cultures (10^4 cells in 2 mL PBS) were injected using a stereotactic frame (Stoelting,Wood Dale, IL) at 2 mm right lateral and 0.5 mm anterior of the Bregma, depth: 2.5 mm. For adoptive V γ 9V δ 2 T cell transfer assays, $2x10^7$ human V γ 9V δ 2 T cells in 15 mL sterile PBS were stereotaxically injected into the GBM tumor bed, 7, 14 and 21 days (3 injections) after tumor implantation. Animals were observed daily and euthanized when characteristic symptoms occurred, such as reduced mobility and significant weight loss.

Transcriptomic analysis

Samples provided as section of areas immediately adjacent to the region used for the histopathological diagnosis were mechanically dissociated, cultured in define media for less than 2 passages and frozen. Total RNA was obtained using the RNeasy mini kit (Qiagen, CA) according to the manufacturer's instructions. RNA quality was verified with the Bioanalyzer System (Agilent Technologies, Palo Alto, CA) using the RNA Nano Chip. RNA (1.5 µg) was processed and hybridized to the Genechip Human Genome U133 Plus 2.0 Expression array (Affymetrix, CA), which contains over 54,000 probe sets analyzing the expression levels of over 47,000 transcripts and variants. This roughly corresponds to 29,500 distinct Unigene identifiers. The processing was done according to the recommendations of the manufacturer. The raw signals of each probes for all the arrays where normalized against a virtual median chip (median raw intensity per row) using a local weighted scattered plot smoother analysis. The data were filtered to remove probes with low intensity values by sample category in order to keep the signature of little class of sample. The hierarchical clustering used to detect groups of correlated genes supported by a statistical method (limma) to detect differential expression among biological conditions, was computed on mediangene-centered and log-transformed data using average linkage and uncentered correlation distances with the Cluster program (de Hoon MJL et al. Open source clustering software. Bioinforma Oxf Engl. 2004 Jun 12;20(9):1453–4). Functional annotations of gene clusters and differential expressed genes were performed using GoMiner software (Zeeberg et al. GoMiner: a resource for biological interpretation of genomic and proteomic data. Genome Biol. 2003;4(4):R28.) and the Gene Ontology database (Ashburner M et al. Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. Nat Genet. 2000 May;25(1):25–9). Raw and normalized data have been deposited in the GEO database under accession number (GSE83626).

Cell surface phenotyping

Primary GBM cell surface phenotype was determined by flow cytometry using the following mouse anti-human monoclonal antibodies (mAbs): anti-ULBP2,5,6-PE (clone 165903), anti-ULBP3-PE (clone 166510), anti-ULBP1-AF488 (clone 170818; R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), anti-MICA/B-PE (clone 6D4; BD Biosciences, Le Pont de Claix, France) and associated isotype controls. To assess the whole NKG2D ligand expression, primary GBM cultures were incubated with FcRblocking Reagent (Miltenyi Biotec), washed, labelled with 10 μ g/ml recombinant human NKG2D/CD134 Fc Chimera protein (R&D Systems) or isotype control, incubated with 1 mg/ml Goat anti Human Biotin (EFS, Nantes, France) followed with Strepatividin-FITC staining (EFS, Nantes, France). V γ 9V δ 2 T cell surface phenotype was determined using anti-human NKG2D(CD134)-PE (clone 1D11; BD Biosciences), anti-NKG2A(CD189a) (clone Z199.1.10; Beckman Coulter Immunotech, Marseille, France) labelled with FITC (EFS, Nantes, France) or corresponding isotype-matched control mAbs. Data were collected using a FACSCalibur (BD Biosciences) and analyzed using Flowjo 8 software (TreeStar).

Cytotoxicity assays

Cytotoxic activity was assessed using a standard ⁵¹Cr release assay. Primary GBM cultures were labelled with ⁵¹Cr (2,77 μ Ci / 10⁶ cells) for 1 h at 37°C, washed four times with define culture medium, and plated at the indicated effector-to-target cell ratios in 96-well round-bottom plates. When indicated, tumor cells were pretreated over night with zoledronate at 20 μ M. For blocking antibodies assays, cells were incubated (30 min, 37°C) prior to the addition of V γ 9V δ 2 effector cells with mouse anti-human MICA/B mAb (clone 6D4; BioLegend) or mouse anti-human CD277/BTN3A1 mAb (clone 103.2; fourni par le Dr Daniel Olive) for primary GBM cultures, and mouse anti-human NKG2D (clone 1D11; BioLegend) for V γ 9V δ 2 T cells. After 4 h co-culture at 37°C, ⁵¹Cr release activity was measured in supernatants using a scintillation counter (MicroBeta, Perkin Elmer, Courtaboeuf, France). Each test was performed in triplicate. Percentage of tumor target cell lysis = ((experimental release - spontaneous release)/(maximum release - spontaneous release))*100. Maximum and spontaneous release were determined by adding 1 % Triton X-100 (Sigma) or medium respectively, to ⁵¹Cr-labeled tumor target cells in the absence of T cells.

Generation and expansion of Vγ9Vδ2 T cell clones

Limiting dilution assays was performed to clone the polyclonal $V\gamma 9V\delta 2$ T population L2, generated from PBMCs of healthy donor. Final cell dilutions ranged from 0.3 cell per well to 10 cells per well. At day 25, the fraction of wells free of T cell clones for each cell plating density was determined. These results were plotted against the number of cells plated per well. Growing cells from 0.3 cell per well dilution were transferred into larger wells. Clones were screened for their V $\delta 2^+$ -TCR expression (purity > 99 %) and non-specifically expanded using PHA-feeders in order to increase their cell number.

Statistical analysis

Data were analyzed using GraphPad Prism 6.0 software (GraphPad Software, Inc. San Diego, CA). Appropriate statistical test analysis were performed to reveal significant differences.

Discussion

Nos travaux de recherche se sont concentrés sur l'étude d'une immunothérapie cellulaire basée sur le transfert adoptif de cellules T Vy9V82 humains dans le cas du GBM. Ces lymphocytes T non conventionnels sont des senseurs de stress cellulaire qui présentent un intérêt majeur du fait notamment de leurs fonctions anti-tumorales. Nous avons généré plus d'une quarantaine de populations T V γ 9V δ 2 à partir de sang périphérique de donneurs sains, dont nous avons testé la réactivité naturelle et spontanée, en l'absence de présensibilisation par les ABP, contre un large panel de cultures primaires de GBM. De façon très intéressante, nous avons mis en évidence une hétérogénéité de la réactivité naturelle des populations T V γ 9V δ 2 générées à partir de sang périphérique de donneurs sains. En effet, certaines populations sont naturellement plus réactives et plus efficaces que d'autres vis-à-vis de l'ensemble des cultures primaires de GBM (Partie 3B & données non montrées). Cette hétérogénéité des effecteurs immunitaires peut trouver son origine dans (i) l'hétérogénéité interindividuelle des donneurs à partir desquels sont générés les LT Vy9V82, et qui ne possèdent pas nécessairement les mêmes potentiels cellulaires (âge, sexe); (ii) l'histoire immunologique de chaque donneur (infections antérieures); (iii) les pathologies associées aux prélèvements sanguins (hémochromatose, troubles métaboliques) ; (iv) les conditions de cultures in vitro. Il est toutefois important de noter que l'ensemble des LT Vy9V82 ont été générés selon des protocoles expérimentaux similaires soit en BrHPP, soit en zolédronate, sans qu'aucun lien ne soit apparu entre le mode d'expansion et la réactivité (données non montrées).

De plus, nous avons observé que l'ensemble des LT V γ 9V δ 2 générés présente une réponse semblable et universelle, avec une hiérarchie de reconnaissance vis-à-vis d'une même population de cultures primaires. Nous avons classées ces cultures en 2 grands groupes sur la base de leurs profils métaboliques et moléculaires : les cultures primaires MES (mésenchymateuse) et les CNP (classiques, neurales, proneurales) (**Partie 1A**). Ainsi, nous avons mis en évidence, à la fois *in vitro* et *in vivo*, que les cultures MES sont naturellement et sélectivement mieux reconnues et éliminées par les LT V γ 9V δ 2 que les CNP (**Partie 3A**).

Cette réactivité naturelle des LT V γ 9V δ 2 vis-à-vis de cellules tumorales a déjà été décrite dans d'autres modèles cellulaires tels que les lignées LN18 (GBM), RPMI 8226 (myélome multiple) ou encore DAUDI (lymphome de Burkitt). Les LT V γ 9V δ 2 reconnaissent spécifiquement via leurs TCR, et indépendamment des molécules du CMH classiques, des antigènes métaboliques du Soi tels que l'IPP, dont les taux intracellulaires
ont été décrits comme naturellement élevés dans la lignée cellulaire DAUDI (Gober et al. 2003). Nous avons montré par des tests de blocage, l'implication de la voie du TCR V γ 9V δ 2 dans la lyse naturelle des cultures primaires MES (Partie 4A & 4B) (Figure 31). Il n'est donc pas exclu que l'origine de la sélectivité naturelle des LT Vy9V82 contre les cultures MES soit liée à une altération métabolique des cellules cibles tumorales qui pourrait, par exemple, être analysées par un traitement aux statines, responsables de l'inhibition de la production d'IPP. Par ailleurs, nous avons généré puis analysé des clones cellulaires à partir d'une population de LT Vy9V82 naturellement réactive. De façon très intéressante, nous avons observé une variabilité importante de leur potentiel cytotoxique naturel, avec la mise en évidence de clones non réactifs ou à l'inverse plus réactifs que la population parentale (Partie 4B). Avant démontré l'implication du TCR dans la réponse cytotoxique des LT Vy9V82 contre les cultures primaires MES, il peut être fait un parallèle avec les observations rapportées par Gründer et ses collaborateurs. Bien que leurs résultats aient été obtenus suite à une sensibilisation des cellules cibles par un ABP, les auteurs ont démontré que la différence de réactivité était corrélée à une variabilité du répertoire T, et plus particulièrement aux domaines variables CDR3 du TCR Vy9V82 (Gründer et al. 2012). Nous réalisons actuellement le séquençage de ces régions sur les clones et un alignement de séquences nous permettra de déterminer si une signature TCR peut être identifiée voire associée à un profil de réactivité. D'autres clones issus de populations parentales naturellement réactives et non réactives seront générés, puis analysés afin de déterminer si des différences similaires peuvent être observées. Les clones T Vy9V82 les plus réactifs pourront être testés in vivo dans le but de déterminer si leur effet sur la progression tumorale est supérieur à celui mesuré avec la population parentale (**Partie 3B**).

D'autres voies moléculaires sont impliquées dans l'hétérogénéité et la sélectivité des LT V γ 9V δ 2 vis-à-vis des cultures primaires de GBM. Nous avons réalisé, en collaboration avec le Dr Christelle Retière (EFS, Nantes, France), le phénotypage de surface sur 18 populations T V γ 9V δ 2, mettant en évidence l'expression du récepteur NKG2D par l'ensemble des lymphocytes (**Partie 4A**). De plus, il semblerait que les LT V γ 9V δ 2 naturellement réactifs vis-à-vis des cultures primaires de GBM expriment plus ce récepteur activateur que les autres, bien que des analyses complémentaires soient nécessaires pour valider ce rôle discriminant (**Partie 4A**). En parallèle, nous avons démontré que le récepteur activateur NKG2D joue un rôle important dans la reconnaissance sélective et la lyse naturelle des cultures MES (**Figure 31**). Nous avons d'abord observé une expression différentielle des ligands de NKG2D à la surface les cultures primaires de GBM, avec une

surexpression de MICA/B et ULBPs par les cultures MES (**Partie 4A**). Puis des tests de blocage nous ont permis de montrer l'implication de la voie NKG2D, en plus de celle du TCR, dans l'élimination naturelle d'une culture primaire MES par les LT $V\gamma 9V\delta 2$ (**Partie 4A & 4B**).



Figure 31 : Voies moléculaires montrées au cours de cette étude comme étant impliquées dans la lyse des cultures primaires MES par les LT V γ 9V δ 2. Les voies du récepteur activateur NKG2D et du TCR V γ 9V δ 2 reconnaissent respectivement les ligands de NKG2D (dont MICA/B et ULBPs), et BTN3A1 associé à un phosphoantigène (IPP). Adapté de Silva-Santos, Serre, et Norell 2015.

Ces résultats sont en accord avec la littérature car il a notamment été décrit par Rincon-Orozco et al. que les cellules cancéreuses exprimant des ligands de NKG2D sont capables d'induire l'activation les LT V γ 9V δ 2 entraînant une réponse cytotoxique directe avec peu d'effet sur la production de cytokines (Rincon-Orozco et al. 2005). Toutefois, l'expression de ces ligands peut être modulée à la surface des cellules tumorales par un stress cellulaire. En effet, certains composants du micro-environnement tumoral tels que des cytokines (TGF- β) ou l'hypoxie sont responsables d'une diminution d'expression des ligands de NKG2D à la surface des cellules (Friese et al. 2004; Siemens et al. 2008). A l'inverse, une étude de 2015 rapporte que le TMZ induirait une surexpression des ligands de NKG2D à la surface de diverses lignées cellulaires de GBM, conduisant à une sensibilisation des cellules cibles à la reconnaissance et la lyse par les LT V γ 9V δ 2 (Chitadze et al. 2016). Nous avons analysé l'expression des ligands de NKG2D ainsi que la réactivité naturelle des LT V γ 9V δ 2 vis-à-vis de cultures primaires de GBM traitées ou non, mais ni l'irradiation, ni le TMZ (seuls ou combinés) ne semblent avoir d'effet sur notre modèle cellulaire (données non montrées).

L'implication de la voie du récepteur NKG2D nécessitera d'être validée sur un nombre plus important de cultures primaires MES avec divers LT V γ 9V δ 2, afin d'évaluer la pertinence de ce récepteur dans la discrimination des populations naturellement réactives ou

non. Il serait également judicieux d'inclure certains composants du micro-environnement tumoral tels que l'hypoxie, dans l'analyse de la réactivité des LT V γ 9V δ 2 vis-à-vis des cultures primaires de GBM. De plus, la poursuite de la caractérisation de ces clones, par phénotypage de surface et séquençage, pourrait conduire à l'identification de marqueurs spécifiques, qui permettraient de cibler des populations T V γ 9V δ 2 « efficaces ». Par ailleurs, il n'est pas exclu que d'autres récepteurs tels que les « points de contrôle » ou *checkpoint* inhibiteurs (PD-1 et/ou CTLA-4) puissent être impliqués dans l'hétérogénéité des effecteurs. Il serait donc intéressant de poursuivre le phénotypage en élargissant le panel de marqueurs testés, tout en continuant le criblage de nouvelles populations T V γ 9V δ 2. Les donneurs à partir desquels sont issus les LT V γ 9V δ 2 naturellement réactifs pourraient également être rappelés afin d'évaluer la présence et la conservation de ces populations effectrices dans le temps.

Contrairement aux lignées cellulaires tumorales, la pertinence de notre modèle réside notamment dans le fait que les cultures primaires de GBM sont hétérogènes, expriment un large panel de marqueurs de cellules souche et suggérent la présence de cellules souches cancéreuses (ou CSC) (**Partie 1A**). Nous avons mis en évidence que l'implantation intracrânienne de ces cellules chez la souris NSG n'altère en rien leurs signatures moléculaires et métaboliques (données non montrées), et conduit au développement de modèles précliniques hétérogènes et infiltrants, représentatifs des GBM chez l'homme (**Partie 1B**). De plus, les CSC ont été décrites comme étant résistantes aux traitements standards et responsables de la récidive tumorale (Singh et al. 2004; Bao et al. 2006). Les cultures primaires figurent donc parmi les modèles cellulaires tumoraux les plus pertinents et les plus représentatifs de la physiopathologie du GBM.

Nous avons mis en évidence que les cultures MES sont naturellement et sélectivement mieux reconnues et éliminées par les LT V γ 9V δ 2 que les CNP (**Partie 1A & 3A**). Cette observation est en accord avec la littérature puisqu'il a été montré que malgré une signature moléculaire immunosuppressive des tumeurs de GBM, le sous-type MES est génétiquement fortement enrichi en gènes impliqués dans les réponses pro-inflammatoires et correspondrait donc aux tumeurs les plus immunogènes (Doucette et al. 2013). De plus, nous avons rapporté des résultats similaires suite à la ré-analyse transcriptomique de nos cultures primaires de GBM du point de vue immunologique (**Partie 4A**). Il a été décrit chez les patients porteurs de tumeurs MES, une efficacité accrue de la vaccination (DCVax-L) basée sur l'utilisation de cellules dendritiques autologues (Prins et al. 2011). Enfin, le

ciblage efficace des tumeurs MES par les LT V γ 9V δ 2 présente un avantage. Diverses études tenant compte de l'âge au diagnostic, de la réponse aux traitements et du pronostic, ont montré que ces tumeurs sont les plus agressives et les plus résistantes aux traitements standards (Phillips et al. 2006 ; Verhaak et al. 2010). Bien que cette classification reste à nuancer en raison de l'existence d'une hétérogénéité moléculaire intra-tumorale (Sottoriva et al. 2013), il est intéressant de noter que des modifications des profils génétiques tumoraux en faveur d'une signature MES ont été décrites lors de l'acquisition du phénotype de résistance aux traitements. Halliday et al. ont notamment rapporté un changement du sous-type proneural vers le sous-type MES faisant suite à l'irradiation (Halliday et al. 2014). Ainsi, l'éligibilité à l'immunothérapie cellulaire T V γ 9V δ 2 concernerait non seulement les 30% des patients porteurs de tumeurs MES, les plus résistantes et agressives (Phillips et al. 2006; Verhaak et al. 2010), mais également des tumeurs initialement de signature moléculaire CNP qui auraient changé de profil suite à une première ligne de traitements standards (TMZ et irradiation).

Par ailleurs, nous avons cherché à optimiser la réactivité des LT V γ 9V δ 2 vis-à-vis des cultures primaires de GBM, à la fois *in vitro* et *in vivo*. Nous avons montré qu'un préconditonnement à l'IL-21 permet une élimination efficace d'une culture primaire MES, via la potentialisation de la cytotoxicité naturelle des effecteurs (**Partie 3C**). Nous nous sommes également intéressés au zolédronate, un ABP déjà utilisé en clinique (Zometa[®], Novartis), qui est internalisé par pinocytose dans les cellules tumorales, induisant l'accumulation de pAg du Soi et leur reconnaissance par les LT V γ 9V δ 2 (Gober et al. 2003). Nous avons mis en évidence la capacité de ces lymphocytes à éliminer efficacement les cellules cancéreuses résiduelles, en présence de zolédronate dans différents modèles précliniques de GBM. L'éradication de la tumeur a été observée non seulement avec la lignée cellulaire U-87MG, mais également avec les cultures primaires GBM-10 et GBM-1, qui présentent respectivement des profils CNP et MES (**Partie 2 & 3C**).

Bien que la toxicité du zolédronate sur le parenchyme cérébral sain n'ait pas encore été évaluée, nous avons récemment eu accès à des échantillons sains de cortex et de substance blanche humains, gracieusement fournis par Pr David Laplaud (CHU, Nantes, France), sur lesquels nous avons pu analyser l'effet d'un prétraitement au zolédronate. De façon très intéressante, aucune réactivité des LT V γ 9V δ 2 n'a été observée après sensibilisation ou non des cellules cérébrales saines (données non montrées). Ces résultats encourageants ouvrent de nouvelles perspectives quant à la combinaison des LT V γ 9V δ 2 et du zolédronate dans le traitement du GBM permettant d'envisager la mise en place d'un traitement chez le patient. De plus, cette association permettrait d'éliminer les tumeurs de GBM indépendamment de leurs sous-types moléculaires, rendant éligible à cette thérapie l'ensemble de patients atteints de GBM.

La recherche de nouvelles stratégies constitue un enjeu thérapeutique majeur pour les patients atteints de GBM. Actuellement dans le monde, 1198 essais cliniques ont été mis en place, dont 6% seulement concernent des immunothérapies qui suscitent néanmoins un intérêt grandissant (www.clinicaltrials.gov). Bien que la vaccination peptidique (Rampling et al. 2016) et le transfert de cellules dendritiques autologues (Prins et al. 2011; Doucette et al. 2013) aient conduit à l'obtention de résultats prometteurs, les patients atteints de GBM sont le plus souvent diagnostiqués tardivement avec une altération rapide de leur état général. Or l'efficacité de ces immunothérapies actives dépend entièrement de l'activation du SI des patients, dont la détérioration est directement liée aux traitements génotoxiques conventionnels, notamment responsables de lymphopénies (Reni et al. 2017). L'immunothérapie cellulaire passive par transfert adoptif prend alors tout son sens, puisqu'elle permettrait, indépendamment du SI des patients, de cibler spécifiquement les cellules tumorales résiduelles responsables de la récidive du GBM. De plus, les cellules immunitaires effectrices présentent une meilleure diffusion et persistance que les anticorps monoclonaux dans le micro-environnement tumoral (Calinescu et al. 2015). Toutefois, si ils sont administrés par voie systémique, la biodisponibilité des effecteurs immunitaires au niveau du site tumoral reste limitée notamment du fait de l'inclusion du cerveau dans la BHE. Diverses voies d'administrations sont donc envisagées, et il a été récemment démontré la faisabilité et la bonne tolérance d'infusions intracrâniennes de lymphocytes T CAR directement dans la zone péri-tumorale chez les patients (Brown et al. 2016). L'utilisation de voies d'administration telles que l'infusion orthotopique d'effecteurs immunitaires permettrait non seulement de s'affranchir de la BHE, mais également de favoriser leurs activités biologiques au niveau du site tumoral.

Au cours de ces travaux de thèse, nous avons évalué la faisabilité du transfert adoptif de LT V γ 9V δ 2 allogéniques dans le cas du GBM, donnant lieu à des résultats très encourageants aussi bien en terme de faisabilité, de toxicité que d'efficacité. Nous avons démontré la capacité de ces lymphocytes à patrouiller dans le parenchyme cérébral et à éliminer les cellules cancéreuses résiduelles dans divers modèles préclinique de GBM. De plus, les LT V γ 9V δ 2 présentent un intérêt majeur du fait de leur absence d'alloréactivité, permettant d'envisager le développement de banques cellulaires allogéniques générées à partir de donneurs sains et pouvant être administrées à divers patients. Le protocole clinique hypothétique serait d'administrer en intracrânien, un nombre important d'effecteurs immunitaires immédiatement après la résection tumorale, en première ou seconde ligne de traitement, soit respectivement avant ou après les cycles de radio/chimiothérapies, afin d'éviter d'endommager les cellules immunitaires nouvellement infusées. Il sera d'abord nécessaire d'identifier les donneurs sains d'intérêt à partir desquels les LT V γ 9V δ 2 allogéniques seront spécifiquement amplifiés, afin de constituer des banques cellulaires « efficaces » au grade GMP. Ensuite, les patients receveurs pourront être sélectionnés sur la base (i) de leur état général, dans le cas d'un traitement combiné avec le zolédronate, ou (ii) de leurs profil moléculaire tumoral MES, dans le cas d'administrations de LT V γ 9V δ 2 seuls. Les cellules effectrices peuvent être congelées puis stockées avant d'être administrés aux patients par voie intracrânienne, directement au niveau de la zone péritumorale (**Figure 32**).



Figure 32 : Protocole clinique hypothétique basé sur le transfert adoptif de LT $V\gamma 9V\delta 2$ allogéniques dans le cas du traitement de patients atteints de GBM. Les PBMC d'un donneur sain (A) sont récupérés, analysés par cytométrie en flux afin d'accéder à leur proportion en LT $V\gamma 9V\delta 2$ préiphériques, et spécifiquement amplifiés au grade GMP en présence de faibles concentrations en IL-2, de zolédronate ou de BrHPP. Après 4 jours, de l'IL-2 est rajouté, puis les cellules sont amplifiées jusqu'à atteindre leur phase de repos (environ 21 jours) puis congelées. Elles pourront ensuite être injectées au patient (B) en combinaison ou non avec du zolédronte.

Afin d'optimiser la thérapie, le choix des donneurs sains de LT V γ 9V δ 2 pourrait être orienté vers des individus possédant les haplotypes CMH les plus répandus afin de limiter les rejets et d'augmenter les chances de survie des cellules effectrices injectées. Une étape de tri cellulaire pourrait également être envisagée dans le but d'injecter aux patients des populations T V γ 9V δ 2 extrêmement pures. De plus, en l'absence de zolédronate, un préconditionnement des LT V γ 9V δ 2 à l'IL-21 permettrait de potentialiser la cytotoxicité naturelle vis-à-vis des cellules tumorales de GBM. Enfin, l'association avec des traitements ciblant le micro-environnement tumoral immunosuppresseur pourrait être envisagée. Des anticorps anti-angiogéniques (anti-VEGF) ou immunomodulateurs (anti-PD-1, anti-PDL-1, anti-CTLA-4) mais également d'autres types de molécules telles que les inhibiteurs du métabolisme immunosuppresseur (anti-IDO, anti-arginase) pourraient tout à fait être combinés aux cellules injectées et représentent un choix attrayant.

La recherche de nouvelles stratégies thérapeutiques représente un enjeu majeur pour la prise en charge des patients atteints de GBM. Dans le cadre de ce projet de thèse collaboratif, situé à l'interface entre l'Immunologie et la Cancérologie, nous nous sommes intéressés à une immunothérapie cellulaire, basée sur le transfert adoptif de lymphocytes T V γ 9V δ 2 allogéniques. Nos résultats mettent en exergue, à la fois *in vitro* et *in vivo*, la capacité de ces effecteurs immunitaires à détruire les cellules cancéreuses de GBM. Cette preuve de concept préclinique constitue un premier pas vers de nouveaux outils immunothérapeutiques qui pourraient jouer un rôle crucial dans la lutte contre le GBM.

Bien que de nombreuses interrogations restent en suspens, ce projet de thèse ouvre la voie vers le transfert clinique et la médecine personnalisée. A terme, l'immunothérapie cellulaire pourrait constituer une option attractive pour le ciblage et l'élimination spécifique des cellules tumorales résiduelles impliquées dans la récidive locale et inéluctable du GBM.

Références bibliographiques

Abe, Yu, Masato Muto, Mie Nieda, Yasunori Nakagawa, Andrew Nicol, Touru Kaneko, Shigenori Goto, Kiyoshi Yokokawa, et 2009. Kenshi Suzuki. « Clinical and Immunological Evaluation of Zoledronate-Activated Vgamma9gammadelta T-Cell-Based Immunotherapy for Patients with Myeloma ». Experimental Multiple Hematology 37 (8): 956-68. doi:10.1016/j.exphem.2009.04.008.

Abou-Antoun, Tamara J., James S. Hale, Justin D. Lathia, et Stephen M. Dombrowski. 2017. «Brain Cancer Stem Cells in Adults and Children: Cell Biology and Therapeutic Implications». *Neurotherapeutics: The Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics* 14 (2): 372-84. doi:10.1007/s13311-017-0524-0.

Acker, Till, et Karl H. Plate. 2004. « Hypoxia and Hypoxia Inducible Factors (HIF) as Important Regulators of Tumor Physiology ». *Cancer Treatment and Research* 117: 219-48.

Adams, Erin J., Siyi Gu, et Adrienne M. Luoma. 2015. «Human Gamma Delta T Cells: Evolution and Ligand Recognition». *Cellular Immunology* 296 (1): 31-40. doi:10.1016/j.cellimm.2015.04.008.

Al-Hajj, Muhammad, Max S. Wicha, Adalberto Benito-Hernandez, Sean J. Morrison, et Michael F. Clarke. 2003. « Prospective Identification of Tumorigenic Breast Cancer Cells ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100 (7): 3983-88. doi:10.1073/pnas.0530291100.

Angelini, Daniela F., Giovanna Borsellino, Mary Poupot, Adamo Diamantini, Rémy Poupot, Giorgio Bernardi, Fabrizio Poccia, Jean-Jacques Fournié, et Luca Battistini. 2004. «FcgammaRIII Discriminates between 2 Subsets of Vgamma9Vdelta2 Effector Cells with Different Responses and Activation Pathways ». *Blood* 104 (6): 1801-7. doi:10.1182/blood-2004-01-0331.

Aspelund, Aleksanteri, Salli Antila, Steven T. Proulx, Tine Veronica Karlsen, Sinem Karaman, Michael Detmar, Helge Wiig, et Kari Alitalo. 2015. «A dural lymphatic vascular system that drains brain interstitial fluid and macromolecules ». *The Journal of Experimental Medicine* 212 (7): 991-99. doi:10.1084/jem.20142290.

Bao, Shideng, Qiulian Wu, Roger E. McLendon, Yueling Hao, Qing Shi, Anita B. Hjelmeland, Mark W. Dewhirst, Darell D. Bigner, et Jeremy N. Rich. 2006. «Glioma Stem Cells Promote Radioresistance by Preferential Activation of the DNA Damage Response ». *Nature* 444 (7120): 756-60. doi:10.1038/nature05236.

Bapat, Sharmila A., Avinash M. Mali, Chaitanyananda B. Koppikar, et Nawneet K. Kurrey. 2005. «Stem and Progenitor-like Cells Contribute to the Aggressive Behavior of Human Epithelial Ovarian Cancer». *Cancer Research* 65 (8): 3025-29. doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-3931.

Batra, S. K., S. Castelino-Prabhu, C. J. Wikstrand, X. Zhu, P. A. Humphrey, H. S. Friedman, et D. D. Bigner. 1995. « Epidermal Ligand-Independent, Growth Factor Unregulated, Cell-Transforming Potential of a Naturally Occurring Human Mutant EGFRvIII Gene ». Cell Growth k Differentiation: Molecular The Biology Journal of the American Association for Cancer Research 6 (10): 1251-59.

Beauvillain, Celine, Sabrina Donnou, Ulrich Jarry, Mari Scotet, Hugues Gascan, Yves Delneste, Pierre Guermonprez, Pascale Jeannin, et Dominique Couez. 2008. « Neonatal and Adult Microglia Cross-Present Exogenous Antigens ». *Glia* 56 (1): 69-77. doi:10.1002/glia.20565.

Bennouna, Jaafar, Emmanuelle Bompas, Eve Marie Neidhardt, Frédéric Rolland, Irène Philip, Céline Galéa, Samuel Salot, et al. Study 2008. « Phase-I of Innacell Gammadelta, an Autologous Cell-Therapy Product Highly Enriched in Gamma9delta2 T Lymphocytes, in Combination with IL-2, in Patients Metastatic with Renal Cell Carcinoma ». Cancer Immunology. Immunotherapy: CII 57 (11): 1599-1609. doi:10.1007/s00262-008-0491-8.

Bialasiewicz, A. A., J. X. Ma, et G. Richard. 1999. «Alpha/Beta- and Gamma/Delta TCR(+) Lymphocyte Infiltration in Necrotising Choroidal Melanomas ». *The British Journal of Ophthalmology* 83 (9): 1069-73.

Bonneville, Marc, Rebecca L. O'Brien, et Willi K. Born. 2010. «Gammadelta T Cell Effector Functions: A Blend of Innate Programming and Acquired Plasticity». *Nature Reviews. Immunology* 10 (7): 467-78. doi:10.1038/nri2781.

Bonneville, Marc, et Emmanuel Scotet. 2006. « Human Vgamma9Vdelta2 T Cells: Promising New Leads for Immunotherapy of Infections and Tumors ». *Current Opinion in Immunology* 18 (5): 539-46. doi:10.1016/j.coi.2006.07.002.

Brandes, Marlène, Katharina Willimann, et Bernhard Moser. 2005. «Professional Antigen-Presentation Function by Human Gammadelta T Cells ». *Science (New York, N.Y.)* 309 (5732): 264-68. doi:10.1126/science.1110267.

Brooks, W. H., W. R. Markesbery, G. D. Gupta, et T. L. Roszman. 1978. « Relationship of Lymphocyte Invasion and Survival of Brain Tumor Patients ». *Annals of Neurology* 4 (3): 219-24. doi:10.1002/ana.410040305.

Brown, Christine E., Darya Alizadeh, Renate Starr, Lihong Weng, Jamie R. Wagner, Araceli Naranjo, Julie R. Ostberg, et al. 2016. « Regression of Glioblastoma after Chimeric Antigen Receptor T-Cell Therapy ». *The New England Journal of Medicine* 375 (26): 2561-69. doi:10.1056/NEJMoa1610497.

Brown, Christine E., Behnam Badie, Michael E. Barish, Lihong Weng, Julie R. Ostberg, Wen-Chung Chang, Araceli Naranjo, et al. 2015. «Bioactivity and Safety of IL13Rα2-Redirected Chimeric Antigen Receptor CD8+ Т Cells in Patients with Recurrent Glioblastoma». Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research 21 (18): 4062-72. doi:10.1158/1078-0432.CCR-15-0428.

Bryant, Nichole L., Catalina Suarez-Cuervo, G. Yancey Gillespie, James M. Markert, L. Burt Nabors, Sreelatha Meleth, Richard D. Lopez, et Lawrence S. Lamb. 2009. « Characterization and Immunotherapeutic Potential of Gammadelta T-Cells in Patients with Glioblastoma ». *Neuro-Oncology* 11 (4): 357-67. doi:10.1215/15228517-2008-111.

Buccheri, S., G. Guggino, N. Caccamo, P. Li Donni, et F. Dieli. 2014. « Efficacy and Safety of $\Gamma\delta T$ Cell-Based Tumor Immunotherapy: A Meta-Analysis ». Journal of Biological Regulators and Homeostatic Agents 28 (1): 81-90.

Bukowski, J. F., C. T. Morita, et M. B. Brenner. 1999. «Human Gamma Delta T Cells Recognize Alkylamines Derived from Microbes, Edible Plants, and Tea: Implications for Innate Immunity ». *Immunity* 11 (1): 57-65.

Bunse, Lukas, Theresa Schumacher, Felix Sahm, Stefan Pusch, Iris Oezen, Katharina Rauschenbach, Marina Gonzalez, et al. 2015. « Proximity Ligation Assay Evaluates IDH1R132H Presentation in Gliomas ». *The Journal of Clinical Investigation* 125 (2): 593-606. doi:10.1172/JCI77780.

Burg, Sjoerd H. van der, Ramon Arens, Ferry Ossendorp, Thorbald van Hall, et Cornelis J. M. Melief. 2016. «Vaccines for Established Cancer: Overcoming the Challenges Posed by Immune Evasion ». *Nature Reviews Cancer* 16 (4): 219-33. doi:10.1038/nrc.2016.16.

Burnet, Macfarlane. 1957. « Cancer—A Biological Approach ». *British Medical Journal* 1 (5023): 841-47.

Burton, Alison L., Brent A. Roach, Michael P. Mays, Andrea F. Chen, Brooke A. R. Ginter, Abbey M. Vierling, Charles R. Scoggins, et al. 2011. « Prognostic Significance of Tumor Infiltrating Lymphocytes in Melanoma ». *The American Surgeon* 77 (2): 188-92.

Bush, Nancy Ann Oberheim, et Nicholas Butowski. 2017. «The Effect of Molecular Diagnostics on the Treatment of Glioma». *Current Oncology Reports* 19 (4): 26. doi:10.1007/s11912-017-0585-6.

Caccamo, Nadia, Luca Battistini, Marc Bonneville, Fabrizio Poccia, Jean Jacques Fournié, Serena Meraviglia, Giovanna Borsellino, et al. 2006. « CXCR5 Identifies a Subset of Vgamma9Vdelta2 T Cells Which Secrete IL-4 and IL-10 and Help B Cells for Antibody Production ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 177 (8): 5290-95.

Calinescu, Anda-Alexandra, Neha Kamran, Gregory Baker, Yohei Mineharu, Pedro Ricardo Lowenstein, et Maria Graciela Castro. 2015. «Overview of Current Immunotherapeutic Strategies for Glioma». *Immunotherapy* 7 (10): 1073-1104. doi:10.2217/imt.15.75.

Castella, Barbara, Joanna Kopecka, Patrizia Sciancalepore, Giorgia Mandili, Myriam Foglietta, Nico Mitro, Donatella Caruso, Francesco Novelli, Chiara Riganti, et Massimo Massaia. 2017. « The ATP-Binding Cassette Transporter A1 Regulates Phosphoantigen Release and Vy9V82 T Cell Activation by Dendritic Cells ». Nature *Communications* (juin): 15663. 8 doi:10.1038/ncomms15663.

Chaichana, Kaisorn L., Ignacio Jusue-Torres, Rodrigo Navarro-Ramirez, Shaan M. Raza, Maria Pascual-Gallego, Aly Ibrahim, Marta Hernandez-Hermann, et al. 2014. « Establishing Percent Resection and Residual Volume Thresholds Affecting Survival and Recurrence for Patients with Newly Diagnosed Intracranial Glioblastoma ». Neuro-Oncology 113-22. 16 (1): doi:10.1093/neuonc/not137.

Chien, Yueh-hsiu, et Yves Konigshofer. 2007. « Antigen Recognition by Gammadelta T Cells ». *Immunological Reviews* 215 (février): 46-58. doi:10.1111/j.1600-065X.2006.00470.x.

Chinen, Takatoshi, Arun K. Kannan, Andrew G. Levine, Xiying Fan, Ulf Klein, Ye Zheng, Georg Gasteiger, Yongqiang Feng, Jason D. Fontenot, et Alexander Y. Rudensky. 2016. « An Essential Role for the IL-2 Receptor in Treg Cell Function ». *Nature Immunology* 17 (11): 1322-33. doi:10.1038/ni.3540.

Chiocca, E. Antonio, et Samuel D. Rabkin. 2014. «Oncolytic Viruses and Their Application to Cancer Immunotherapy». *Cancer Immunology Research* 2 (4): 295-300. doi:10.1158/2326-6066.CIR-140015.

Chitadze, Guranda, Marcus Lettau, Stefanie Luecke, Ting Wang, Ottmar Janssen, Daniel Fürst, Joannis Mytilineos, et al. 2016. «NKG2D- and T-Cell Receptor-Dependent Lysis of Malignant Glioma Cell Lines by Human Γδ Т Modulation Cells: by Temozolomide and Disintegrin and Α Metalloproteases 10 and 17 Inhibitors». Oncoimmunology (4): e1093276. 5 doi:10.1080/2162402X.2015.1093276.

Codrici, Elena, Ana-Maria Enciu, Ionela-Daniela Popescu, Simona Mihai, et Cristiana Tanase. 2016. « Glioma Stem Cells and Their Microenvironments: Providers of Challenging Therapeutic Targets ». *Stem Cells International* 2016. doi:10.1155/2016/5728438.

Conti, Lucia, Rita Casetti, Marco Cardone, Barbara Varano, Angelo Martino, Filippo Belardelli, Fabrizio Poccia, et Sandra Gessani. 2005. «Reciprocal Activating Interaction between Dendritic Cells and Pamidronate-Stimulated Gammadelta T Cells: Role of CD86 and Inflammatory Cytokines ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 174 (1): 252-60.

Coppens, Isabelle. 2013. «Targeting Lipid Biosynthesis and Salvage in Apicomplexan Parasites for Improved Chemotherapies ». *Nature Reviews. Microbiology* 11 (12): 823-35. doi:10.1038/nrmicro3139.

Cordova, Adriana, Francesca Toia, Carmela La Mendola, Valentina Orlando, Serena Meraviglia, Gaetana Rinaldi, Matilde Todaro, et al. 2012. « Characterization of Human $\Gamma\delta$ T Lymphocytes Infiltrating Primary Malignant Melanomas ». *PloS One* 7 (11): e49878. doi:10.1371/journal.pone.0049878.

Corvaisier, Murielle, Agnès Moreau-Aubry, Elisabeth Diez, Jaafar Bennouna, Jean-Francois Mosnier, Emmanuel Scotet, Marc Bonneville, et Francine Jotereau. 2005. « V Gamma 9V Delta 2 T Cell Response to Colon Carcinoma Cells ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 175 (8): 5481-88.

Coureau, Gaëlle, Ghislaine Bouvier, Pierre Lebailly, Pascale Fabbro-Peray, Anne Gruber, Karen Leffondre, Jean-Sebastien Guillamo, et al. 2014. « Mobile Phone Use and Brain Tumours in the CERENAT Case-Control Study ». *Occupational and Environmental Medicine* 71 (7): 514-22. doi:10.1136/oemed-2013-101754.

Crane, Courtney A., Brian J. Ahn, Seunggu J. Han, et Andrew T. Parsa. 2012. « Soluble Factors Secreted by Glioblastoma Cell Lines Recruitment, Facilitate Survival, and Expansion of Regulatory Т Cells: Implications for Immunotherapy ». Neuro-Oncology 14 584-95. (5): doi:10.1093/neuonc/nos014.

Das, H., L. Wang, A. Kamath, et J. F. Bukowski. 2001. «Vgamma2Vdelta2 T-Cell Receptor-Mediated Recognition of Aminobisphosphonates ». *Blood* 98 (5): 1616-18.

Debinski, W., D. M. Gibo, S. W. Hulet, J. R. Connor, et G. Y. Gillespie. 1999. «Receptor for Interleukin 13 Is a Marker and Therapeutic Target for Human High-Grade Gliomas». *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 5 (5): 985-90.

Devilder, Marie-Claire, Sophie Allain, Christelle Dousset, Marc Bonneville, et Emmanuel Scotet. 2009. « Early Triggering of Exclusive IFN-Gamma Responses of Human Vgamma9Vdelta2 T Cells by TLR-Activated Myeloid and Plasmacytoid Dendritic Cells ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 183 (6): 3625-33. doi:10.4049/jimmunol.0901571.

Devilder, Marie-Claire, Sophie Maillet, Isabelle Bouyge-Moreau, Emmanuel Donnadieu, Marc Bonneville, et Emmanuel Scotet. 2006. «Potentiation of Antigen-Stimulated V Gamma 9V Delta 2 T Cell Cytokine Production by Immature Dendritic Cells (DC) and Reciprocal Effect on DC Maturation». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 176 (3): 1386-93.

Dhupkar, Pooja, et Nancy Gordon. 2017. « Interleukin-2: Old and New Approaches to Enhance Immune-Therapeutic Efficacy ». *Advances in Experimental Medicine and Biology* 995: 33-51. doi:10.1007/978-3-31953156-4_2.

Dieli, F., M. Troye-Blomberg, J. Ivanyi, J. J. Fournié, A. M. Krensky, M. Bonneville, M. A. Peyrat, N. Caccamo, G. Sireci, et A. Salerno. 2001. «Granulysin-Dependent Killing of Intracellular and Extracellular Mycobacterium Tuberculosis by Vgamma9/Vdelta2 T Lymphocytes ». *The Journal of Infectious Diseases* 184 (8): 1082-85. doi:10.1086/323600.

Dieli, Francesco, David Vermijlen, Fabio Fulfaro, Nadia Caccamo, Serena Meraviglia, Giuseppe Cicero, Andrew Roberts, et al. 2007. «Targeting Human {gamma}delta} T Cells with Zoledronate and Interleukin-2 for Immunotherapy of Hormone-Refractory Prostate Cancer ». *Cancer Research* 67 (15): 7450-57. doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-0199.

Dighe, Anand S., Elizabeth Richards, Lloyd J. Old, et Robert D. Schreiber. 1994. « Enhanced in vivo growth and resistance to rejection of tumor cells expressing dominant negative IFN γ receptors ». *Immunity* 1 (6): 447-56. doi:10.1016/1074-7613(94)90087-6.

Dillman, Robert O. 2011. « Cancer Immunotherapy ». *Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals* 26 (1): 1-64. doi:10.1089/cbr.2010.0902.

Dillman, Robert Owen, Christopher Michael Duma, Robin Anne Ellis, Andrew Nimitz Cornforth, Patric Michael Schiltz, Shari Lynn Sharp, et Madeline Carol Depriest. 2009. « Intralesional Lymphokine-Activated Killer Cells as Adjuvant Therapy for Primary Glioblastoma ». *Journal of Immunotherapy* 32 (9): 914-19.

doi:10.1097/CJI.0b013e3181b2910f.

Dimova, Tanya, Margreet Brouwer, Françoise Gosselin, Joël Tassignon, Oberdan Leo, Catherine Donner, Arnaud Marchant, et David Vermijlen. 2015. « Effector V γ 9V δ 2 T Cells Dominate the Human Fetal $\Gamma\delta$ T-Cell Repertoire ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112 (6): E556-565. doi:10.1073/pnas.1412058112.

Dörries, R. 2001. «The Role of T-Cell-

Mediated Mechanisms in Virus Infections of the Nervous System ». *Current Topics in Microbiology and Immunology* 253: 219-45.

Doucette, Tiffany, Ganesh Rao, Arvind Rao, Li Shen, Kenneth Aldape, Jun Wei, Kristine Dziurzynski, Mark Gilbert, et Amy B. Heimberger. 2013. «Immune Heterogeneity of Glioblastoma Subtypes: Extrapolation from the Cancer Genome Atlas ». *Cancer Immunology Research* 1 (2): 112-22. doi:10.1158/2326-6066.CIR-13-0028.

Dranoff, Glenn. 2004. « Cytokines in Cancer Pathogenesis and Cancer Therapy ». *Nature Reviews Cancer* 4 (1): 11-22. doi:10.1038/nrc1252.

Dudley, E. C., M. Girardi, M. J. Owen, et A. C. Hayday. 1995. « Alpha Beta and Gamma Delta T Cells Can Share a Late Common Precursor ». *Current Biology: CB* 5 (6): 659-69.

Dunn, Gavin P., Allen T. Bruce, Hiroaki Ikeda, Lloyd J. Old, et Robert D. Schreiber. 2002. «Cancer Immunoediting: From Immunosurveillance to Tumor Escape». *Nature Immunology* 3 (11): 991-98. doi:10.1038/ni1102-991.

Dunn, Gavin P., Ian F. Dunn, et William T. Curry. 2007. «Focus on TILs: Prognostic Significance of Tumor Infiltrating Lymphocytes in Human Glioma». *Cancer Immunity* 7 (août): 12.

Dunn, Gavin P., Lloyd J. Old, et Robert D. Schreiber. 2004. « The Three Es of Cancer Immunoediting ». *Annual Review of Immunology* 22: 329-60. doi:10.1146/annurev.immunol.22.012703.104 803.

Dunn-Pirio, Anastasie M., et Gordana Vlahovic. 2017. «Immunotherapy Approaches in the Treatment of Malignant Brain Tumors ». *Cancer* 123 (5): 734-50. doi:10.1002/cncr.30371.

Dutoit, Valérie, Christel Herold-Mende, Norbert Hilf, Oliver Schoor, Philipp Beckhove, Judith Bucher, Katharina Dorsch, et al. 2012. «Exploiting the Glioblastoma Peptidome to Discover Novel TumourAssociated Antigens for Immunotherapy ». Brain: A Journal of Neurology 135 (Pt 4): 1042-54. doi:10.1093/brain/aws042.

Ehrlich, Paul. 1909. « Über den jetzigen Stand der Karzinomforschung ». *Ned Tijdschr Geneeskd*.

Ellis, Hayley P., Mark Greenslade, Ben Powell, Inmaculada Spiteri, Andrea Sottoriva, et Kathreena M. Kurian. 2015. «Current Challenges in Glioblastoma: Intratumour Heterogeneity, Residual Disease, and Models to Predict Disease Recurrence ». *Frontiers in Oncology* 5: 251. doi:10.3389/fonc.2015.00251.

Espinosa, E., C. Belmant, F. Pont, B. Luciani, R. Poupot, F. Romagné, H. Brailly, M. Bonneville, et J. J. Fournié. 2001. « Chemical Synthesis and Biological Activity of Bromohydrin Pyrophosphate, a Potent Stimulator of Human Gamma Delta T Cells ». *The Journal of Biological Chemistry* 276 (21): 18337-44. doi:10.1074/jbc.M100495200.

Evans, P. S., P. J. Enders, C. Yin, T. J. Ruckwardt, M. Malkovsky, et C. D. Pauza. 2001. «In Vitro Stimulation with a Non-Peptidic Alkylphosphate Expands Cells Expressing Vgamma2-Jgamma1.2/Vdelta2 T-Cell Receptors ». *Immunology* 104 (1): 19-27.

Fecci, Peter E., Duane A. Mitchell, John F. Whitesides, Weihua Xie, Allan H. Friedman, Gary E. Archer, James E. Herndon, Darell D. Bigner, Glenn Dranoff, et John H. Sampson. 2006. « Increased Regulatory T-Cell Fraction amidst a Diminished CD4 Compartment Explains Cellular Immune Defects in Patients with Malignant Glioma ». *Cancer Research* 66 (6): 3294-3302. doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-3773.

Fesnak, Andrew D., Carl H. June, et Bruce L. Levine. 2016. «Engineered T Cells: The Promise and Challenges of Cancer Immunotherapy ». *Nature Reviews Cancer* 16 (9): 566-81. doi:10.1038/nrc.2016.97.

Figarella-Branger, D., C. Colin, A. Tchoghandjian, N. Baeza, et C. Bouvier. 2010. «[Glioblastomas: gliomagenesis, genetics, angiogenesis, and microenvironment] ». *Neuro-Chirurgie* 56 (6): 441-48. doi:10.1016/j.neuchi.2010.07.010.

Fischer, Hans-Georg, Ursula Bonifas, et Gaby Reichmann. 2000. « Phenotype and Functions of Brain Dendritic Cells Emerging During Chronic Infection of Mice with Toxoplasma Gondii ». *The Journal of Immunology* 164 (9): 4826-34. doi:10.4049/jimmunol.164.9.4826.

Fousek, Kristen, et Nabil Ahmed. 2015. « The Evolution of T-Cell Therapies for Solid Malignancies ». *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 21 (15): 3384-92. doi:10.1158/1078-0432.CCR-14-2675.

Friese. Manuel A., Jörg Wischhusen. Wolfgang Wick, Markus Weiler, Günter Eisele, Alexander Steinle, et Michael Weller. 2004. « RNA Interference Targeting Transforming Growth Factor-Beta Enhances NKG2D-Mediated Antiglioma Immune Response, Inhibits Glioma Cell Migration and Invasiveness, and Abrogates Tumorigenicity in Vivo». Cancer Research 64 (20): 7596-7603. doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-1627.

Galluzzi, Lorenzo, Erika Vacchelli, José-Manuel Bravo-San Pedro, Aitziber Buqué, Laura Senovilla, Elisa Elena Baracco, Norma Bloy, et al. 2014. « Classification of Current Anticancer Immunotherapies ». *Oncotarget* 5 (24): 12472-508. doi:10.18632/oncotarget.2998.

Galon, Jérôme, Anne Costes, Fatima Sanchez-Cabo, Amos Kirilovsky, Bernhard Mlecnik, Christine Lagorce-Pagès, Marie Tosolini, et al. 2006. « Type, Density, and Location of Immune Cells within Human Colorectal Tumors Predict Clinical Outcome ». *Science (New York, N.Y.)* 313 (5795): 1960-64. doi:10.1126/science.1129139.

Garden, Gwenn A., et Thomas Möller. 2006. « Microglia Biology in Health and Disease ». *Journal of Neuroimmune Pharmacology: The Official Journal of the Society on NeuroImmune Pharmacology* 1 (2): 127-37. doi:10.1007/s11481-006-9015-5. Gentles, Andrew J., Aaron M. Newman, Chih Long Liu, Scott V. Bratman, Weiguo Feng, Dongkyoon Kim, Viswam S. Nair, et al. 2015. «The Prognostic Landscape of Genes and Infiltrating Immune Cells across Human Cancers ». *Nature Medicine* 21 (8): 938-45. doi:10.1038/nm.3909.

Gober, Hans-Jürgen, Magdalena Kistowska, Lena Angman, Paul Jenö, Lucia Mori, et Gennaro De Libero. 2003. «Human T Cell Receptor Gammadelta Cells Recognize Endogenous Mevalonate Metabolites in Tumor Cells ». *The Journal of Experimental Medicine* 197 (2): 163-68.

Gotwals, Philip, Scott Cameron, Daniela Cipolletta, Viviana Cremasco, Adam Crystal, Becker Hewes, Britta Mueller, et al. 2017. « Prospects for Combining Targeted and Conventional Cancer Therapy with Immunotherapy ». *Nature Reviews Cancer* 17 (5): 286-301. doi:10.1038/nrc.2017.17.

Cordula, Suzanne van Gründer. Dorp, Esther Samantha Trudy Hol. Drent. Straetemans, Sabine Heijhuurs, Kirsten Scholten, et al. 2012. « Γ 9 and Δ 2CDR3 Domains Regulate Functional Avidity of T Cells Harboring Γ9δ2TCRs ». Blood 120 (26): doi:10.1182/blood-2012-05-5153-62. 432427.

Gustafsson, Karin, Katarina Junevik, Olle Werlenius, Sandra Holmgren, Alex Karlsson-Parra, et Per-Ola Andersson. 2011. « Tumour-Loaded a-Type 1-Polarized Dendritic Cells from Patients with Chronic Lymphocytic Leukaemia Produce a Superior NK-, NKTand CD8+ T Cell-Attracting Chemokine Profile ». Scandinavian Journal of (3): 318-26. Immunology 74 doi:10.1111/j.1365-3083.2011.02580.x.

Halani, Sameer H., Ranjith Babu, et D. Cory Adamson. 2017. «Management of Glioblastoma Multiforme in the Elderly: A Review of the Literature». *World Neurosurgery*, avril. doi:10.1016/j.wneu.2017.04.153.

Halliday, John, Karim Helmy, Siobhan S. Pattwell, Kenneth L. Pitter, Quincey LaPlant, Tatsuya Ozawa, et Eric C. Holland. 2014. « In Vivo Radiation Response of Proneural Glioma Characterized by Protective P53 Transcriptional Program and Proneural-Mesenchymal Shift». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111 (14): 5248-53. doi:10.1073/pnas.1321014111.

Hambardzumvan, Dolores. David H. Gutmann, et Helmut Kettenmann. 2016. « The Role of Microglia and Macrophages in Maintenance Glioma and Progression ». Nature Neuroscience 19 (1): 20-27. doi:10.1038/nn.4185.

Hao, Chunhai, Ian F. Parney, Wilson H. Roa, Joan Turner, Kenneth C. Petruk, et David A. Ramsay. 2002. «Cytokine and Cytokine Receptor MRNA Expression in Human Glioblastomas: Evidence of Th1, Th2 and Th3 Cytokine Dysregulation ». *Acta Neuropathologica* 103 (2): 171-78. doi:10.1007/s004010100448.

Harly, Christelle, Yves Guillaume, Steven Nedellec, Cassie-Marie Peigné, Hannu Mönkkönen, Jukka Mönkkönen, Jiangiang Li, al. 2012. « Key Implication et of CD277/Butyrophilin-3 (BTN3A) in Cellular Stress Sensing by a Major Human $\Gamma\delta$ T-Cell Subset ». Blood 120 (11): 2269-79. doi:10.1182/blood-2012-05-430470.

Harly, Christelle, Cassie-Marie Peigné, et Emmanuel Scotet. 2014. « Molecules and Mechanisms Implicated in the Peculiar Antigenic Activation Process of Human $V\gamma 9V\delta 2$ T Cells ». *Frontiers in Immunology* 5: 657. doi:10.3389/fimmu.2014.00657.

Hayes, R. L., M. Koslow, E. M. Hiesiger, K. B. Hymes, H. S. Hochster, E. J. Moore, D. M. Pierz, D. K. Chen, G. N. Budzilovich, et J. Ransohoff. 1995. « Improved Long Term Survival after Intracavitary Interleukin-2 and Lymphokine-Activated Killer Cells for Adults with Recurrent Malignant Glioma ». *Cancer* 76 (5): 840-52.

Hegi, Monika E., Annie-Claire Diserens, Thierry Gorlia, Marie-France Hamou, Nicolas de Tribolet, Michael Weller, Johan M. Kros, et al. 2005. «MGMT Gene Silencing and Benefit from Temozolomide in Glioblastoma ». *The New England Journal of Medicine* 352 (10): 997-1003.

doi:10.1056/NEJMoa043331.

Heimberger, Amy B., Mohamed Abou-Ghazal, Chantal Reina-Ortiz, David S. Yang, Wei Sun, Wei Qiao, Nobuyoshi Hiraoka, et Gregory N. Fuller. 2008. «Incidence and Prognostic Impact of FoxP3+ Regulatory T Cells in Human Gliomas ». *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 14 (16): 5166-72. doi:10.1158/1078-0432.CCR-08-0320.

Heimberger, Amy B., Laura E. Crotty, Gary E. Archer, Kenneth R. Hess, Carol J. Wikstrand, Allan H. Friedman, Henry S. Friedman, Darell D. Bigner, et John H. Sampson. 2003. « Epidermal Growth Factor Receptor VIII Peptide Vaccination Is Efficacious against Established Intracerebral Tumors ». *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 9 (11): 4247-54.

Hodi, F. Stephen, Steven J. O'Day, David F. McDermott, Robert W. Weber, Jeffrey A. Sosman, John B. Haanen, Rene Gonzalez, et al. 2010. «Improved Survival with Ipilimumab in Patients with Metastatic Melanoma». *The New England Journal of Medicine* 363 (8): 711-23. doi:10.1056/NEJMoa1003466.

Hohlfeld, R., et H. Wekerle. 2001. « Immunological Update on Multiple Sclerosis ». *Current Opinion in Neurology* 14 (3): 299-304.

Holland, E. C. 2000. «Glioblastoma Multiforme: The Terminator». *Proceedings* of the National Academy of Sciences of the United States of America 97 (12): 6242-44.

Jackson, Christopher, Jacob Ruzevick, Jillian Phallen, Zineb Belcaid, et Michael Lim. 2011. « Challenges in Immunotherapy Presented by the Glioblastoma Multiforme Microenvironment ». *Clinical & Developmental Immunology* 2011: 732413. doi:10.1155/2011/732413.

Jarry, Ulrich, Pascale Jeannin, Laurent Pineau, Sabrina Donnou, Yves Delneste, et Dominique Couez. 2013. «Efficiently Stimulated Adult Microglia Cross-Prime Naive CD8+ T Cells Injected in the Brain ». *European Journal of Immunology* 43 (5): 1173-84. doi:10.1002/eji.201243040.

Joffre, Olivier P., Elodie Segura, Ariel Savina, et Sebastian Amigorena. 2012. « Cross-Presentation by Dendritic Cells ». *Nature Reviews Immunology* 12 (8): 557-69. doi:10.1038/nri3254.

June, Carl H., Bruce R. Blazar, et James L. Riley. 2009. «Engineering Lymphocyte Subsets: Tools, Trials and Tribulations». *Nature Reviews. Immunology* 9 (10): 704-16. doi:10.1038/nri2635.

Kahlon, Kanwarpal S., Christine Brown, Laurence J. N. Cooper, Andrew Raubitschek, Stephen J. Forman, et Michael C. Jensen. 2004. «Specific Recognition and Killing of Glioblastoma Multiforme by Interleukin 13-Zetakine Redirected Cytolytic T Cells». *Cancer Research* 64 (24): 9160-66. doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-0454.

Kamath, Arati B., Lisheng Wang, Hiranmoy Das, Lin Li, Vernon N. Reinhold, et Jack F. Bukowski. 2003. « Antigens in Tea-Beverage Prime Human Vgamma 2Vdelta 2 T Cells in Vitro and in Vivo for Memory and Nonmemory Antibacterial Cytokine Responses ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100 (10): 6009-14. doi:10.1073/pnas.1035603100.

Kamran, Neha, Alexandra Calinescu, Marianela Candolfi, Mayuri Chandran, Yohei Antonela S. Asad. Mineharu. Carl Koschmann, Felipe J. Nunez, Pedro R. Lowenstein, et Maria G. Castro, 2016. Advances and « Recent Future of Immunotherapy for Glioblastoma». Expert Opinion on Biological Therapy 16 (10): 1245-64.

doi:10.1080/14712598.2016.1212012.

Kato, Yu, Yoshimasa Tanaka, Hidenori Tanaka, Seiji Yamashita, et Nagahiro Minato. 2003. «Requirement of Species-Specific Interactions for the Activation of Human Gamma Delta T Cells by Pamidronate». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.:* 1950) 170 (7): 3608-13. Kazen, Allison R., et Erin J. Adams. 2011. « Evolution of the V, D, and J gene segments used in the primate $\gamma\delta$ T-cell receptor reveals a dichotomy of conservation and diversity ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108 (29): E332-40. doi:10.1073/pnas.1105105108.

Keir, Mary E., Manish J. Butte, Gordon J. Freeman, et Arlene H. Sharpe. 2008. « PD-1 and Its Ligands in Tolerance and Immunity ». *Annual Review of Immunology* 26: 677-704. doi:10.1146/annurev.immunol.26.021607.090 331.

Kobayashi, Hirohito, Yoshimasa Tanaka, Hiroaki Shimmura, Nagahiro Minato, et Kazunari Tanabe. 2010. «Complete Remission of Lung Metastasis Following Adoptive Immunotherapy Using Activated Autologous Gammadelta T-Cells in a Patient with Renal Cell Carcinoma ». *Anticancer Research* 30 (2): 575-79.

Kobayashi, Hirohito, Yoshimasa Tanaka, Junji Yagi, Yukinari Osaka, Hayakazu Nakazawa, Takehiko Uchiyama, Nagahiro Minato, et Hiroshi Toma. 2007. «Safety Profile and Anti-Tumor Effects of Adoptive Immunotherapy Using Gamma-Delta T Cells against Advanced Renal Cell Carcinoma: A Pilot Study ». Cancer Immunology. *Immunotherapy:* CII 469-76. 56 (4): doi:10.1007/s00262-006-0199-6.

Kochenderfer, James N., Mark E. Dudley, Sadik H. Kassim, Robert P. T. Somerville, Robert O. Carpenter, Maryalice Stetler-Stevenson, James C. Yang, et al. 2015. « Chemotherapy-Refractory Diffuse Large B-Cell Lymphoma and Indolent B-Cell Malignancies Can Be Effectively Treated with Autologous T Cells Expressing an Anti-CD19 Chimeric Antigen Receptor ». Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology 33 (6): 540-49. doi:10.1200/JCO.2014.56.2025.

Komohara, Y., K. Ohnishi, J. Kuratsu, et M. Takeya. 2008. « Possible Involvement of the M2 Anti-Inflammatory Macrophage Phenotype in Growth of Human Gliomas ». *The Journal of Pathology* 216 (1): 15-24. doi:10.1002/path.2370.

Simone, Kevin K. H. Chow, Krebs, Zhongzhen Yi, Tania Rodriguez-Cruz, Meenakshi Hegde, Claudia Gerken, Nabil Ahmed, et Stephen Gottschalk. 2014. «T Cells Redirected to Interleukin-13Ra2 with Mutein--Chimeric Interleukin-13 Antigen Receptors Have Anti-Glioma Activity but Interleukin-13R α 1 ». Also Recognize 1121-31. *Cytotherapy* 16 (8): doi:10.1016/j.jcyt.2014.02.012.

Kunzmann, V., E. Bauer, J. Feurle, F. Weissinger, H. P. Tony, et M. Wilhelm. 2000. « Stimulation of Gammadelta T Cells by Aminobisphosphonates and Induction of Antiplasma Cell Activity in Multiple Myeloma ». *Blood* 96 (2): 384-92.

Kunzmann, V., E. Bauer, et M. Wilhelm. 1999. «Gamma/Delta T-Cell Stimulation by Pamidronate». *The New England Journal of Medicine* 340 (9): 737-38. doi:10.1056/NEJM199903043400914.

Lacroix, M., D. Abi-Said, D. R. Fourney, Z. L. Gokaslan, W. Shi, F. DeMonte, F. F. Lang, et al. 2001. « A Multivariate Analysis of 416 Patients with Glioblastoma Multiforme: Prognosis, Extent of Resection, and Survival ». *Journal of Neurosurgery* 95 (2): 190-98. doi:10.3171/jns.2001.95.2.0190.

Lafont, V., J. Liautard, J. P. Liautard, et J. Favero. 2001. « Production of TNF-Alpha by Human V Gamma 9V Delta 2 T Cells via Engagement of Fc Gamma RIIIA, the Low Affinity Type 3 Receptor for the Fc Portion of IgG, Expressed upon TCR Activation by Nonpeptidic Antigen ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 166 (12): 7190-99.

Lang, F., M. A. Peyrat, P. Constant, F. Davodeau, J. David-Ameline, Y. Poquet, H. Vié, J. J. Fournié, et M. Bonneville. 1995. « Early Activation of Human V Gamma 9V Delta 2 T Cell Broad Cytotoxicity and TNF Production by Nonpeptidic Mycobacterial Ligands ». *Journal of Immunology* (*Baltimore, Md.: 1950*) 154 (11): 5986-94.

Laperriere, Normand, Lisa Zuraw, Gregory Cairneross, et Cancer Care Ontario Practice Guidelines Initiative Neuro-Oncology Disease Site Group. 2002. « Radiotherapy for Newly Diagnosed Malignant Glioma in Adults: A Systematic Review ». *Radiotherapy and Oncology: Journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology* 64 (3): 259-73.

Lapidot, T., C. Sirard, J. Vormoor, B. Murdoch, T. Hoang, J. Caceres-Cortes, M. Minden, B. Paterson, M. A. Caligiuri, et J. E. Dick. 1994. « A Cell Initiating Human Acute Myeloid Leukaemia after Transplantation into SCID Mice ». *Nature* 367 (6464): 645-48. doi:10.1038/367645a0.

Lathia, Justin D. 2013. « Cancer Stem Cells: Moving Past the Controversy ». *CNS Oncology* 2 (6): 465-67. doi:10.2217/cns.13.42.

Laws, Edward R., Ian F. Parney, Wei Huang, Fred Anderson, Angel M. Morris, Anthony Asher, Kevin O. Lillehei, et al. 2003. « Survival Following Surgery and Prognostic Factors for Recently Diagnosed Malignant Glioma: Data from the Glioma Outcomes Project ». *Journal of Neurosurgery* 99 (3): 467-73. doi:10.3171/jns.2003.99.3.0467.

Lesport, Emilie, Jeremy Baudhuin, Sylvie Sousa, Joel LeMaoult, Alessia Zamborlini, Nathalie Rouas-Freiss, Edgardo D. Carosella, et Benoit Favier. 2011. « Inhibition of Human Gamma Delta [Corrected] T-Cell Antitumoral Activity through HLA-G: Implications for Immunotherapy of Cancer ». *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS* 68 (20): 3385-99. doi:10.1007/s00018-011-0632-7.

Liu, Gentao, Han Ying, Gang Zeng, Christopher J. Wheeler, Keith L. Black, et John S. Yu. 2004. «HER-2, Gp100, and MAGE-1 Are Expressed in Human Glioblastoma and Recognized by Cytotoxic T Cells ». *Cancer Research* 64 (14): 4980-86. doi:10.1158/0008-5472.CAN-03-3504.

Liu, Zhiyong, Ben L. Guo, Bradley C. Gehrs, Li Nan, et Richard D. Lopez. 2005. « Ex Vivo Expanded Human Vgamma9Vdelta2+ Gammadelta-T Cells Mediate Innate Antitumor Activity against Human Prostate Cancer Cells in Vitro». *The Journal of Urology* 173 (5): 1552-56.

Lo Presti, Elena, Franceso Dieli, et Serena

Meraviglia. 2014. «Tumor-Infiltrating $\Gamma\delta$ T Lymphocytes: Pathogenic Role, Clinical Significance, and Differential Programing in the Tumor Microenvironment ». *Frontiers in Immunology* 5: 607. doi:10.3389/fimmu.2014.00607.

Louis, David N., Hiroko Ohgaki, Otmar D. Wiestler, Webster K. Cavenee, Peter C. Burger, Anne Jouvet, Bernd W. Scheithauer, et Paul Kleihues. 2007. «The 2007 WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System». *Acta Neuropathologica* 114 (2): 97-109. doi:10.1007/s00401-007-0243-4.

David N., Arie Perry, Guido Louis, Reifenberger, Andreas von Deimling, Dominique Figarella-Branger, Webster K. Cavenee, Hiroko Ohgaki, Otmar D. Wiestler, Paul Kleihues, et David W. Ellison. 2016. «The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: А Summary ». Acta Neuropathologica 131 803-20. (6): doi:10.1007/s00401-016-1545-1.

Louveau, Antoine, Igor Smirnov, Timothy J. Keyes, Jacob D. Eccles, Sherin J. Rouhani, J. David Peske, Noel C. Derecki, et al. 2015. « Structural and functional features of central nervous system lymphatics ». *Nature* 523 (7560): 337-41. doi:10.1038/nature14432.

Ma, Chunling, Qunyuan Zhang, Jian Ye, Fang Wang, Yanping Zhang, Eric Wevers, Theresa Schwartz, et al. 2012. « Tumor-Infiltrating $\Gamma\delta$ T Lymphocytes Predict Clinical Outcome in Human Breast Cancer ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 189 (10): 5029-36. doi:10.4049/jimmunol.1201892.

Mangani, Davide, Michael Weller, et Patrick Roth. 2017. « The network of immunosuppressive pathways in glioblastoma ». *Biochemical Pharmacology* 130: 1-9. doi:10.1016/j.bcp.2016.12.011.

Mathews, John D., Anna V. Forsythe, Zoe Brady, Martin W. Butler, Stacy K. Goergen, Graham B. Byrnes, Graham G. Giles, et al. 2013. «Cancer Risk in 680,000 People Exposed to Computed Tomography Scans in Childhood or Adolescence: Data Linkage Study of 11 Million Australians». *BMJ* (Clinical Research Ed.) 346 (mai): f2360.

Maxwell, Russell, Andrew S. Luksik, Tomas Garzon-Muvdi, et Michael Lim. 2017. « The Potential of Cellular- and Viral-Based Immunotherapies for Malignant Glioma-Dendritic Cell Vaccines, Adoptive Cell Transfer, and Oncolytic Viruses ». *Current Neurology and Neuroscience Reports* 17 (6): 50. doi:10.1007/s11910-017-0754-x.

McLendon, Roger, Allan Friedman, Darrell Bigner, Erwin G. Van Meir, Daniel J. Brat, Gena M. Mastrogianakis, Jeffrey J. Olson, et 2008. « Comprehensive Genomic al. Characterization Defines Human Glioblastoma Genes and Core Pathways». 1061-68. Nature 455 (7216): doi:10.1038/nature07385.

McVay, L. D., et S. R. Carding. 1996. « Extrathymic Origin of Human Gamma Delta T Cells during Fetal Development ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 157 (7): 2873-82.

Medawar, P. B. 1948. «Immunity to Homologous Grafted Skin. III. The Fate of Skin Homographs Transplanted to the Brain, to Subcutaneous Tissue, and to the Anterior Chamber of the Eye». *British Journal of Experimental Pathology* 29 (1): 58-69.

Meir, Erwin G. Van, Costas G. Hadjipanayis, Andrew D. Norden, Hui-Kuo Shu, Patrick Y. Wen, et Jeffrey J. Olson. 2010. « Exciting New Advances in Neuro-Oncology: The Avenue to a Cure for Malignant Glioma ». *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 60 (3): 166. doi:10.3322/caac.20069.

Morgan, Richard A., Mark E. Dudley, John R. Wunderlich, Marybeth S. Hughes, James C. Yang, Richard M. Sherry, Richard E. Royal, et al. 2006. « Cancer Regression in Patients after Transfer of Genetically Engineered Lymphocytes ». *Science (New York, N.Y.)* 314 (5796): 126-29. doi:10.1126/science.1129003.

Morita, C. T., E. M. Beckman, J. F. Bukowski, Y. Tanaka, H. Band, B. R. Bloom, D. E. Golan, et M. B. Brenner. 1995. « Direct Presentation of Nonpeptide Prenyl Pyrophosphate Antigens to Human Gamma Delta T Cells ». *Immunity* 3 (4): 495-507.

Morita. Craig Т., Chenggang Jin, Ghanashyam Sarikonda, et Hong Wang. 2007. « Nonpeptide Antigens, Presentation Mechanisms, and Immunological Memory of Vgamma2Vdelta2 Т Human Cells: Discriminating Friend from Foe through the of Prenyl Pyrophosphate Recognition Immunological Reviews 215 Antigens ». 59-76. doi:10.1111/j.1600-(février): 065X.2006.00479.x.

Nagaraj, Srinivas, et Dmitry I. Gabrilovich. 2007. « Myeloid-Derived Suppressor Cells ». *Advances in Experimental Medicine and Biology* 601: 213-23.

NCT00045968. 2017. « Study of a Drug [DCVax®-L] to Treat Newly Diagnosed GBM Brain Cancer - NCT00045968 -ClinicalTrials.gov ». *ClinicalTrials.gov*. https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT000459 68?term=NCT00045968&rank=1.

NCT00331526. 2009. «Cellular Adoptive Immunotherapy in Treating Patients With Glioblastoma Multiforme - NCT00331526 -ClinicalTrials.gov ».

https://clinicaltrials.gov/show/NCT00331526.

NCT01454596. 2017. « CAR T Cell Receptor Immunotherapy Targeting EGFRvIII for Patients With Malignant Gliomas Expressing EGFRvIII - NCT01454596 -ClinicalTrials.gov ».

https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT014545 96?term=NCT01454596&rank=1.

NCT02208362. 2017. «Genetically Modified T-cells in Treating Patients With Recurrent or Refractory Malignant Glioma -NCT02208362 - ClinicalTrials.gov». https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT022083 62?term=NCT02208362&rank=1.

NCT02209376. 2017. « Autologous T Cells Redirected to EGFRVIII-With a Chimeric Antigen Receptor in Patients With EGFRVIII+ Glioblastoma - NCT02209376 -ClinicalTrials.gov ».

https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT022093 76?term=NCT02209376&rank=1.

NCT02454634. 2017. « Phase I Trial of IDH1

Peptide Vaccine in IDH1R132H-mutated Grade III-IV Gliomas - NCT02454634 -ClinicalTrials.gov». *ClinicalTrials.gov*. https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT024546 34?term=NCT02454634&rank=1.

NCT02546102. 2017. « Phase 3 Randomized, Double-blind, Controlled Study of ICT-107 in Glioblastoma - NCT02546102 -ClinicalTrials.gov ». *ClinicalTrials.gov*. https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT025461 02?term=ICT+107&rank=2.

NCT02573324. 2017. « A Study of ABT-414 in Subjects With Newly Diagnosed Glioblastoma (GBM) With Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) Amplification -NCT02573324 - ClinicalTrials.gov ». *ClinicalTrials.gov.* https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT025733 24?term=NCT02573324&rank=1.

Nduom, Edjah K., Michael Weller, et Amy B. Heimberger. 2015. «Immunosuppressive Mechanisms in Glioblastoma». *Neuro-Oncology* 17 Suppl 7 (novembre): vii9-vii14. doi:10.1093/neuonc/nov151.

Nedellec, Steven, Marc Bonneville, et Emmanuel Scotet. 2010. «Human Vgamma9Vdelta2 T Cells: From Signals to Functions ». *Seminars in Immunology* 22 (4): 199-206. doi:10.1016/j.smim.2010.04.004.

Nicol, A. J., H. Tokuyama, S. R. Mattarollo, T. Hagi, K. Suzuki, K. Yokokawa, et M. Nieda. 2011. «Clinical Evaluation of Autologous Gamma Delta T Cell-Based Immunotherapy for Metastatic Solid Tumours ». *British Journal of Cancer* 105 (6): 778-86. doi:10.1038/bjc.2011.293.

Noël, G., et R. Guillevin. 2011. « [Delineation of glioblastoma, simplicity to complexity, the contribution of imaging] ». *Cancer Radiotherapie: Journal De La Societe Francaise De Radiotherapie Oncologique* 15 (6-7): 484-94. doi:10.1016/j.canrad.2011.07.237.

O'Brien, Catherine A., Aaron Pollett, Steven Gallinger, et John E. Dick. 2007. « A Human Colon Cancer Cell Capable of Initiating Tumour Growth in Immunodeficient Mice ». *Nature* 445 (7123): 106-10. doi:10.1038/nature05372.

Ohgaki, Hiroko, et Paul Kleihues. 2013. « The Definition of Primary and Secondary Glioblastoma ». *Clinical Cancer Research* 19 (4): 764-72. doi:10.1158/1078-0432.CCR-12-3002.

Ohtani, Haruo. 2007. « Focus on TILs: Prognostic Significance of Tumor Infiltrating Lymphocytes in Human Colorectal Cancer ». *Cancer Immunity* 7 (février): 4.

Old, L. J., et E. A. Boyse. 1964. « IMMUNOLOGY OF EXPERIMENTAL TUMORS ». *Annual Review of Medicine* 15: 167-86.

doi:10.1146/annurev.me.15.020164.001123.

Orringer, Daniel, Darryl Lau, Sameer Khatri, Grettel J. Zamora-Berridi, Kathy Zhang, Chris Wu, Neeraj Chaudhary, et Oren Sagher. 2012. « Extent of Resection in Patients with Glioblastoma: Limiting Factors, Perception of Resectability, and Effect on Survival». *Journal of Neurosurgery* 117 (5): 851-59. doi:10.3171/2012.8.JNS12234.

Ostrom, Quinn T., Haley Gittleman, Jordonna Fulop, Max Liu, Rachel Blanda, Courtney Kromer, Yingli Wolinsky, Carol Kruchko, et Jill S. Barnholtz-Sloan. 2015. «CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2008-2012». *Neuro-Oncology* 17 Suppl 4 (octobre): iv1-iv62. doi:10.1093/neuonc/nov189.

Papademetriou, Iason T., et Tyrone Porter. 2015. « Promising Approaches to Circumvent the Blood-Brain Barrier: Progress, Pitfalls and Clinical Prospects in Brain Cancer ». *Therapeutic Delivery* 6 (8): 989-1016. doi:10.4155/tde.15.48.

Pardoll, Drew M. 2012. «The Blockade of Immune Checkpoints in Cancer Immunotherapy ». *Nature Reviews. Cancer* 12 (4): 252-64. doi:10.1038/nrc3239.

Parker, C. M., V. Groh, H. Band, S. A. Porcelli, C. Morita, M. Fabbi, D. Glass, J. L. Strominger, et M. B. Brenner. 1990. « Evidence for Extrathymic Changes in the T Cell Receptor Gamma/Delta Repertoire ». *The* Journal of Experimental Medicine 171 (5): 1597-1612.

Parsons, D. Williams, Siân Jones, Xiaosong Zhang, Jimmy Cheng-Ho Lin, Rebecca J. Leary, Philipp Angenendt, Parminder Mankoo, et al. 2008. «An Integrated Genomic Analysis of Human Glioblastoma Multiforme ». *Science (New York, N.Y.)* 321 (5897): 1807-12. doi:10.1126/science.1164382.

Pauza, C. David, et Cristiana Cairo. 2015. « Evolution and Function of the TCR Vgamma9 Chain Repertoire: It's Good to Be Public ». *Cellular Immunology* 296 (1): 22-30. doi:10.1016/j.cellimm.2015.02.010.

Phillips, Heidi S., Samir Kharbanda, Ruihuan Chen, William F. Forrest, Robert H. Soriano, Thomas D. Wu, Anjan Misra, et al. 2006. « Molecular Subclasses of High-Grade Glioma Predict Prognosis, Delineate a Pattern of Disease Progression, and Resemble Stages in Neurogenesis ». *Cancer Cell* 9 (3): 157-73. doi:10.1016/j.ccr.2006.02.019.

Phuphanich, Surasak, Christopher J. Wheeler, Jeremy D. Rudnick, Mia Mazer, Hongqian Wang, Miriam A. Nuño, Jaime E. Richardson, et al. 2013. « Phase I Trial of a Multi-Epitope-Pulsed Dendritic Cell Vaccine for Patients with Newly Diagnosed Glioblastoma ». *Cancer Immunology, Immunotherapy: CII* 62 (1): 125-35. doi:10.1007/s00262-012-1319-0.

Pieper, Christian, Jasmin Jacqueline Marek, Marlies Unterberg, Tanja Schwerdtle, et Hans-Joachim Galla. 2014. «Brain Capillary Pericytes Contribute to the Immune Defense in Response to Cytokines or LPS in Vitro». *Brain Research* 1550 (mars): 1-8. doi:10.1016/j.brainres.2014.01.004.

Poccia, F., B. Cipriani, S. Vendetti, V. Colizzi, Y. Poquet, L. Battistini, M. López-Botet, J. J. Fournié, et M. L. Gougeon. 1997. « CD94/NKG2 Inhibitory Receptor Complex Modulates Both Anti-Viral and Anti-Tumoral Responses of Polyclonal Phosphoantigen-Reactive V Gamma 9V Delta 2 T Lymphocytes ». *Journal of Immunology* (*Baltimore, Md.: 1950*) 159 (12): 6009-17.

Pont, Fréderic, Julien Familiades, Sébastien

Déjean, Séverine Fruchon, Delphine Cendron, Mary Poupot, Rémy Poupot, et al. 2012. « The Expression Profile Gene of Phosphoantigen-Specific Human Гδ Т Lymphocytes Is a Blend of AB T-Cell and NK-Cell Signatures». European Journal of Immunology 42 (1): 228-40. doi:10.1002/eji.201141870.

Prins, Robert M., Horacio Soto, Vera Konkankit, Sylvia K. Odesa, Ascia Eskin, William H. Yong, Stanley F. Nelson, et Linda M. Liau. 2011. «Gene Expression Profile Correlates with T-Cell Infiltration and Relative Survival in Glioblastoma Patients Vaccinated with Dendritic Cell Immunotherapy ». Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research 17 (6): doi:10.1158/1078-0432.CCR-10-1603-15. 2563.

Qin, Gang, Huawei Mao, Jian Zheng, Sin Fun Sia, Yinping Liu, Ping-Lung Chan, Kwok-Tai Lam, J. S. Malik Peiris, Yu-Lung Lau, et Wenwei Tu. « Phosphoantigen-2009. Expanded Human Gammadelta T Cells Display Potent Cytotoxicity against Monocyte-Derived Macrophages Infected with Human and Avian Influenza Viruses ». The Journal of Infectious Diseases 200 (6): 858-65. doi:10.1086/605413.

Rampling, Roy, Sharon Peoples, Paul J. Mulholland, Allan James, Omar Al-Salihi, Christopher J. Twelves, Catherine McBain, et al. 2016. « A Cancer Research UK First Time in Human Phase I Trial of IMA950 (Novel Multipeptide Therapeutic Vaccine) in Patients with Newly Diagnosed Glioblastoma ». *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 22 (19): 4776-85. doi:10.1158/1078-0432.CCR-16-0506.

Ransohoff, Richard M., Pia Kivisäkk, et Grahame Kidd. 2003. « Three or More Routes for Leukocyte Migration into the Central Nervous System ». *Nature Reviews*. *Immunology* 3 (7): 569-81. doi:10.1038/nri1130.

Raulet, David H., et Nadia Guerra. 2009. « Oncogenic Stress Sensed by the Immune System: Role of Natural Killer Cell Receptors ». *Nature Reviews. Immunology* 9 (8): 568-80. doi:10.1038/nri2604.

Raychaudhuri, Baisakhi, Patricia Rayman, Joanna Ireland, Jennifer Ko, Brian Rini, Ernest C. Borden, Jorge Garcia, Michael A. Vogelbaum, et James Finke. 2011. « Myeloid-Derived Suppressor Cell Accumulation and Function in Patients with Newly Diagnosed Glioblastoma ». *Neuro-Oncology* 13 (6): 591-99. doi:10.1093/neuonc/nor042.

Razavi, Seyed-Mostafa, Karen E. Lee, Benjamin E. Jin, Parvir S. Aujla, Sharareh Gholamin, et Gordon Li. 2016. « Immune Evasion Strategies of Glioblastoma ». *Frontiers in Surgery* 3: 11. doi:10.3389/fsurg.2016.00011.

Reardon, David A. 2012. «Treatment of Elderly Patients with Glioblastoma». *The Lancet. Oncology* 13 (7): 656-57. doi:10.1016/S1470-2045(12)70186-9.

Reni, Michele, Elena Mazza, Silvia Zanon, Gemma Gatta, et Charles J. Vecht. 2017. « Central nervous system gliomas ». *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 113: 213-34.

doi:10.1016/j.critrevonc.2017.03.021.

Restifo, Nicholas P., Mark E. Dudley, et Steven A. Rosenberg. 2012. « Adoptive Immunotherapy for Cancer: Harnessing the T Cell Response ». *Nature Reviews Immunology* 12 (4): 269-81. doi:10.1038/nri3191.

Riganti, Chiara, Massimo Massaia, Martin S. Davey, et Matthias Eberl. 2012. «Human Γδ T-Cell Responses in Infection and Immunotherapy: Common Mechanisms, Common Mediators?» European Journal of Immunology 42 (7): 1668-76. doi:10.1002/eji.201242492.

Rizk, Shahir S., Somnath Mukherjee, Akiko Koide, Shohei Koide, et Anthony A. Kossiakoff. 2017. «Targeted Rescue of Cancer-Associated IDH1 Mutant Activity Using an Engineered Synthetic Antibody ». *Scientific Reports* 7 (1): 556. doi:10.1038/s41598-017-00728-1.

Rizvi, Naiyer A., Julien Mazières, David Planchard, Thomas E. Stinchcombe, Grace K.

Dy, Scott J. Antonia, Leora Horn, et al. 2015. « Activity and Safety of Nivolumab, an Anti-PD-1 Immune Checkpoint Inhibitor, for Patients with Advanced, Refractory Squamous Non-Small-Cell Lung Cancer (CheckMate 063): A Phase 2, Single-Arm Trial ». *The Lancet. Oncology* 16 (3): 257-65. doi:10.1016/S1470-2045(15)70054-9.

Rochman, Yrina, Rosanne Spolski, et Warren J. Leonard. 2009. «New Insights into the Regulation of T Cells by Gamma(c) Family Cytokines». *Nature Reviews. Immunology* 9 (7): 480-90. doi:10.1038/nri2580.

Rodríguez, Paulo C., et Augusto C. Ochoa. 2008. «Arginine regulation by myeloid derived suppressor cells and tolerance in cancer: mechanisms and therapeutic perspectives ». *Immunological reviews* 222 (avril): 180-91. doi:10.1111/j.1600-065X.2008.00608.x.

Rosenberg, S. A., B. S. Packard, P. M. Aebersold, D. Solomon, S. L. Topalian, S. T. Toy, P. Simon, M. T. Lotze, J. C. Yang, et C. A. Seipp. 1988. «Use of Tumor-Infiltrating Lymphocytes and Interleukin-2 in the Immunotherapy of Patients with Metastatic Melanoma. A Preliminary Report ». *The New England Journal of Medicine* 319 (25): 1676-80.

doi:10.1056/NEJM198812223192527.

Rosenberg, Steven A., Nicholas P. Restifo, James C. Yang, Richard A. Morgan, et Mark E. Dudley. 2008. « Adoptive cell transfer: a clinical path to effective cancer immunotherapy ». *Nature reviews. Cancer* 8 (4): 299-308. doi:10.1038/nrc2355.

Sanders, John M., Subhash Ghosh, Julian M. W. Chan, Gary Meints, Hong Wang, Amy M. Raker, Yongcheng Song, et al. 2004. « Quantitative Structure-Activity Relationships for Gammadelta T Cell Activation by Bisphosphonates ». *Journal of Medicinal Chemistry* 47 (2): 375-84. doi:10.1021/jm0303709.

Sato, Eiichi, Sara H. Olson, Jiyoung Ahn, Brian Bundy, Hiroyoshi Nishikawa, Feng Qian, Achim A. Jungbluth, et al. 2005. « Intraepithelial CD8+ Tumor-Infiltrating Lymphocytes and a High CD8+/Regulatory T Cell Ratio Are Associated with Favorable Prognosis in Ovarian Cancer ». *Proceedings* of the National Academy of Sciences of the United States of America 102 (51): 18538-43. doi:10.1073/pnas.0509182102.

Schreiber, Robert D., Lloyd J. Old, et Mark J. Smyth. 2011. «Cancer Immunoediting: Integrating Immunity's Roles in Cancer Suppression and Promotion». *Science* 331 (6024): 1565-70. doi:10.1126/science.1203486.

Schucht, Philippe, Jürgen Beck, Janine Abu-Isa, Lukas Andereggen, Michael Murek, Kathleen Seidel, Lennard Stieglitz, et Andreas Raabe. 2012. « Gross Total Resection Rates in Contemporary Glioblastoma Surgery: Results of an Institutional Protocol Combining 5-Aminolevulinic Acid Intraoperative Fluorescence Imaging and Brain Mapping ». *Neurosurgery* 71 (5): 927-935; discussion 935-936.

doi:10.1227/NEU.0b013e31826d1e6b.

Schucht, Philippe, Sonja Knittel, Johannes Slotboom, Kathleen Seidel, Michael Murek, Astrid Jilch, Andreas Raabe, et Jürgen Beck. 2014. «5-ALA Complete Resections Go beyond MR Contrast Enhancement: Shift Corrected Volumetric Analysis of the Extent of Resection in Surgery for Glioblastoma ». *Acta Neurochirurgica* 156 (2): 305-312; discussion 312. doi:10.1007/s00701-013-1906-7.

Schumacher, Theresa, Lukas Bunse, Stefan Pusch, Felix Sahm, Benedikt Wiestler, Jasmin Quandt, Oliver Menn, et al. 2014. «A Vaccine Targeting Mutant IDH1 Induces Antitumour Immunity ». *Nature* 512 (7514): 324-27. doi:10.1038/nature13387.

Scotet, Emmanuel, Laurent O. Martinez, Ethan Grant, Ronald Barbaras, Paul Jenö, Martine Guiraud, Bernard Monsarrat, et al. 2005. « Tumor Recognition Following Vgamma9Vdelta2 Т Cell Receptor Interactions with a Surface F1-ATPase-Related Structure and Apolipoprotein A-I». 22 71-80. Immunity (1): doi:10.1016/j.immuni.2004.11.012.

Shankaran, V., H. Ikeda, A. T. Bruce, J. M. White, P. E. Swanson, L. J. Old, et R. D.

Schreiber. 2001. « IFNgamma and Lymphocytes Prevent Primary Tumour Development and Shape Tumour Immunogenicity ». *Nature* 410 (6832): 1107-11. doi:10.1038/35074122.

Siemens, D. Robert, Nianping Hu, Abdol Karim Sheikhi, Eugene Chung, Lisa J. Frederiksen, Hugh Pross, et Charles H. Graham. 2008. «Hypoxia Increases Tumor Cell Shedding of MHC Class I Chain-Related Molecule: Role of Nitric Oxide». *Cancer Research* 68 (12): 4746-53. doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-0054.

Silva-Santos, Bruno, Karine Serre, et Håkan Norell. 2015. « $\Gamma\delta$ T Cells in Cancer ». *Nature Reviews. Immunology* 15 (11): 683-91. doi:10.1038/nri3904.

Singh, Sheila K., Cynthia Hawkins, Ian D. Clarke, Jeremy A. Squire, Jane Bayani, Takuichiro Hide, R. Mark Henkelman, Michael D. Cusimano, et Peter B. Dirks. 2004. «Identification of Human Brain Tumour Initiating Cells ». *Nature* 432 (7015): 396-401. doi:10.1038/nature03128.

Sottoriva, Andrea, Inmaculada Spiteri, Sara G. M. Piccirillo, Anestis Touloumis, V. Peter Collins, John C. Marioni, Christina Curtis, Colin Watts, et Simon Tavaré. 2013. « Intratumor Heterogeneity in Human Glioblastoma Reflects Cancer Evolutionary Dynamics ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110 (10): 4009-14. doi:10.1073/pnas.1219747110.

Stummer, Walter, Uwe Pichlmeier, Thomas Meinel, Otmar Dieter Wiestler, Friedhelm Zanella, et Hans-Jürgen Reulen. 2006. « Fluorescence-guided surgery with 5aminolevulinic acid for resection of malignant glioma: a randomised controlled multicentre phase III trial ». *The Lancet Oncology* 7 (5): 392-401. doi:10.1016/S1470-2045(06)70665-9.

Stummer, Walter, Jörg-Christian Tonn, Hubertus Maximilian Mehdorn, Ulf Nestler, Kea Franz, Claudia Goetz, Andrea Bink, Uwe Pichlmeier, et ALA-Glioma Study Group. 2011. «Counterbalancing Risks and Gains from Extended Resections in Malignant Glioma Surgery: A Supplemental Analysis from the Randomized 5-Aminolevulinic Acid Glioma Resection Study. Clinical Article». *Journal of Neurosurgery* 114 (3): 613-23. doi:10.3171/2010.3.JNS097.

Stupp, Roger, Warren P. Mason, Martin J. van den Bent, Michael Weller, Barbara Fisher, Martin J. B. Taphoorn, Karl Belanger, et al. 2005. «Radiotherapy plus Concomitant and Adjuvant Temozolomide for Glioblastoma». *The New England Journal of Medicine* 352 (10): 987-96. doi:10.1056/NEJMoa043330.

Tanaka, Y., C. T. Morita, Y. Tanaka, E. Nieves, M. B. Brenner, et B. R. Bloom. 1995. « Natural and Synthetic Non-Peptide Antigens Recognized by Human Gamma Delta T Cells ». *Nature* 375 (6527): 155-58. doi:10.1038/375155a0.

Thedrez, Aurélie, Christelle Harly, Alexis Morice, Samuel Salot, Marc Bonneville, et Emmanuel Scotet. 2009. «IL-21-Mediated Potentiation of Antitumor Cytolytic and Proinflammatory Responses of Human V Gamma 9V Delta 2 T Cells for Adoptive Immunotherapy ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 182 (6): 3423-31. doi:10.4049/jimmunol.0803068.

Thomas, Lewis. 1959. « Cellular and Humoral Aspects of the Hypersensitive States ». In *Cellular and Humoral Aspects of the Hypersensitive States*, Hoeber-Harper. New York.

Thompson, Keith, Javier Rojas-Navea, et Michael J. Rogers. 2006. «Alkylamines Cause Vgamma9Vdelta2 T-Cell Activation and Proliferation by Inhibiting the Mevalonate Pathway ». *Blood* 107 (2): 651-54. doi:10.1182/blood-2005-03-1025.

Thurnher, Martin, Oliver Nussbaumer, et Georg Gruenbacher. 2012. « Novel Aspects of Mevalonate Pathway Inhibitors as Antitumor Agents ». *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 18 (13): 3524-31. doi:10.1158/1078-0432.CCR-12-0489.

Till, Brian G., Michael C. Jensen, Jinjuan Wang, Xiaojun Qian, Ajay K. Gopal, David G. Maloney, Catherine G. Lindgren, et al. 2012. « CD20-Specific Adoptive Immunotherapy for Lymphoma Using a Chimeric Antigen Receptor with Both CD28 and 4-1BB Domains: Pilot Clinical Trial Results ». *Blood* 119 (17): 3940-50. doi:10.1182/blood-2011-10-387969.

Tivnan, Amanda, Tatjana Heilinger, Ed C. Lavelle, et Jochen H. M. Prehn. 2017. « Advances in Immunotherapy for the Treatment of Glioblastoma ». *Journal of Neuro-Oncology* 131 (1): 1-9. doi:10.1007/s11060-016-2299-2.

Vantourout, Pierre, et Adrian Hayday. 2013. « Six-of-the-Best: Unique Contributions of $\Gamma\delta$ T Cells to Immunology ». *Nature Reviews. Immunology* 13 (2): 88-100. doi:10.1038/nri3384.

Vavassori, Stefano, Anil Kumar, Gan Siok Wan, Gundimeda S. Ramanjaneyulu, Marco Cavallari, Sary El Daker, Travis Beddoe, et al. 2013. «Butyrophilin 3A1 Binds Phosphorylated Antigens and Stimulates Human $\Gamma\delta$ T Cells ». *Nature Immunology* 14 (9): 908-16. doi:10.1038/ni.2665.

Verhaak, Roel G. W., Katherine A. Hoadley, Elizabeth Purdom, Victoria Wang, Yuan Qi, Matthew D. Wilkerson, C. Ryan Miller, et al. « Integrated Genomic 2010. Analysis Identifies Clinically Relevant Subtypes of Glioblastoma Characterized by Abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1». Cancer Cell 17 (1): 98-110. doi:10.1016/j.ccr.2009.12.020.

Vermijlen, David, Peter Ellis, Cordelia Langford, Anne Klein, Rosel Engel, Katharina Willimann, Hassan Jomaa, Adrian C. Hayday, et Matthias Eberl. 2007. « Distinct Cytokine-Driven Responses of Activated Blood Gammadelta T Cells: Insights into Unconventional T Cell Pleiotropy ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 178 (7): 4304-14.

Viey, Emilie, Gaëlle Fromont, Bernard Escudier, Yannis Morel, Sylvie Da Rocha, Salem Chouaib, et Anne Caignard. 2005. « Phosphostim-Activated Gamma Delta T Cells Kill Autologous Metastatic Renal Cell Carcinoma ». Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950) 174 (3): 1338-47. Waitkus, Matthew S., Bill H. Diplas, et Hai Yan. 2016. « Isocitrate Dehydrogenase Mutations in Gliomas ». *Neuro-Oncology* 18 (1): 16-26. doi:10.1093/neuonc/nov136.

Wang, P., et M. Malkovsky. 2000. « Different Roles of the CD2 and LFA-1 T-Cell Co-Receptors for Regulating Cytotoxic, Proliferative, and Cytokine Responses of Human V Gamma 9/V Delta 2 T Cells ». *Molecular Medicine (Cambridge, Mass.)* 6 (3): 196-207.

Weller, Michael, Martin van den Bent, Kirsten Hopkins, Jörg C. Tonn, Roger Stupp, Andrea Falini, Elizabeth Cohen-Jonathan-Moyal, et al. 2014. « EANO Guideline for the Diagnosis and Treatment of Anaplastic Gliomas and Glioblastoma ». *The Lancet. Oncology* 15 (9): e395-403. doi:10.1016/S1470-2045(14)70011-7.

Weller, Michael, Nicholas Butowski, David Tran, Lawrence Recht, Michael Lim, Hal Hirte, Lynn Ashby, et al. 2016. «ATIM-03. ACT IV: AN INTERNATIONAL, DOUBLE-BLIND. PHASE 3 TRIAL OF **RINDOPEPIMUT** IN NEWLY EGFRvIII-EXPRESSING DIAGNOSED. GLIOBLASTOMA». Neuro-Oncology 18 (suppl 6): vi17-vi18. doi:10.1093/neuonc/now212.068.

Weller, Michael, Kerstin Kaulich, Bettina Hentschel. Joerg Felsberg, Dorothee Gramatzki, Torsten Pietsch, Matthias Simon, et al. 2014. «Assessment and Prognostic Significance of the Epidermal Growth Factor Receptor VIII Mutation in Glioblastoma Patients Treated with Concurrent and Adjuvant Temozolomide Radiochemotherapy ». International Journal Cancer 134 2437-47. of (10): doi:10.1002/ijc.28576.

Weller, Michael, Patrick Roth, Matthias Preusser, Wolfgang Wick, David A. Reardon, Michael Platten, et John H. Sampson. 2017. « Vaccine-Based Immunotherapeutic Approaches to Gliomas and Beyond ». *Nature Reviews. Neurology*, mai. doi:10.1038/nrneurol.2017.64.

Wen, Patrick, David Reardon, Surasak Phuphanich, Robert Aiken, Joseph Landolfi, William Curry, Jay-Jiguang Zhu, et al. 2014. « AT-60A RANDOMIZED DOUBLE BLIND PLACEBO-CONTROLLED PHASE 2 TRIAL OF DENDRITIC CELL (DC) VACCINE ICT-107 FOLLOWING STANDARD TREATMENT IN NEWLY DIAGNOSED PATIENTS WITH GBM ». *Neuro-Oncology* 16 (suppl_5): v22-v22. doi:10.1093/neuonc/nou237.59.

Westphal, Manfred, Oliver Heese, Joachim P. Steinbach, Oliver Schnell, Gabriele Schackert, Maximilian Mehdorn, Dirk Schulz, et al. 2015. «A randomised, open label phase III trial with nimotuzumab, an anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody in the treatment of newly diagnosed adult glioblastoma ». *European Journal of Cancer* 51 (4): 522-32. doi:10.1016/j.ejca.2014.12.019.

Wiemer, David F., et Andrew J. Wiemer. 2014. «Opportunities and Challenges in Development of Phosphoantigens as $V\gamma 9V\delta 2$ T Cell Agonists ». *Biochemical Pharmacology* 89 (3): 301-12. doi:10.1016/j.bcp.2014.03.009.

Wilhelm, Martin, Volker Kunzmann, Susanne Eckstein, Peter Reimer, Florian Weissinger, Thomas Ruediger, et Hans-Peter Tony. 2003. « Gammadelta T Cells for Immune Therapy of Patients with Lymphoid Malignancies ». *Blood* 102 (1): 200-206. doi:10.1182/blood-2002-12-3665.

Wollmann, Guido, Koray Ozduman, et Anthony N. van den Pol. 2012. «Oncolytic Virus Therapy for Glioblastoma Multiforme: Concepts and Candidates ». *Cancer Journal (Sudbury, Mass.)* 18 (1): 69-81. doi:10.1097/PPO.0b013e31824671c9.

Wu, Adam, Jun Wei, Ling-Yuan Kong, Yongtao Wang, Waldemar Priebe, Wei Qiao, Raymond Sawaya, et Amy B. Heimberger.
2010. «Glioma Cancer Stem Cells Induce Immunosuppressive
Macrophages/Microglia ». Neuro-Oncology 12 (11): 1113-25. doi:10.1093/neuonc/noq082.

Xu, Xiao-Jun, et Yong-Min Tang. 2014. « Cytokine Release Syndrome in Cancer Immunotherapy with Chimeric Antigen ReceptorEngineeredTCells ».CancerLetters343(2):172-78.doi:10.1016/j.canlet.2013.10.004.

Yan, Hai, D. Williams Parsons, Genglin Jin, Roger McLendon, B. Ahmed Rasheed, Weishi Yuan, Ivan Kos, et al. 2009. « IDH1 and IDH2 Mutations in Gliomas ». *The New England Journal of Medicine* 360 (8): 765-73. doi:10.1056/NEJMoa0808710.

Yang, Isaac, Tarik Tihan, Seunggu J. Han, Margaret R. Wrensch, John Wiencke, Michael E. Sughrue, et Andrew T. Parsa. 2010. « CD8+ T-Cell Infiltrate in Newly Diagnosed Glioblastoma Is Associated with Long-Term Survival ». Journal of Clinical Neuroscience : Official Journal of the Neurosurgical Society of Australasia 17 (11): 1381. doi:10.1016/j.jocn.2010.03.031.

Ye, Jing, Santosh Kumar Bhagat, Hongmei Li, Xianfu Luo, Buhai Wang, Liqin Liu, et Guomei Yang. 2016. «Differentiation between Recurrent Gliomas and Radiation Necrosis Using Arterial Spin Labeling Perfusion Imaging». *Experimental and Therapeutic Medicine* 11 (6): 2432-36. doi:10.3892/etm.2016.3225.

Ye, Xian-zong, Sen-lin Xu, Yan-hong Xin, Shi-cang Yu, Yi-fang Ping, Lu Chen, Hualiang Xiao, et al. 2012. «Tumor-Associated Microglia/Macrophages Enhance the Invasion of Glioma Stem-like Cells via TGF-B1 Signaling Pathway». *The Journal of Immunology* 189 (1): 444-53. doi:10.4049/jimmunol.1103248.

Zagzag, David, Konstantin Salnikow, Luis Chiriboga, Herman Yee, Li Lan, M. Aktar Ali, Roberto Garcia, Sandra Demaria, et Elizabeth W. Newcomb. 2005. « Downregulation of Major Histocompatibility Complex Antigens in Invading Glioma Cells: Stealth Invasion of the Brain ». Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology 85 (3): 328-41. doi:10.1038/labinvest.3700233.

Zouaoui, S., V. Rigau, H. Mathieu-Daudé, A. Darlix, F. Bessaoud, P. Fabbro-Peray, F. Bauchet, et al. 2012. « Recensement national histologique des tumeurs primitives du système nerveux central : résultats généraux

sur 40 000 cas, principales applications actuelles et perspectives ». *Neurochirurgie* 58 (1): 4-13. doi:10.1016/j.neuchi.2012.01.004.



Article 4 : « Adoptive transfer by stereotaxy of cytotoxic immune cells in murine models of orthotopic human glioblastoma multiforme xenografts » - soumis fin mai 2017 : JOVE

Ulrich JARRY*, Noémie JOALLAND*, <u>Cynthia CHAUVIN*</u>, Béatrice CLEMENCEAU, Claire PECQUEUR & Emmanuel SCOTET

* These authors contributed equally to the work

L'implantation intracrânienne de cellules humaines par stéréotaxie a été largement utilisée chez la souris NSG au cours de ce travail de thèse. Le développement de modèles murins porteurs de xénogreffes orthotopiques humaines formées à partir de cultures primaires de GBM (directement issues de fragments de tumeur), a conduit à l'obtention de profils tumoraux dont l'agressivité et l'infiltration sont similaires à celles observés chez les patients. Suite à la mise en place de ces modèles, il a été développé un système de transfert adoptif de cellules immunitaires effectrices injectées directement en intracrânien, afin notamment de s'affranchir de la BHE et d'injecter le traitement au plus près des cellules tumorales résiduelles. Cet article dédié aux protocoles expérimentaux porte sur : (i) l'expansion et la préparation d'une suspension de cellules immunitaires injectables, (ii) l'étude de la survie et de la mobilité des effecteurs cellulaires au sein du parenchyme cérébral, et bien sûr (iii) l'acte chirurgical d'injection par stéréotaxie, associée aux (iv) suivis pré-, per- et postopératoires des animaux.

TITLE

Adoptive transfer by stereotaxy of cytotoxic immune cells in murine models of orthotopic human glioblastoma multiforme xenografts

Ulrich JARRY*, Noémie JOALLAND*, Cynthia CHAUVIN*, Béatrice CLEMENCEAU, Claire PECQUEUR, Emmanuel SCOTET

* authors have equally contributed to this work

KEYWORDS: Immunotherapy, adoptive transfer, glioblastoma, stereotaxic injections

SHORT ABSTRACT

Glioblastoma multiforme is the most frequent and aggressive primary brain tumor in adults with a dismal prognosis and few therapeutic strategies. This protocol provides a preclinical proof-of-concept for stereotactic immunotherapies based on multiple injections of cytotoxic effectors in mice carrying orthotopic human primary GBM tumor to eliminate invasive GBM cells.

LONG ABSTRACT

Glioblastoma multiforme (GBM) is the most frequent and aggressive primary brain tumor in adults, with a dismal prognosis and few therapeutic advances made over the last decade. Cellular immunotherapies are currently being explored to eliminate highly invasive and chemo/radioresistant GBM cells likely involved in rapid tumor relapse. Post-resection administrations of selected GBM-reactive cytotoxic immune effectors in the vicinity of the tumor (e.g. parenchyma) represents a unique opportunity to deliver concentrated cellular immunotherapies directly into the site of residual GBM malignancy.

Our group recently showed that immunodeficient NSG mice carrying orthotopic primary human GBM xenografts recapitulate GBM tumor development in patients. This model was used to evaluate the efficacy of cytotoxic immune effectors intratumoral injections. This protocol describes our therapeutical process based on GBM-reactive immune effector cells preparation followed by their stereotactic injection within intracranial tumor bed.

Taken together, our results provide an important preclinical proof-of-concept for: (i) the development of murine models carrying orthotopic human primary GBM xenografts, (ii) the development and characterization of cytotoxic immune effectors injection at the tumor site, (iii) the efficiency of multiple injections of immune effectors on tumor progression.

INTRODUCTION

Glioblastoma multiforme (GBM; WHO grade IV astrocytoma) remains the most frequent and aggressive primary brain tumor in adults. Despite aggressive treatments, which is based on surgery followed by radiotherapy and chemotherapy, GBM is associated with an extremely poor prognosis (median survival of 14.6 months and 2 year-mortality > 73%)¹ with few therapeutic advances made over the last decade $\binom{2}{2}$. Cellular immunotherapies are currently explored to eliminate highly invasive and chemo/radioresistant GBM cells likely involved in rapid tumor relapse (3). Various potential immunological targets have been identified and proposed for immunotherapy in GBM such as GBMspecific tumor antigens $\alpha\beta$ T cells, stress-induced molecules activating $\gamma\delta$ T cells, iNKT cells, CAR T cells or ADCC effector cells in association with mAb (Brown et al 2016 ⁴(CAR); Jarry et al 2016 ⁵; Dutoit et al 2012 ⁶). Post-resection administrations of selected GBM-reactive cytotoxic immune effectors in the vicinity of the tumor could represent a unique opportunity to deliver concentrated cellular immunotherapy directly into the site of residual malignancy. Our group recently showed that immunodeficient NSG mice carrying orthotopic primary human GBM tumor xenografts recapitulate GBM tumor development in patients (Jarry and al 2016⁵) and these GBM models were used to evaluate the efficacy of cytotoxic immune effectors intratumoral injections. This protocol describes our therapeutical process based on (i) the isolation and amplification of GBM-reactive immune effector cells, (ii) the preparation of these effector cells for intracranial injection and (iii) their stereotactic injection at the tumor site within the mouse brain. The behavior of the immune effectors after orthotopic injection was also investigated.

PROTOCOL

Ethics Statement

The following procedure involving animal subjects was done accordingly to institutional guidelines (Agreement # 00186.02; Regional ethics committee of the Pays de la Loire (France)) and human PBMCs were isolated from informed consented healthy blood donors obtained from the Etablissement Français du Sang (Nantes, France).

Our therapeutical approach is based on the injection of 20×10^6 effector cells per injection for each brain tumor-bearing mouse. An *in vitro* expansion is then required in order to produce large quantities of immune cells. Non-specific expansions are performed using phytohaemagglutinin (PHA-L) and irradiated allogeneic feeder cells: donor peripheral-blood mononuclear cells (PBMCs) and Epstein Barr Virus (EBV)-transformed B-lymphoblastoid cell lines (BLCLs), derived from PBMCs by *in vitro* infection with EBV- containing culture supernatant from the Marmoset B95-8 cell line (ATCC) in the presence of 1 µg/mL cyclosporin-A.

All steps in the following protocol have to be performed under sterile conditions.

0) Generation of GBM-reactive immune effector cells

GBM-reactive immune effector cells were generated following diverse protocols depending on their nature (Jarry et al 2016 5 (LT V γ 9V δ 2), Clémenceau et al 2015 7 (NK92 CD16 CAR)) until reaching >80-95% purity.

1) Expansion of cytotoxic effector cells

1.1. Prepare and irradiate feeder cells at 35 Gy with an X-ray generator. For the stimulation of $2x10^5$ to $4x10^5$ effector cells count $10x10^6$ PBMCs and $1x10^6$ BLCLs both mixed from 3 distinct donors. 1.2. Resuspend both feeder cells and effector cells in 15 mL of RPMI (Gibco, Cergy Pontoise, France) supplemented with 10% heat inactivated FCS (Dutscher, Brumath, France), 2 mM L-glutamine (Gibco), penicillin (100 IU/ml) (Gibco), and streptomycin (0.1 µg/ml) (Gibco) and 300 IU/ml recombinant IL-2 (Novartis Pharma SAS, Rueil-Malmaison, France)

1.3. Add PHA-L (Sigma, St Louis, MO) at final concentration of 1 μ g/mL, homogenize and drop quickly the cells: distribute 150 μ L of cell suspension per wells in 96-well U-bottomed plates.

1.4. Incubate at 37 °C, 5 % CO_2 in humidified atmosphere.

1.5. Check the plate daily until the medium becomes yellow with large cell clumps (~ day 7).

1.6. Consequently, transfer the cells in culture flask at 1×10^{6} cells/mL in fresh medium.

1.7. Twice a week, check cell count and maintain them at 1×10^6 cells/mL in fresh medium.

1.8. 3 weeks after stimulation, effector cells should return to rest state and are ready to be used. Purity and reactivity of effector cells should be checked prior to *in vivo* injection.

2) Preoperative effector cells preparation (20x10⁶ cells in 15 µL PBS per mouse)

2.1. Check effector cell count, wash twice in sterile PBS and collect cells in one 50mL tube (prepare at least 50×10^6 cells in addition).

2.2. Carefully and completely take off the supernatant by pipetting.

2.3. Resuspend cells in the half of final volume of sterile PBS and homogenize carefully.

2.4. Evaluate the volume of cell suspension (by using micropipette), complete to the final volume $(20x10^6 \text{ cells in } 15 \ \mu\text{L PBS} \text{ per mouse})$ and homogenize carefully.

2.5. Transfer the cells in microtube and verify the final volume by pipetting. Final volume per mouse could be superior to 15 μ L due to the cell volume, but imperatively inferior to 20 μ L.

2.6. Keep on ice until injection (no longer than 2 hours).

3) Stereotactic injection: surgical procedure

3.1. Equipment setup

3.1.1. Assemble and calibrate small animal stereotaxic frame (Stoelting Co. Wooddale, IL) accordingly to manufacturer's instructions to ensure most accurate intracranial injection and microsyringe pump injector (*e.g.* SYS Micro4 micropump automated injector; WPI, Sarasota, Fl)

with regard to syringe size (*e.g.* NanoFil Syringe; WPI), desired volume and rate of injection. NB: Slow rate of infusion is recommended (*i.e.* 2-3 µl per minute).

3.1.2. Install the material under a MSC (Microbial Safety Cabinet) to maintain the sterility of the instruments and protect mice from infection.

NB: Place" isothermal blocs" in water bath at 37 °C. This system limits mouse hypothermia during surgery. Heating pad necessary for post-procedural care must be used in addition to continuous temperature monitoring.

3.2. Preoperative animal preparation

3.2.1. Anesthetize mouse by intraperitoneal injection of ketamine (10 mg/mL) and xylazine (0.1 mg/mL) at 10 μ L/g of mouse.

3.2.2. Make a toe pinch to ensure that the animal is adequately anesthetized and painkilled. NB: Any movement is an indication of non-deep analgesia and few more minutes would be required before repeating the operation.

3.2.3. When the mouse is properly anesthetized, remove hair from the surgical site (between the 2 ears until the nose).

3.2.4. Place a lubricating ophthalmic ointment (*e.g.* ocrygel) in the mouse's eye to prevent drying of the cornea.

3.2.5. Disinfect the surgical site with cotton tipped swabs soaked in Povidone-iodine 5 % solution (*e.g.* vetidine) at least 3 times.

3.2.6 Then, position the anesthetized mouse on the stereotactic frame, on a warm "isothermal bloc" covered with sterile plastic wrap to maintain mouse temperature during surgery and limit mortality. NB: Mouse's nose and teeth should be appropriately positioned above the tooth bar, to ensure adequate respiratory flow during procedure.

3.2.7. Once the mouse is in the correct position, tighten ear bars firmly under mouse ears to immobilize the head. NB: Be careful to not damage the eardrums or compromise the respiration.

3.3. Preoperative cell preparation

3.3.1. Resuspend cells slowly with pipette 5-10 times prior to each injection to prevent cell clumping.

3.3.2 Draw suitable cell suspension volume (15-20 μ l) into syringe with great care to avoid aspiration of bubbles. Confirmation of successful loading into syringe is critical, as variance in volumes injected between animals can lead to significant variability in animal treatments. Following loading, clean exterior of syringe needle with alcohol swab. NB: Reload cells for each individual injection between procedures to prevent any clump or clog and to ensure a consistent number of cells injected across animal cohort.

3.4. Procedural care

3.4.1 Make a 1 cm midline sagittal skin incision with sterile scissors along the upper part of the cranium from anterior to posterior to expose the skull.

3.4.2 Identify the intersection of the sagittal and coronal sutures (Bregma) to serve as landmarks for stereotactic localization prior to injection (Figure 1).

3.4.3 Using a microdrill, make a small hole in the skull with sterile drill bit at predetermined coordinates (2 mm right lateral and 0.5 mm anterior of the Bregma). NB: be careful to remain superficial in order to avoid traumatic injury of the mouse brain.

3.5. Injection of immune effector cells

3.5.1. Insert syringe carefully into the drilled hole, move slowly forward the needle 3 mm deeper in the dura and then backward 0.5 mm to a final depth of 2.5 mm prior to injecting cells.

3.5.2. Run the cell injection at 2-3 μ L/min and monitor the mice all along the injection time.

3.5.3 Once injection is complete, withdraw the needle for only 1 mm and keep syringe in place for one additional minute before slowly withdrawing completely the syringe to prevent any leakage from the infusion site.

NB: Following removal of animal from stereotaxic device, immediately clean syringes and injection equipment for future use.

3.6. Postoperative care and follow-up

3.6.1. Remove the animal from stereotaxic frame, immediately apply Povidone-iodine 5 % solution on the incision and close skin with appropriate surgical suture (*e.g.* 4-0 vicryl; Ethicon, Somerville, NJ).

3.6.2. Then apply 2 % lidocaine gel (*e.g.* Xylocaine; Astrazeneca, London, UK) directly on the wound and administer 0.15 μ g/g of buprenorphine by subcutaneous injection for post-procedural analgesia.

3.6.3. Transfer anesthetized mouse to its respective cage above heating pad set to 37 °C to maintain appropriate mouse body temperature and avoid any hypothermia.

3.6.4. Monitor mouse until full recovery from anesthesia and transfer them to housing room.

3.6.5. Mice are daily observed and euthanized when any declining health signs are observed (e.g. hunched posture, reduced mobility, prostratation or significant body weight loss ($\geq 15\%$)).

REPRESENTATIVE RESULTS

This paper describes our adoptive transfer strategy in brain tumor bearing mice model based on effector cells stereotaxic injection directly within the tumor bed.

To avoid brain injury due to the injected volume, the cell effector suspension has to be concentrated $(20x10^6 \text{ in } 15\text{-}20 \ \mu\text{L} \text{ PBS})$. In order to analyzed whether this cell preparation could affect effector cell viability cells were prepared accordingly to the described protocol and then were loaded in microsyringe. Effector cell were then collected immediately or 10 min after loading and were analyzed by flow cytometry for propidium iodide (PI) staining at 0, 24 or 72 h. Interestingly, the preparation and the loading in the 10 μL microsyringe did not significantly affect the viability of effector cells for at least 24 h (Figure 2A-B). Slightly but non-significant augmentation of PI⁺ cells

was observed at 72 h (14 % compared to 11 % for unloaded cells). Similarly, the reactivity of unprepared or 3 hours on ice prepared effector cells was analyzed. Effector cells were cocultured with brain tumor cells for 4h in presence of anti-CD107a mAb. CD107a expression demonstrated that the effector cells reactivity was not affected by the preparation and the microsyringe loading (Figure 2C).

To evaluate whether effector cells, survived and moved within the brain parenchyma following their intra-tumoral implantation, $20x10^6$ of effector cells were injected on the tumor site in mice bearing brain tumor. Seven days later, mice brain were collected, sectioned and stain for hematoxylin, eosin and safran coloration (HES) and anti-human CD3 mAb (IHC). While HES coloration allowed identification of tumor structure (Figure 3, left panel), CD3 staining allowed localization of effector cell (here $\gamma\delta$ T cells) (Figure 3, right panel). Interestingly, effector cells were found around the tumor (Figures 3, upper right panel), in the tumor core (Figures 3, middle right panel) but also in contralateral hemisphere (Figure 3, bottom right panel).

To go further, human effector T cells were isolated from mouse brain 48 hours after their injection in mouse brain and analyzed. Interestingly, effector cells were still able to proliferate after non-specific PHA feeder-IL2 stimulation with a 99% purity after amplification (Figure 4).

Collectively, these data showed that effector cells were able to survive at least 7 days within the brain, could patrol within the tumor and healthy brain tissue and were still able to proliferate and then to be effective.

DISCUSSION

Adoptive transfer of effector cells represents promising approaches to efficiently treat malignant infiltrative brain tumors with limited deleterious effects on healthy cells. However, central nervous system is characterized by a particular immune status, notably due to the existence of the blood-brain barrier and the absence of classical lymphatic drainage system (Bailey et al 2006⁸; Louveau et al 2015⁹). These physiological features limit effector cell trafficking within the brain parenchyma and might counteract the effects of systemic injections of cellular effectors. To overcome these hindrances, intraparenchymal injections have been envisaged. This route of administration takes advantage that effector cells are delivered closely to the tumor site which also limits their dilution within the tissues and the organism. As intraparenchymal delivering might also induce deleterious effects (eg, compression) directly linked to the injection process, this procedure requires very small volume of injection. This issue is especially critical in animal experimentations in which brain tumors are not surgically excised.

In this paper we describe our therapeutical approaches for orthotopic anti-tumor strategies, based on local injection(s) of $20x10^6$ of effector cells, in mice with invasive brain tumors. The first step of this protocol describes a standard procedure for effector cell amplification by non-specific PHA-feeders-

IL2 stimulation that leads to the production of a large amount of effector cells allowing the utilization of the same batch of effector cells.

The second step of this protocol focuses on the preparation of the effector cells suspension on the day of experiments $(20x10^6 \text{ in } 15\text{-}20 \ \mu\text{L} \text{ PBS})$. This essential step requires highly concentrated cell suspension without affecting the viability and reactivity of effector cells against tumoral cells.

Finally, regarding *in vivo* experiments, the preparation of effector cells and their injection within the tumor core lead to their dissemination not only within the tumor but also in the surrounding brain tissue. Interestingly, injected effector cells keep their ability to be activated and amplified after their preparation/injection within the brain. Collectively, these features should be essential to allow the elimination of strong infiltrative tumor cells that characterize brain tumor (Singh et al 2004). Of note, special care has to be taken both during the injection and the removal of the syringe to avoid any brain lesion or effector cells leak. Interestingly, several injections of effector cells can be performed (at least once a week for 3 weeks) without any visible deleterious effect on mice.

In conclusion, this paper described a procedure allowing the delivering of a large amount of effector cells within the brain tumor environment without harmful effect on effector cells (viability nor reactivity) and importantly without any visible deleterious effect on mice. Our recent publication (Jarry et al, 2016) demonstrates that effector T cells can efficiently eliminate tumoral cells, including cells that have deeply infiltrated brain parenchyma, in a murine orthotopic model of highly invasive GBM using this protocol. This protocol opens new opportunity for the establishment of adoptive transfer procedure in mice model of brain tumor, essential step before considering preclinical studies.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank the staff of University Hospital animal facility of Nantes for animal husbandry and care, the cellular and tissular imaging core facility of Nantes university (MicroPICell) for imaging, and the Cytometry Facility Cytocell from Nantes for their expert technical assistance.

DISCLOSURES

The authors disclose no potential conflicts of interest

REFERENCES

- 1. Stupp R, Roila F. Malignant glioma: ESMO clinical recommendations for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol.* 2009; 20 Suppl 4:126-128.
- 2. Weller M, Cloughesy T, Perry JR, Wick W. Standards of care for treatment of recurrent glioblastoma--are we there yet? *Neuro-oncology*. 2013; 15(1):4-27.
- 3. Vauleon E, Avril T, Collet B, Mosser J, Quillien V. Overview of cellular immunotherapy for patients with glioblastoma. *Clin Dev Immunol.* 2010; 2010.
- 4. Brown CE, Alizadeh D, Starr R, et al. Regression of Glioblastoma after Chimeric Antigen Receptor T-Cell Therapy. *N Engl J Med.* 2016; 375(26):2561-2569.
- 5. Jarry U, Chauvin C, Joalland N, et al. Stereotaxic administrations of allogeneic human Vgamma9Vdelta2 T cells efficiently control the development of human glioblastoma brain tumors. *Oncoimmunology*. 2016; 5(6):e1168554.
- 6. Dutoit V, Herold-Mende C, Hilf N, et al. Exploiting the glioblastoma peptidome to discover novel tumour-associated antigens for immunotherapy. *Brain : a journal of neurology.* 2012; 135(Pt 4):1042-1054.
- 7. Clemenceau B, Valsesia-Wittmann S, Jallas AC, et al. In Vitro and In Vivo Comparison of Lymphocytes Transduced with a Human CD16 or with a Chimeric Antigen Receptor Reveals Potential Off-Target Interactions due to the IgG2 CH2-CH3 CAR-Spacer. *Journal of immunology research.* 2015; 2015;482089.
- 8. Bailey SL, Carpentier PA, McMahon EJ, Begolka WS, Miller SD. Innate and adaptive immune responses of the central nervous system. *Critical reviews in immunology*. 2006; 26(2):149-188.
- 9. Louveau A, Smirnov I, Keyes TJ, et al. Structural and functional features of central nervous system lymphatic vessels. *Nature*. 2015; 523(7560):337-341.
- 10. Singh SK, Hawkins C, Clarke ID, et al. Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature*. 2004; 432(7015):396-401.



Figure 1: Picture of the main anatomical landmarks on the mouse skull including sagittal (red) and coronal (blue) sutures and their intersection (Bregma) used to orient site of injection.


Figure 2: Viability and reactivity of effector cells after microsyringe loading. Effector cells ($\gamma\delta$ T cells) were prepared accordingly to the procedure described ($20x10^{6}$ in 15-20 µL PBS, see section 2 of the protocol) and then were loaded in the microsyringe. Instantly or 10 min after incubation at room temperature, cells were collected in culture medium and keep at 37°C, 5% CO2. Propidium iodide (PI) staining was performed immediately after collection or 24 or 72 h later. Unloaded cells were used as control. (A) Representative result of FSC and SSC gating on effector cells (left panel) and of PI staining (right panel). (B) Compiled results of PI staining (n=3; p>0,05). (C) Representative results of effector cell reactivity. Unprepared cells (left panel) or cells prepared and stayed 3 hours on ice were coculture 4 hours with GBM tumor cells in presence of anti-CD107a mAb (degranulation marker). Effector cells were then washed, stained with anti-V δ 2 mAb ($\gamma\delta$ T cells specific marker) and analyzed by flow cytometry.



Figure 3: Effector cells patrol within the brain of tumor-bearing mice. 20×10^6 effector cells were injected in brain tumor-bearing mice and one week later, brain was removed, sectioned and stain with HES coloration (hematoxylin, eosin and safran) (left panel) or with anti-CD3 mAb (right panel). Result are representative of 3 distinct experiments.



Figure 4: T cells recovered after brain injection retain ability to proliferate in vitro. Human T cells $(4x10^6)$, here CMV-specific T cells) were injected in mice brain and isolated 48 hours later (using Adult Brain Dissociation Kit, mouse and rat; Myltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, Germany) accordingly to manufacturer instruction. The percentage of human T cells in the brain cells preparation was evaluated after staining using an anti-human CD3 antibody (bottom panel). Then brain cells were seeded at 10 cells per well in 96-well U-bottomed plates and stimulated by PHA-feeders-IL2. On day 10 after, $13.3x10^6$ of human T cells were obtained and stained with anti-human CD3 antibody to evaluate the purity (right panel). From the time they were harvested from the brain, human T cells were able to undergo 16 doubling cycles in 20 days.





Thèse de Doctorat

Cynthia CHAUVIN-FLEURENCE

Thérapie cellulaire adoptive pour le glioblastome multiforme : analyse des cibles tumorales et de leur reconnaissance par les lymphocytes T Vγ9Vδ2

Adoptive cell therapy for glioblastoma multiforme: tumor target cells analysis and recognition by Vγ9Vδ2 T lymphocytes

Résumé

Le glioblastome multiforme (GBM) est la tumeur cérébrale primaire la plus fréquente et aggressive chez l'adulte, avec peu d'efficacité thérapeutique et un prognostic sombre. L'immunothérapie cellulaire permettrait de cibler et d'éliminer les cellules tumorales infiltrantes/résistantes impliquées dans la rechute des patients. Les lymphocytes T Vy9Vδ2 (LT Vy9Vδ2) nonalloréactifs sont capables de tuer les cellules tumorales et présentent des fonctions effectrices les faisant figurer parmi les populations immunitaires candidates pour l'immunothérapie. Mes travaux de thèse ont consisté à caractériser des cultures primaires de GBM (pGBM) d'un point de vue phénotypique, métabolique et transcriptomique puis d'analyser leur reconnaissance et leur élimination par les LT Vγ9Vδ2. L'implantation orthotopique de pGBM humaines chez la souris NSG a conduit à des profils tumoraux dont l'hétérogénéité et l'infiltration sont semblables à ceux observés chez les patients. Par ailleurs, les LT Vy9V δ 2 sont non seulement capables de survivre et de patrouiller dans le cerveau après transfert adoptif mais aussi d'éliminer les pGBM infiltrantes suite à un traitement intracrânien au zolédronate. Afin de s'affranchir de cette sensibilisation, plusieurs LT Vy9V $\delta 2$ humains ont été générés (PBMCs de donneurs sains) puis criblés pour leur capacité à réagir naturellement contre les pGBM. Ces travaux mettent en exergue une élimination spontanée préférentielle des pGBM de sous-type mésenchymateux via l'implication du TCR-γδ et de NKG2D. Ce travail de thèse apporte une importante preuve de concept pour les immuno-thérapies des tumeurs cérébrales et identifie des voies moléculaires qui nécessiteront d'être explorées avant de considérer les LT Vγ9Vδ2 en approche clinique.

Mots clés

Glioblastome multiforme ; immunothérapie ; lymphocytes T γδ ; transfert adoptif ; xénogreffes intracrânniennes

Abstract

Glioblastoma multiform (GBM) is the most frequent and aggressive primary brain tumor in adults, with a dismal prognosis and few therapeutic advances made over the last decade. Cellular immunotherapies are currently being explored to eliminate highly invasive/resistant GBM cells likely involved in tumor relapse. Nonalloreactive human Vy9Vo2 T lymphocytes are able to kill a wide range of human tumor cells and display effector functions setting them up as promising cell candidates for efficient immunotherapies. The work described in this thesis aimed at characterizing primary GBM (pGBM) cultures, through phenotypic, metabolic and transcriptomic analyses and at investigating their recognition and killing by Vy9Vo2 T cells both in vitro and in vivo. We showed that immunodeficient NSG mice orthotopic human pGBM xenografts carrying recapitulate tumor development in patients. Furthermore, we demonstrated that $V\gamma9V\delta2~T$ cells can survive and patrol within the brain following adoptive transfer and successfully eliminate infiltrative pGBM cells orthotopic zoledronate treatment. In order to bypass this sensitization, several human Vγ9Vδ2 T cells have been isolated and amplified from PBMCs of healthy donors and screened for their ability to naturally and specifically react against pGBM cells. These results evidence that allogeneic Vy9V δ 2 T lymphocytes efficiently and preferentially eliminate mesenchymal pGBM cells through γδ-TCR- and NKG2D-dependent pathways. Taken together, these results provide an important proof-of-concept for optimized targeted immunotherapies of brain tumors and identify pathways that need to be explored before considering human Vy9V δ 2 T cells in clinical approaches.

Key Words Glioblastoma multiform ; immunotherapy ; γδ T lymphocytes ; adoptive transfert ; intracranial xenografts