

ANNÉE 2012

N° 052

THÈSE
pour le
DIPLOME D'ÉTAT
DE DOCTEUR EN PHARMACIE

par

Nicolas Gautier

Présentée et soutenue publiquement le 28 septembre 2012

Le marqueur gangliosidique tumoral GD2 :
intérêt pour le ciblage du neuroblastome

Président : Mr. Alain PINEAU, Professeur de Toxicologie, Doyen de la faculté de pharmacie de Nantes

Membres du jury : Mr. Stéphane BIRKLE, Maître de conférence d'Immunologie -Nantes
Mme Estelle THEBAUD, Médecin du service d'hématologie et oncologie pédiatrique du CHU Nantes

Table des matières

Liste des abréviations	4
Liste des figures	7
Liste des tableaux	8
Liste des annexes	8
Remerciements	9
Historique	10
INTRODUCTION	12
PREMIÈRE PARTIE : Revue bibliographique sur le neuroblastome et le marqueur gangliosidique GD2	
I. Le neuroblastome	17
1. Définition	17
2. Situation épidémiologique	19
3. Physiopathologie du neuroblastome	22
a. Classification	
b. Étiologies	
c. Facteurs de risque et de protection	
d. Symptômes	
4. Diagnostic	27
5. Dépistage	Erreur ! Signet non défini.
6. Pronostic	Erreur ! Signet non défini.
7. Prise en charge du neuroblastome	70
a. Introduction	
b. Chirurgie	
c. Chimiothérapie	
d. Greffe de cellules souches hématopoïétiques	
e. Radiothérapie	
f. Immunothérapie	
g. Synthèse de la prise en charge	
h. Parcours des malades atteints de neuroblastome	
i. Conclusion	
II. Le marqueur gangliosidique tumoral GD2	39
1. Structure	39
a. Structure générale	
b. Le ganglioside GD2	

	<u>2. Métabolisme du ganglioside GD2</u>	41
	a. Biosynthèse	
	b. Catabolisme	
	<u>3. Distribution tissulaire</u>	42
	a. Tissus sains	
	b. Tissus tumoraux	
	<u>4. Fonctions biologiques</u>	44
	<u>5. Pouvoir immunogène</u>	45
III.	<u>Immunciblage thérapeutique du marqueur gangliosidique tumorale GD2</u>	46
	<u>1. Présentation des anticorps monoclonaux</u>	46
	<u>2. Les AcM dans la prise en charge du neuroblastome</u>	48
	a. L'anticorps monoclonal de souris 3F8	
	b. L'anticorps monoclonal de souris 14G2a	
	c. L'anticorps chimérique ch14.18	
	d. Les anticorps humanisés hu14.18 et hu14.18K322A	
	e. Anticorps conjugués	
	f. Adjuvant à l'immunothérapie	
	g. Immunothérapie active	
	h. Lymphocytes T exprimant un TCR chimérique spécifique du GD2	
	<u>3. Les résultats cliniques</u>	56
	a. Introduction	
	b. Anticorps monoclonal murin 3F8	
	c. Anticorps monoclonal murin 14G2a	
	d. Anticorps chimérique ch14.18	
	e. Anticorps humanisés hu14.18 et huK322A	
	f. Anticorps conjugués	
	<u>4. Amélioration de l'immunothérapie</u>	63
	a. Mécanismes mis en jeu	
	b. Voies d'optimisation des anticorps ciblant le GD2	

SECONDE PARTIE : Production et évaluation des propriétés biologiques d'anticorps monoclonaux spécifiques du GD2 O-acétylé

I.	<u>Introduction</u>	67
II.	<u>Matériel et méthodes</u>	68
	<u>1. Lignées cellulaires</u>	68
	<u>2. Hybridomes</u>	68
	<u>3. Milieux de culture</u>	69
	<u>4. Évaluation de la viabilité cellulaire</u>	69
	<u>5. Purification des AcM par chromatographie d'affinité</u>	70
	<u>6. Test immunoenzymatique ELISA sur cellules dessiquées</u>	71
	<u>7. Cytométrie en flux sur cellules vivantes</u>	71
	<u>8. Analyse électrophorétique SDS-PAGE</u>	72
	<u>9. Test d'inhibition de la prolifération cellulaire au MTT</u>	70
III.	<u>Résultats</u>	74
	<u>1. Production des anticorps monoclonaux 8B6 et 10B8</u>	74
	a. Suivi de croissance cellulaire	
	b. Purification des anticorps monoclonaux à partir du surnageant de culture	
	c. Analyse de la pureté des anticorps purifiés	
	d. Analyse de la spécificité des anticorps monoclonaux	
	<u>2. Criblage des anticorps monoclonaux et des ACC par la méthode MTT</u>	82
	a. Mise au point de la méthode	
	b. Résultats obtenus	
	c. Discussion	
	<u>3. Rédaction de documents à visée BPL</u>	85
	a. Les procédures opérationnelles standardisées	
	b. Le dossier de lot de l'AcM 8B6	
	<u>DISCUSSION</u>	88
	<u>CONCLUSION</u>	91
	<u>BIBLIOGRAPHIE</u>	93
	<u>ANNEXES</u>	106

Liste des abréviations

ABTS	2,2'-azino-di-(3-ethylbenthiazoline sulfonate (6))
Ac	Anticorps
AcM	Anticorps monoclonaux
ACC	Agent de chimiothérapie conventionnel
AcP	Anticorps polyclonaux
ADCC	<i>Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity</i> : cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps
ADN	Acide désoxyribonucléique
ATCC	<i>American type culture collection</i> : collection de culture de référence Américaine
AU	<i>Arbitrary unit</i> : unité arbitraire
BIOT-GAH	<i>Biotine conjugated goat anti-human</i> : anticorps polyclonaux de chèvre anti-immunoglobulines humaines conjugués à la biotine
BIOT-GAM	<i>Biotine conjugated goat anti-mouse</i> : anticorps polyclonaux de chèvre anti-immunoglobulines de souris conjugués à la biotine
BSA	<i>Bovin serum albumin</i> : albumine sérique bovine
CDC	<i>Complement-dependent cytotoxicity</i> : cytotoxicité par activation du système du complément
CCM	Chromatographie sur couche mince
CHO (-S)	<i>Chinese hamster ovary (suspension)</i> : ovaire de hamster de Chine (en suspension)
CHU	Centre Hospitalo-Universitaire
CLCC	Centre de Lutte Contre le Cancer
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
CRA	<i>13-cis-retinoic acid</i> : acide 13-cis-rétinoïque (isotrétinoïne)
CRCNA	Centre Recherche en Cancérologie de Nantes et d'Angers
CRP	<i>C reactive protein</i> : protéine C réactive
DO	Densité optique (absorbance)
DMEM	<i>Dubelco's minimum essential medium</i> : milieu minimum de Dubelco
d.SVF	Sérum de veau fœtal décomplémenté

ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i> : dosage d'immunoabsorption par enzyme liée
FACS	<i>Fluorescence activated cell sorter</i> : cytomètre en flux
Fc	Fragment cristallisable
GAH-FITC	<i>Goat anti-human fluorescein isothiocyanate conjugated</i> : anticorps polyclonaux de chèvre anti-immunoglobulines humaines conjugués à l'isothiocyanate de fluorescéine
GAM-FITC	<i>Goat anti-mouse fluorescein isothiocyanate conjugated</i> : anticorps polyclonaux de chèvre anti-immunoglobulines de souris conjugués à l'isothiocyanate de fluorescéine
GD2	Disialoganglioside GD2 : II ³ (neuroAc) ₂ -GgOse ₃ -Cer
GLP	<i>Good laboratory practice</i> : bonne pratique de laboratoire (= BPL)
GM-CSF	<i>Granulocyte macrophage colony stimulating factor</i> : facteur de croissance pour macrophage et granulocyte
GTPase	Guanosine triphosphatase
HAHA	<i>Human anti-humanized antibody</i> : anticorps humain anti-anticorps humanisé
HAMA	<i>Human anti-mouse antibody</i> : anticorps humain anti- anticorps de souris
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i> : chromatographie en phase liquide haute performance
HT	Hypoxanthine et thymidine
HVA	<i>Homovanilic acid</i> : acide homovanilique
IC	Immunocytokine
IDRF	<i>Image-defined risk factor</i> : facteur de risque défini par l'imagerie
IgG3	Immoglobuline d'isotype gamma 3 (γ3)
INPC	<i>International Neuroblastoma Pathology Classification</i> : classification internationale de la pathologie du neuroblastome
INSERM	Institut national de la santé et de la recherche médicale
IRM	Imagerie par résonance magnétique
IUPAC-IUB	<i>International union of pure and applied chemistry - international union of biochemistry</i>
K	Chaîne légère d'immunoglobuline de type kappa
kDa	kilodalton

MTD	<i>Maximum tolerated dosis</i> : dose maximale tolérée
MTT	Bromure de 3-[4,5-diméthylthiazol-2-yl]-2,5-diphényl tetrazolium
MWCO	<i>Molecular weight cut off</i> : poids moléculaire d'exclusion (exprimé en Dalton)
NK	<i>Natural killer</i>
NR	Non renseigné
PAGE	<i>Polyacrilamid gel electrophoresis</i> : électrophorèse sur gel de polyacrylamide
PBS	<i>Phosphate buffer saline</i> : tampon phosphate salin
PFA	Paraformaldéhyde
PVDF	<i>Polyvinylidene fluoride</i> : polyfluorure de vinylidène
QSP	Quantité suffisante pour
RIT	Radio-immunothérapie
Rpm	<i>Round per minute</i> : rotation par minute
RPMI	<i>Roswell park memorial institute medium</i>
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i> : laurylsulfate de sodium
SNP	Single nucleotide polymorphism : polymorphisme nucléotidique
SNS	Système nerveux sympathique
SOP	<i>Standard operating procedure</i> : procédure opérationnelle standardisée (=POS)
TCR	<i>T-cell receptor</i> : récepteur T cellulaire
TDM	Tomodensitométrie
Tris	Tris(hydroxyméthyl)-aminométhane
VMA	<i>Vanylmandelic acid</i> : acide vanylmandélique

Liste des figures

Figure 1 : Formation de la crête neurale au cours de la neurulation	18
Figure 2 : Principales localisations du neuroblastome	19
Figure 3 : Incidence des cancers infantiles en fonction de l'âge	20
Figure 4 : Évolution annuelle de la survie à 5 ans des cancers infantiles	21
Figure 5 : Tomodensitométrie abdominale d'un patient atteint de neuroblastome	30
Figure 6 : Structure du GD2 et du GD2 <i>O</i> -acétylé	40
Figure 7 : Biosynthèse du ganglioside GD2	41
Figure 8 : Analyse immunohistologique de tissus vis-à-vis de l'expression de GD2 <i>O</i> -acétylé	43
Figure 9 : Mécanisme d'action des anticorps anti-GD2	45
Figure 10 : Structure d'une IgG	47
Figure 11 : Anticorps monoclonaux et protéines de fusion	49
Figure 12 : Structure et fonction du TCR chimérique	55
Figure 13 : Schéma simplifié de la réponse anti anti-idiotype	64
Figure 14 : Courbe de croissance cellulaire de l'hybridome 10B8	75
Figure 15 : Profil d'élution de l'AcM 8B6 purifié par chromatographie d'affinité	76
Figure 16 : Analyse électrophorétique des AcM 10B8 et 8B6 par SDS-PAGE sur gel de polyacrylamide en conditions réductrices et non réductrice	78
Figure 17 : Profil HPLC de l'AcM 8B6 avant et après dialyse	79
Figure 18 : Analyse immunoenzymatique ELISA de l'AcM 8B6 et de l'AcM 10B8	81
Figure 19 : Résultats du test MTT.	83
Figure 20 : Document type permettant la rédaction de POS	86

Liste des tableaux

<u>Tableau 1</u> : Classification INPC.	23
<u>Tableau 2</u> : Classification INRGCS.....	24
<u>Tableau 3</u> : Classification INRGSS.	25
<u>Tableau 4</u> : Prise en charge du neuroblastome en fonction du stade de la maladie.....	36
<u>Tableau 5</u> : Synthèse des évaluations cliniques pour l'AcM 3F8	57
<u>Tableau 6</u> : Synthèse des évaluations cliniques pour l'AcM 14G2a.....	59
<u>Tableau 7</u> : Synthèse des évaluations cliniques pour l'AcM ch14.18	60
<u>Tableau 8</u> : Synthèse des évaluations cliniques pour la protéine de fusion hu14.18-IL-2.....	62
<u>Tableau 9</u> : Nature, isotype et spécificité des anticorps.	68
<u>Tableau 10</u> : Type, origine et profil gangliosidique des lignées NXS2, IMR32 et EL4..	73
<u>Tableau 11</u> : Volume de surnageant et quantité d'AcM produit pour le 8B6 et 10B8	76

Liste des annexes

<u>Annexe 1</u> : Classification IDRF	107
<u>Annexe 2</u> : POS ELISA sur cellules IMR32	109
<u>Annexe 3</u> : .Dossier de lot de l'AcM 8B6	118

Remerciements

Je remercie Monsieur M. BONNEVILLE, directeur de l'unité INSERM UMRS 892 et Monsieur F. PARIS, chef de l'équipe 14, de m'avoir offert l'opportunité d'un stage de recherche ayant servi de base à la partie pratique de cette composition.

Je tiens à remercier tout particulièrement Monsieur BIRKLE pour la qualité de son encadrement, sa disponibilité et ses précieux conseils en tant que maître de stage et maître de thèse.

Merci à toute l'équipe 14 de l'UMRS 892 pour son accueil et sa gentillesse. Merci à Dennis, Alexis et Tanguy pour leurs conseils, leur bonne humeur et leur patience. Merci également à Madame DORVILLUS et au docteur SUPIOT pour leur aide et leurs conseils.

Je remercie Monsieur le doyen Alain PINEAU d'avoir accepté de présider ce jury de thèse. Merci également au docteur THEBAUD pour sa présence au sein du jury ainsi que pour son accueil au sein de l'unité d'oncologie pédiatrique du CHU de Nantes.

Merci à Emeline, Vanessa, Adrien, Axel et Corentin d'avoir contribué à rendre ces années d'études inoubliables.

Je remercie enfin ma famille pour leur patience et leur soutien. Merci notamment à Juliette pour la relecture de ce mémoire.

HISTORIQUE

L'institut de recherche thérapeutique (IRT) a été inauguré le 28 septembre 2009. Il accueille les unités mixtes de recherche Inserm/Université de Nantes :

- Les équipes du centre de recherche en cancérologie de Nantes et d'Angers (UMR 892 CRCNA), dirigées par Marc Bonneville,
- Le centre de recherche l'Institut du thorax (UMR 915) dirigé par Pierre Pacaud,
- Le laboratoire de vecteurs viraux pour transfert de gènes *in vivo* (UMR 649) dirigé par Philippe Moullier,
- L'unité de thérapeutique expérimentale (UTE IRT-UN),
- La plate forme radioactivité, institut fédératif de recherche thérapeutique (IFR 26) dirigé par Jacques Le Pendu.

J'ai effectué un stage de recherche au sein de l'équipe 14 de l'unité INSERM UMR 892 du CRCNA (Centre de Recherche en Cancérologie de Nantes et d'Angers). Cette équipe s'intéresse à une nouvelle cible thérapeutique dans le traitement du cancer : l'endothélium tumoral. En effet, des études récentes ont montré que la destruction des cellules endothéliales qui forment les vaisseaux sanguins entraîne le développement de zones anaérobies, induisant la mort cellulaire. La suppression des vaisseaux sanguins alimentant les tumeurs par des drogues ou des anticorps, inhibant les facteurs angiogéniques, induit une régression de la tumeur. Cependant, bien que l'objectif des traitements anti-cancéreux soit de réduire et de supprimer la tumeur, les résultats sont souvent limités par leur toxicité vis-à-vis des tissus normaux avoisinants et par la résistance de la tumeur.

De précédentes études menées par l'équipe 14 ont montré que l'apoptose des cellules endothéliales est directement impliquée dans la perte de l'intégrité tissulaire et dans la régression de la tumeur après exposition à des radiations ionisantes, permettant d'affirmer que l'endothélium localisé dans le microenvironnement de la tumeur est une cible majeure pour les radiations ionisantes. Le nouveau projet développé à l'INSERM unité UMR 892, est l'étude du compartiment endothélial, nouvelle cible cellulaire en oncologie, et ses implications spécifiques sur la réponse tumorale et tissulaire à l'irradiation. Le but ultime est de mieux définir la réponse de l'endothélium tumoral face à la radiothérapie et la chimiothérapie afin de limiter la toxicité vis-à-vis de l'endothélium sain.

L'équipe 14 travaille sur quatre différents sujets de recherche :

1. Comprendre les voies moléculaires radio-induites dans la cellule endothéliale initiées par la génération de céramides sphingolipidiques pro-apoptotiques et inhibées par la sphingosine-1-phosphate. L'objectif sera de déterminer l'implication du remodelage membranaire dans les domaines enrichis en céramide et le rôle de la petite GTPase Rho, régulateur clef de l'actine du cytosquelette, dans la réponse de l'endothélium à l'irradiation.
2. L'étude spécifique des effets passifs induits par l'irradiation des cellules endothéliales sur les cellules clonées de tissus normaux et tumoraux. L'identification des facteurs moléculaires sécrétés par la cellule endothéliale après irradiation qui induit la mort des cellules tumorales avoisinantes a pu aider à définir l'impact physiologique des cellules endothéliales sur la toxicité des tissus sains et la régression tumorale.
3. Le développement de nouvelles approches précliniques et cliniques sur les radiothérapies ciblées en partenariat avec le CLCC-Nantes et le CHU de Nantes.
4. Le ciblage de l'endothélium tumoral ou la modulation de sa radiosensibilité. En effet, les glycolipides surexprimés par l'endothélium vasculaire sont étudiés et des anticorps monoclonaux à visée thérapeutique dirigés contre ces antigènes glycolipidiques ont pu être développés.

Dans le cadre de ma formation à la recherche, j'ai effectué un stage au sein de l'équipe 14 de l'IRT de Nantes. Mon travail est basé sur le quatrième sujet de recherche présenté ci-dessus, en cohérence avec mon orientation vers les domaines de l'immunologie et de la cancérologie.

INTRODUCTION

Le neuroblastome est la première tumeur extra crânienne en termes d'incidence chez l'enfant de moins d'un an ^[1]. Il s'agit d'une tumeur neuroendocrinienne atteignant la crête neurale au niveau du système nerveux sympathique. Ce cancer peut prendre des formes variables allant de la tumeur bénigne régressant spontanément jusqu'aux formes agressives progressant rapidement et générant des métastases. Si les facteurs pronostiques de cette pathologie sont bien identifiés (âge du patient, grade de la tumeur, amplification de l'oncogène N-myc...), l'origine du neuroblastome est le plus souvent inconnu.

La faible spécificité des symptômes associés aux formes agressives de neuroblastome entraîne un diagnostic souvent tardif, conduisant à une prise en charge lourde : chirurgie, radiothérapie, chimiothérapie... Malgré l'efficacité des traitements actuels sur les formes de bas grade, le pronostic des formes de haut grade est souvent défavorable. De plus, on note d'importants effets secondaires induits par la prise en charge ainsi qu'un nombre élevé de rechutes après traitement ^[2]. L'ensemble de ces paramètres motive la recherche de nouvelles cibles thérapeutiques.

Parmi les stratégies explorées, l'une d'entre elles consiste à cibler le disialoganglioside GD2 (Figure 1) à l'aide d'anticorps thérapeutiques. Le GD2 est une molécule de la famille des glycosphingolipides. Ce ganglioside est exprimé à la surface des tumeurs neuro-ectodermiques telles que les mélanomes et les neuroblastomes. Il est également retrouvé, dans une moindre mesure, au niveau des nerfs périphériques et du cervelet. Par sa forte expression au niveau tumoral par rapport au tissu sain, le ganglioside GD2 constitue donc une cible intéressante dans le traitement du neuroblastome ^[3].

Les premiers anticorps dirigés contre le GD2 furent créés par Schulz et *al.* ^[4]. L'anticorps murin 3F8 a ensuite été développé par Cheung et *al.* ^[5] et fut le premier anticorps monoclonal (AcM) anti-GD2 évalué en clinique. De nombreux essais cliniques ont par la suite confirmé l'intérêt de l'utilisation de ces AcM dans la prise en charge du neuroblastome.

Les propriétés antitumorales des anticorps anti-GD2 reposent avant tout sur des mécanismes d'ADCC (*antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity* : cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps) comme cela a été démontré *in vitro* et *in vivo* chez l'animal. Le mécanisme de CDC (*complement-dependent cytotoxicity* : cytotoxicité par activation du système du complément) jouerait un rôle plus modeste dans l'éradication

des tumeurs chez l'animal. De plus, une activité pro-apoptotique par anoïkose¹ des anticorps anti-GD2 a également été décrite *in vitro*. Enfin, très peu de choses sont connues quant au devenir des anticorps anti-GD2 une fois liés à leur antigène cible à la surface des cellules tumorales.

Plusieurs effets secondaires notables ont été observés lors de l'utilisation de ces anticorps. Des phénomènes douloureux importants, liés à la fixation des AcM au niveau des fibres nerveuses périphériques ont été rapportés. Une immunisation de l'organisme, se traduisant par l'apparition d'anticorps dirigés contre les AcM est également fréquemment observée. L'élaboration de molécules mieux tolérées est donc indispensable. Des anticorps moins immunogènes ont été développés : seule une partie de ces anticorps est d'origine murine, le reste étant d'origine humaine. Ces AcM sont appelés chimériques ou humanisés. Le ciblage de la sous-population gangliosidique GD2 O-acétylé a également été proposé pour éviter les épisodes douloureux. En effet ce marqueur ne se retrouve que sur les tumeurs, évitant la fixation des AcM au niveau des fibres nerveuses. L'anticorps actuellement développé dans cette optique est le 8B6.

L'anticorps chimériques ch14.18 a été évalué jusqu'à une étude de phase III^[6,7] a présenté une amélioration notable de la tolérance. Ces résultats encourageants doivent conduire à l'investigation de nouveaux modèles d'anticorps thérapeutiques. Les premiers résultats *in vitro* obtenus avec l'AcM spécifique du GD2 O-acétylé ont prouvé sa capacité à reconnaître exclusivement le GD2 O-acétylé sans se fixer sur les tissus exprimant le GD2^[8]. Ces données encourageantes incitent à approfondir la connaissance du 8B6.

Au cours des trois mois au sein de l'IRT, mon objectif était de préparer un lot d'anticorps 8B6 nécessaire à la poursuite de son évaluation. Dans un second temps, j'ai évalué *in vitro* ce lot à l'aide d'une technique permettant d'apprécier la viabilité cellulaire : la méthode MTT. Cette méthode a pour but de démontrer la capacité de l'AcM 8B6 à inhiber la viabilité cellulaire sur des lignées de neuroblastome de souris (lignée NXS2) et humain (lignée IMR32). Compte tenu de la nécessité d'une démarche qualité au cours de ces étapes, une partie de mon travail a été dédiée à la rédaction de procédures opérationnelles standardisées (POS) et d'une fiche de lot en conformité avec les bonnes pratiques de laboratoire (BPL).

¹ Mort cellulaire par perte de contact avec la matrice extracellulaire.

Mon mémoire se divise en deux parties. Dans un premier temps, je présente une revue bibliographique détaillant la problématique du neuroblastome : épidémiologie, symptômes, diagnostic, prise en charge... Une attention particulière est portée aux études cliniques relatives au ciblage du ganglioside GD2. Dans la seconde partie de mon mémoire, je présente mes travaux réalisés au sein de l'IRT, en explicitant la production et l'évaluation du lot d'anticorps thérapeutiques ciblant le GD2 *O*-acétylé.

PREMIÈRE PARTIE

**Revue bibliographique sur le neuroblastome
et le marqueur gangliosidique GD2**

I. Le neuroblastome

1. Définition

Le neuroblastome (ou sympathoblastome) est une tumeur embryonnaire se développant au niveau de la crête neurale du système nerveux sympathique^[9] (Figure 1). La tumeur primitive apparaît le plus souvent au niveau des glandes surrénales ou du tissu nerveux du cou et de l'abdomen^[10]. Les métastases se retrouvent fréquemment au niveau osseux et hépatique (Figure 2). Ce cancer se caractérise par sa grande hétérogénéité, allant de la tumeur bénigne régressant spontanément à des formes très agressives capables de mettre en jeu le pronostic vital. Le neuroblastome apparaît majoritairement chez les enfants de moins de deux ans^[11].

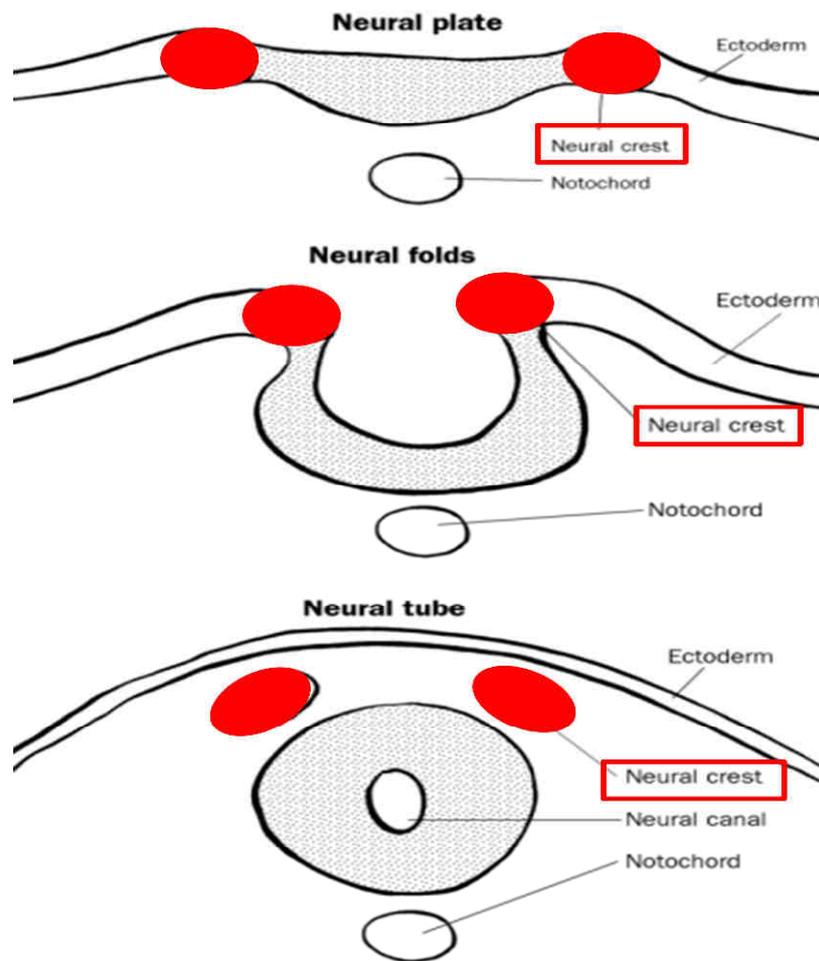


Figure 1. Formation de la crête neurale (*neural crest*) au cours de la neurulation². D'après Cotran et al. ^[12].

² Développement du système nerveux central.

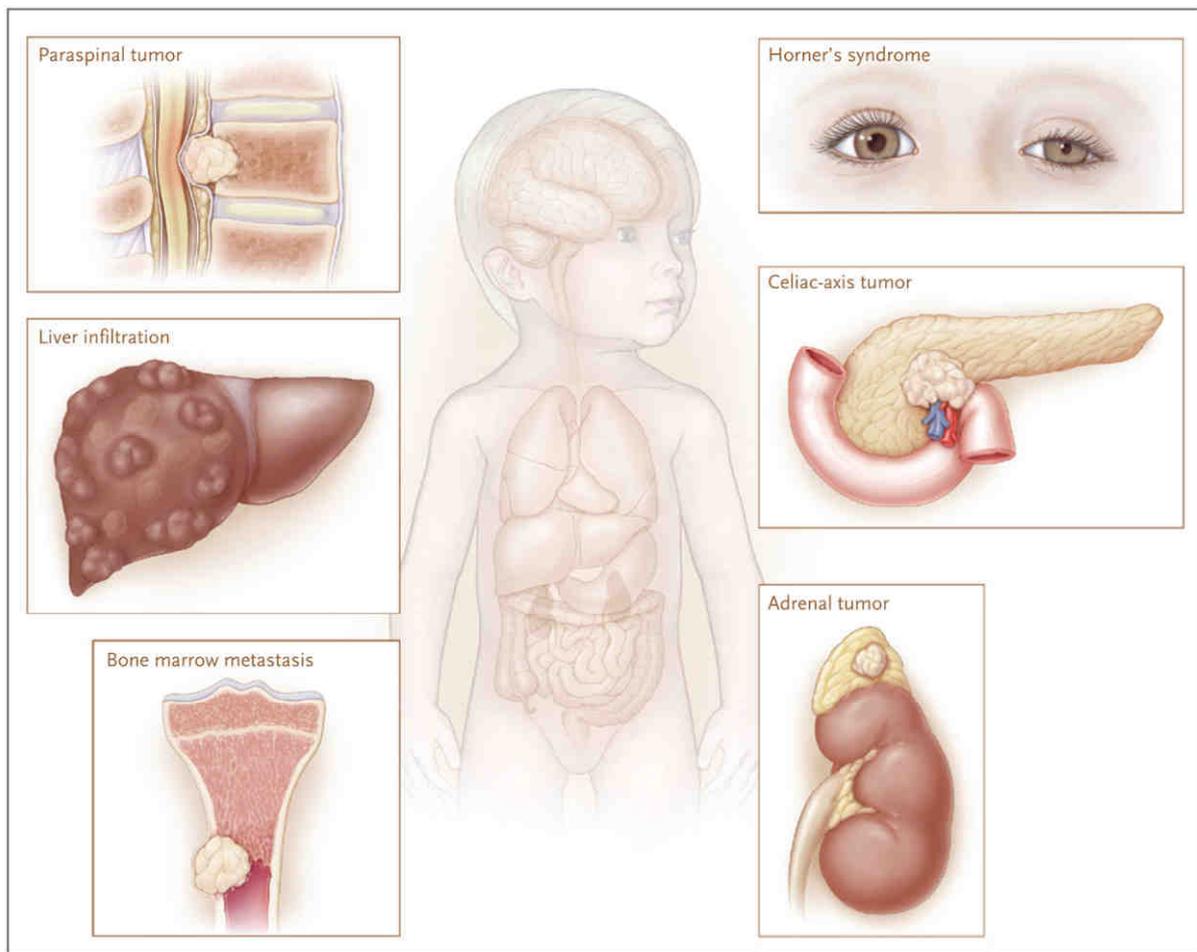


Figure 2. Principales localisations du neuroblastome. Pouvant atteindre l'ensemble du système nerveux sympathique, les tumeurs se retrouvent préférentiellement au niveau de la glande surrénale (*adrenal tumor*). Les tumeurs du cou peuvent induire le syndrome de Horner : ptosis (paupière tombante), myosis (pupille constamment contractée) et énoptalmie (œil enfoncé dans son orbite). La progression de la maladie tend à générer des métastases au niveau osseux et hépatique. D'après Maris et *al.* ^[10].

2. Situation épidémiologique

Aujourd'hui, le neuroblastome est le cancer le plus diagnostiqué chez les enfants de moins d'un an ^[1] et la tumeur extra crânienne infantile la plus répandue, avec une incidence d'un cas pour 100 000 ^[10] soit environ 150 nouveaux cas par an en France. Cette pathologie concerne principalement le jeune enfant ^[13] avec plus de 50 % des cas concernant des enfants de moins de deux ans. L'âge moyen au diagnostic est de 17 mois ^[11]. Le neuroblastome n'est que très rarement décrit chez l'adulte, avec moins de 2 % des cas ^[14].

Le neuroblastome est la tumeur du SNS (système nerveux sympathique) la plus répandue (Figure 3) et le quatrième cancer infantile en termes d'incidence (8 %) ^[15] après les leucémies (29 %) les tumeurs du système nerveux central (23 %) et les lymphomes (12 %). Environ 15 % de la mortalité infantile par cancer est imputable au neuroblastome.

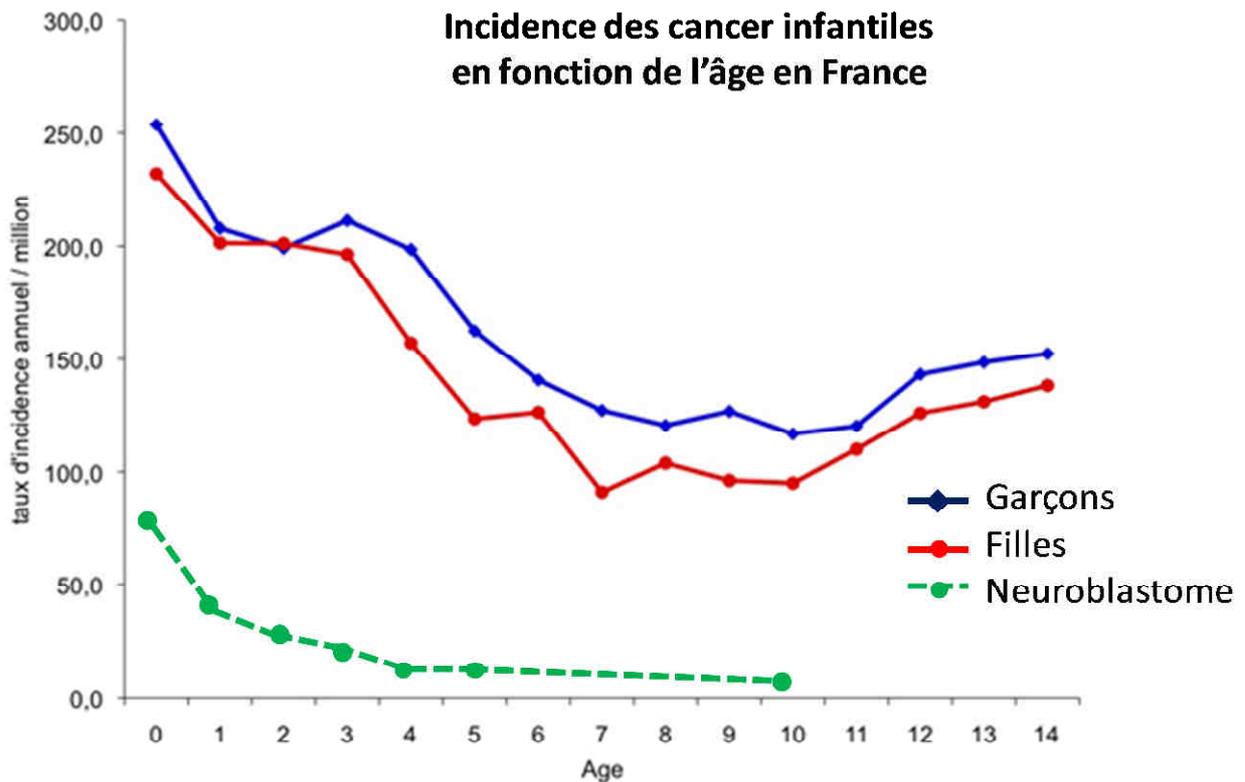


Figure 3. Incidence des cancers infantiles en fonction de l'âge. L'incidence du neuroblastome est comparable chez les filles et les garçons. L'incidence est maximale vers un an (environ 75 cas par million). L'incidence décroît en fonction de l'âge. D'après le registre national des hémopathies malignes de l'enfant et le registre national des tumeurs solides de l'enfant ^[16].

A l'inverse des autres cancers infantiles, le diagnostic de neuroblastome avant un an est un élément pronostic favorable ^[11] le taux de survie à 5 ans de ces enfants est de 90 % contre 62 % pour les enfants de 1 à 14 ans ^[17].

La mortalité liée au neuroblastome diminue depuis les années 1970, la survie à 5 ans passant de 52 % à 69 % ^[18]. Cependant, on remarque une stagnation de ce taux de survie depuis les années 1990, comme l'indique la Figure 4 ^[19]. Les chiffres concernant les

dernières années ne sont pas totalement connus, mais tendent vers des valeurs similaires malgré une prise en charge de plus en plus agressive.

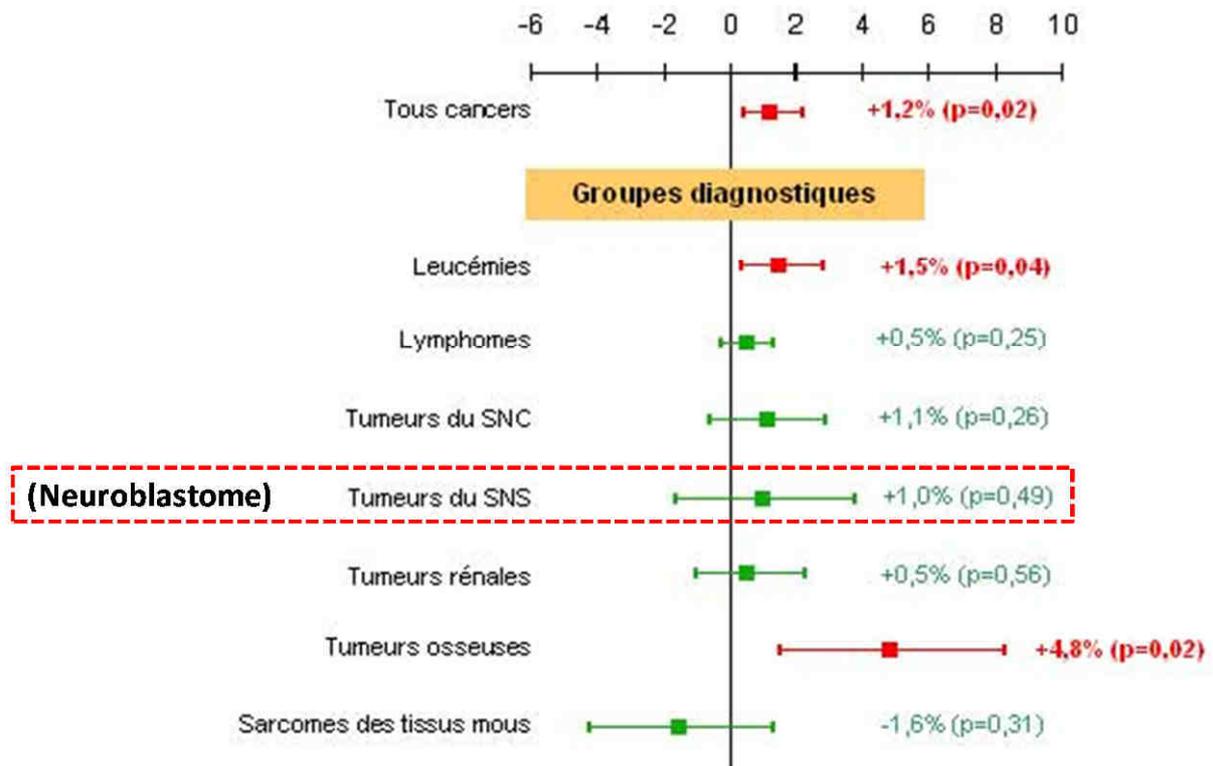


Figure 4. Évolution annuelle de la survie à 5 ans des cancers infantiles. Le graphique ci-dessus montre le pourcentage d'augmentation annuelle de la survie pour les différents types de cancer entre 1990 et 1999. Le neuroblastome (principale tumeur du SNS) ne présente pas une amélioration significative de la survie à 5 ans ^[19].

Malgré l'introduction des techniques de radiothérapie, de chimiothérapie à haute dose et de transplantation de cellules souches, l'amélioration de la survie globale n'a que peu progressée et concerne principalement les neuroblastomes de bas grade. La mise en place de nouvelles stratégies thérapeutiques dans la prise en charge du neuroblastome de haut grade est donc indispensable.

3. Physiopathologie du neuroblastome

a. Classification

Plusieurs classifications sont employées dans le but de décrire le stade et la forme de neuroblastome rencontré. Le regroupement des malades permet de faciliter la prise en charge par la mise en place de protocoles de traitements préétablis. Ces classifications reposent principalement sur des critères cliniques facilement identifiables et des marqueurs biologiques. L'élément clinique le plus déterminant est l'âge du patient. Le pronostic est d'autant plus sombre que l'âge du patient est avancé, avec un infléchissement notable du risque au-delà de 18 mois ^[11]. Seules les classifications les plus couramment utilisées sont présentées ci-dessous.

L'INSS (*International Neuroblastoma Staging System* : Système International de Classement du Neuroblastome) a établi en 1986 (révision en 1988) une classification des tumeurs ^[13,20] lors du diagnostic :

- Grade 1 : Tumeur localisée.
- Grade 2A : Tumeur unilatérale avec résection brute incomplète ; les ganglions homolatéraux et controlatéraux ne sont pas atteints.
- Grade 2B : Tumeur unilatérale avec résection brute complète ou incomplète ; le ganglion homolatéral est atteint ; le ganglion controlatéral n'est pas atteint.
- Grade 3 : Tumeur bilatérale avec ou sans atteinte régionale ganglionnaire ; ou tumeur unilatérale avec atteinte ganglionnaire controlatérale ; ou tumeur de la ligne médiane avec atteinte ganglionnaire bilatérale.
- Grade 4 : Dissémination tumorale vers des ganglions lymphatiques distants de la tumeur primaire ou vers la moelle osseuse, les os, le foie ou tout autre organe à l'exception de ceux définis par le grade 4S.
- Grade 4S : Âge inférieur à 1 an avec tumeur primaire localisée telle que défini pour le grade 1 ou 2, avec dissémination limitée au foie, la peau ou la moelle osseuse (moins de 10 % des cellules de la moelle sont des tumeurs).

En 1999, Shimada et al. [21] proposent la classification INPC (*International Neuroblastoma Pathology Classification* : Classification internationale de la pathologie du neuroblastome). Cette classification prend en compte l'âge du patient, la différenciation tumorale, le taux de renouvellement cellulaire et la présence ou non d'un développement du stroma schwannien³. Il en résulte quatre sous groupes présentés dans le Tableau 1. Plusieurs études ont confirmé par la suite la pertinence de cette classification [22,23].

En 2000, Umehara et al. [24] démontrent l'existence d'une sous-population moins agressive dans la catégorie des ganglioneuroblastomes nodulaires (forme présentant le plus mauvais pronostic) en se basant principalement sur l'histologie de la tumeur : classique (un seul nodule, visible à l'œil nu) ou variant (multiples nodules, nodule non observable...), la forme classique étant associée à un meilleur pronostic. L'INPC fut donc révisée en 2003 [25] et comprend désormais les deux sous groupes (favorable / défavorable) pour les ganglioneuroblastomes.

Pour l'ensemble de la classification INPC, une tumeur non différenciée, un stroma riche et un score MKI⁴ (*mitosis karyorrhexis index*) élevé sont de mauvais pronostics.

Dénomination	Stroma	Sous-type des cellules neuroblastiques
Neuroblastome	Pauvre	-Indifférencié -Peu différencié -Différenciant
Ganglioneuroblastome mixte	Riche	Multiples foyers microscopiques de cellules neuroblastiques
Ganglioneuroblastome nodulaire	Riche par place Pauvre par place	-Nodules macroscopiques à stroma pauvre -Inclus dans de larges zones à stroma riche
Ganglioneurome	Riche	Schwannien prédominant

Tableau 1. Classification INPC (version de 1999) [26].

Dans le but d'améliorer la prise en charge du neuroblastome et de faciliter la comparaison des groupes de malades lors d'essais cliniques, l'INRG (*International*

³ Cellules de support et de nutrition des fibres nerveuses sympathiques.

⁴ Somme des cellules en mitose et en dégénérescence.

Neuroblastoma Risk Group : groupe de risque international de neuroblastome) a été développée ^[27]. Ce consensus a permis d'élaborer deux classifications :

- L'INRGCS (*International Neuroblastoma Risk Group Classification System*) est le fruit d'une étude internationale (Amérique du nord, Australie, Europe et Japon) regroupant 8800 enfants atteints de neuroblastome entre 1990 et 2002. Elle regroupe les patients en fonction du risque de rechute à 5 ans (Tableau 2). Les facteurs les plus significatifs pour cette classification sont l'âge, les caractéristiques histologiques de la tumeur, l'amplification du gène N-myc, l'état du chromosome 11q et la diploïdie de l'ADN ^[28].

- L'INRGSS (*International Neuroblastoma Risk Group Staging System* : système de classification de groupe international de neuroblastome) est issu de l'étude de 661 patients européens (Grade 1, 2 ou 3 de la classification INSS). Cette classification (Tableau 3) repose sur les facteurs de risques définis par l'imagerie (IDRF : *image defined risk factors*), éléments observables par imagerie et définissant la morphologie de la tumeur (Annexe 1) ^[27].

Groupe de risque	EFS à 5 ans
Très bas risque	> 85 %
Bas risque	< 85% et > 70%
Risque intermédiaire	< 70% et > 50%
Haut risque	< 50%

Tableau 2. Classification INRGCS. Les résultats indiquent le pourcentage de la population qui ne rechute pas durant les cinq ans suivant le traitement. EFS : *event-free survival* (survie sans évènement)

Stade	Description
L1	Tumeur localisé n'infiltrant pas de structures vitales (évaluées par l'imagerie initiale) et limitée à un seul compartiment corporel
L2	Tumeur loco-régionale comportant 1 ou plusieurs facteurs de risque définis par l'imagerie
M	Métastases à distance sauf ce qui définit le stade MS
MS	Maladie métastatique chez un enfant de < de 18 mois Métastases limitées à la peau, au foie et/ou la moelle osseuse

Tableau 3. Classification INRGSS ^[26].

En 2005, Vandesompele et *al.* ^[29] ont proposé une classification en fonction du profil cytogénétique du neuroblastome :

- Sous type 1 : La plupart des anomalies concernent des gains ou des pertes d'un chromosome entier, avec une prédominance de triploïdie. La plupart de ces neuroblastomes ne sont pas métastatiques.

- Sous type 2A : Délétion 11q (correspondant à la perte du bras long ou région q au niveau du chromosome 11) ou addition 17q (gain d'un bras long sur le chromosome 17) sans amplification du gène N-myc. Les neuroblastomes sont souvent métastatiques.

- Sous type 2B : Délétion 11q ou addition 17q avec amplification de N-myc. On retrouve souvent une délétion 1p (perte du bras court du chromosome 1) et une addition 17p (gain d'un bras court sur le chromosome 17). Ce sous type est la forme la plus grave.

b. Étiologies

La majorité des neuroblastomes ne possède pas de cause connue. Cependant, une mutation du gène ALK (*anaplastic lymphoma kinase*) mis en évidence par Mossé et *al.* ^[30] est responsable d'une forme de neuroblastome congénital. Cette mutation du récepteur de la tyrosine kinase concerne environ 8 % des cas ^[31].

Des syndromes de prédisposition ont également été décrits : neurofibromatose de type 1, maladie de Hirschsprung et syndrome d' Ondine ^[32]. Des recherches concernant ces

deux dernières pathologies ont mis en évidence une mutation (PHOX2B) entraînant une prédisposition au neuroblastome [33,34].

Une étude des SNP (*single nucleotide polymorphism*) ou polymorphisme nucléotidique a mis en évidence un gène de prédisposition aux formes métastatiques de neuroblastome au niveau de la bande chromosomique 6p22 [35]. De même, une mutation au niveau du locus BARD1 est responsable de l'apparition de formes agressives de neuroblastome [36].

Enfin, le sex-ratio de cette maladie est proche de 1, ce qui signifie que le sexe n'entre pas en compte dans la prédisposition au neuroblastome [37].

c. Facteurs de risque et de protection

De nombreuses études ont également recherché des facteurs influençant l'incidence du neuroblastome. Le rôle protecteur des vitamines et minéraux administrés pendant la grossesse vis-à-vis du neuroblastome a été démontré [38,39]. Ces données sont confortées par les travaux effectués sur l'acide folique [40,41]. L'étude canadienne de French et *al.* [41] démontre notamment une diminution de l'incidence du neuroblastome de plus de 60 % (0.62 au lieu de 1.57 pour 10 000 naissances) lors d'apport d'acide folique pendant la grossesse. La consommation d'alcool et de tabac ne semble pas constituer un facteur de risque [42].

d. Symptômes

Les manifestations cliniques du neuroblastome sont très variables. Elles dépendent du site de la tumeur primitive, le plus souvent dans l'abdomen, le long de la colonne vertébrale ou dans une glande surrénale [43].

Les symptômes les plus courants sont des douleurs abdominales trainantes, variables et non spécifiques. La douleur chronique peut devenir parfois aiguë en raison d'un saignement dans ou autour de la tumeur. Les tumeurs pelviennes sont le plus souvent

révélées par des troubles neurologiques : douleurs d'un membre inférieur, paralysie partielle d'un membre, troubles de la miction ou de la défécation.

Les symptômes liés aux métastases sont également révélateurs, compte tenu de la forte prévalence des métastases lors du diagnostic (environ 60 %). On retrouve chez le nourrisson une gêne respiratoire due à la localisation hépatique des métastases. Dans les cas d'évolution rapide, cette gêne peut engager le pronostic vital du patient. Les métastases hépatiques peuvent induire un syndrome de Pepper, avec une hépatomégalie très marquée.

Chez les patients plus âgés, ce sont les métastases ostéomédullaires qui sont le plus souvent à l'origine des symptômes. On note une fatigue générale, associée à des douleurs osseuses localisées ou plus fréquemment diffuses. Elles peuvent être responsables d'une boiterie. Elles sont souvent prises à tort pour des douleurs de croissance ou attribuées à un traumatisme. L'envahissement de la moelle osseuse se traduit par des hématomes cutanés ainsi que par une anémie. Des hématomes de l'orbite avec ou sans exophtalmie peuvent également survenir spontanément et constituent un tableau caractéristique (syndrome de Hutchinson).

4. Diagnostic

La variabilité des manifestations cliniques, l'âge du malade ainsi que la faible incidence du neuroblastome rend le diagnostic difficile. La plupart du temps la découverte sera effectuée de manière fortuite suite à une consultation pour des symptômes peu spécifiques. Compte tenu de la forte propension des formes agressives à générer des métastases, ces dernières sont fréquemment à l'origine de la découverte de la maladie.

- Signes cliniques ^[43,28]

Les tumeurs abdominales sont parfois découvertes devant une masse visible ou au cours d'un examen systématique. Elles peuvent aussi être mises en évidence de façon fortuite, lors d'une échographie abdominale faite pour une autre raison.

Les tumeurs thoraciques, situées dans la partie moyenne et en arrière du thorax, sont fréquemment découvertes fortuitement sur une radiographie standard, réalisée devant des signes respiratoires.

Les tumeurs du cou sont le plus souvent prises pour des ganglions.

La tumeur peut également être d'origine rachidienne (1 % des cas). Dans 5 % des cas, la tumeur primitive n'est pas retrouvée.

Certaines tumeurs, dites en sablier, pénètrent dans le canal qui contient la moelle épinière, entraînant une compression de celle-ci. L'enfant présente alors des troubles discrets de la marche ou des troubles de la miction et de la défécation qui sont particulièrement difficiles à interpréter quand il est à l'âge de l'acquisition de la marche et de la continence. C'est une urgence thérapeutique qui va nécessiter une chimiothérapie et, éventuellement, un geste neurochirurgical afin d'éviter au mieux les séquelles neurologiques. Ces neuroblastomes concernent le plus souvent les enfants de moins d'un an.

Une hypertension artérielle peut révéler un neuroblastome à l'origine d'une compression d'une artère rénale ou de la sécrétion exagérée de catécholamines.

- **Marqueurs biologiques**

Chez l'enfant atteint d'un neuroblastome, l'élévation des catécholamines (dopamine...) et de leurs dérivés (VMA et HVA) dans les urines est d'une très grande valeur diagnostique et permet de suivre l'évolution de la tumeur. Le dosage des catécholamines et de leurs dérivés sur les urines de 24 heures est la méthode de choix pour diagnostiquer un neuroblastome dans près de 95 % des cas ^[44].

Le dosage des catécholamines donne des indications importantes :

- La quantité de métabolites des catécholamines est proportionnelle à la masse tumorale (pour les stades M et MS de la classification INRG).
- Lors du suivi thérapeutique, la normalisation des métabolites des catécholamines est de bon pronostic, mais ne signifie pas systématiquement une rémission.

D'autres marqueurs biologiques peuvent être utilisés, mais sont moins employés :

- Le dosage sanguin de la NSE (*neuron specific enolase* : émolase neurone spécifique) n'est pas spécifique au neuroblastome. En effet, on retrouve cette enzyme dans diverses pathologies tumorales (lymphomes...). Une forte concentration en NSE est un facteur de mauvais pronostic.

- L'élévation de la ferritine n'est pas spécifique du neuroblastome, mais sa concentration est corrélée au stade de la pathologie.

- L'augmentation de la LDH (Lactate déshydrogénase) est retrouvée dans 75 % des neuroblastomes, toutefois son rôle pronostique n'est pas défini.

- La VIP (*vasoactive intestinal polypeptide* : polypeptide intestinal vasoactif) est une protéine induisant des diarrhées réfractaires aux traitements symptomatiques classiques. Une hausse de la VIP n'est retrouvée que dans les formes rares de neuroblastomes. Le dosage n'est donc effectué qu'en présence de ce tableau clinique.

- Imagerie

La radiographie sans préparation ou l'échographie permettent la mise en évidence d'une masse solide. L'échographie permet également la visualisation d'éventuelles adénopathies, éléments révélateurs de l'extension de la maladie.

L'IRM (ou TDM) permet de visualiser la tumeur avec plus de précision (Figure 5). Cette technique permet également de rechercher une éventuelle extension intrarachidienne.

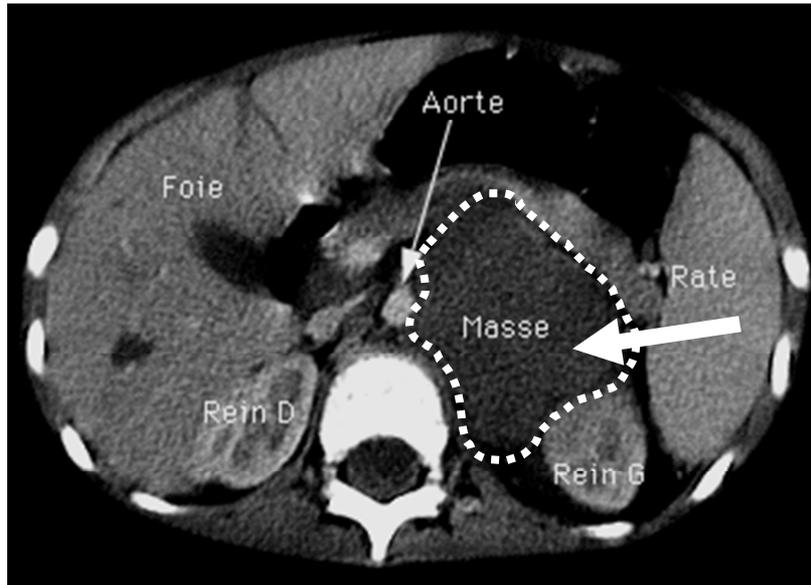


Figure 5. Tomodensitométrie abdominale d'un patient atteint de neuroblastome ^[45]. La flèche indique une masse para-vertébrale gauche, s'infiltrant autour de l'aorte abdominale.

D'autres techniques d'imagerie sont également employées :

- Scintigraphie au ¹³¹I-metaiodobenzylguanidine (MIBG) ^[46] ou au ^{99m}Tc-Methyl diphosphonate ^[47]. La scintigraphie est une méthode d'imagerie médicale qui procède par l'administration d'isotopes radioactifs afin de produire une image médicale, par la détection des rayonnements émis par ces isotopes après captation par les organes ou les tumeurs à examiner. Le MIBG ou le ^{99m}Tc-Methyl diphosphonate ont la capacité de se fixer spécifiquement sur certaines cellules cancéreuses, dont le neuroblastome, permettant ainsi la localisation des différentes tumeurs.

- Radioimmunoscintigraphie à l'aide de l'anticorps 3F8 couplé à l'iode (¹³¹I-3F8). Cette technique semble présenter une meilleure sensibilité dans la détection du neuroblastome mais est encore expérimentale ^[48].

5. Dépistage

Des essais de dépistage ont été entrepris dans les années 1980 au Japon ^[49], en France ^[50], en Allemagne ^[51] et au Canada ^[52]. Le dépistage avait pour but de diagnostiquer de manière précoce les formes graves de neuroblastome afin de faciliter leur prise en charge. Ce dépistage était effectué par dosage des catécholamines urinaires.

Une augmentation de l'incidence du neuroblastome a été mise en évidence chez les enfants de moins d'un an. Cependant, le nombre de tumeurs de haut grade est resté inchangé tout comme la mortalité due au neuroblastome ^[53], ce qui a conduit à l'arrêt du dépistage en 2004.

6. Pronostic

Un large choix de traitements existe pour la prise en charge du neuroblastome. L'utilisation de critères pronostiques pertinents permet d'orienter chaque malade vers la thérapeutique la plus adaptée.

Le stade de l'extension tumorale, selon la classification INRG, est un facteur pronostic majeur. La présence de métastases est un facteur pronostic défavorable, à l'exception du stade métastatique MS (Tableau 3), stade indiquant le plus souvent une issue favorable. L'âge du patient est également un élément déterminant. Les nourrissons de moins d'un an présentent le pronostic le plus favorable ^[11]. À l'inverse, les neuroblastomes diagnostiqués à l'adolescence ou à l'âge adulte possèdent un pronostic défavorable ^[54].

Le proto-oncogène N-myc⁵, normalement exprimé au cours du développement du système nerveux est responsable de nombreux effets biologiques, notamment la régulation de l'apoptose et de la prolifération cellulaire. Dans 25 à 30 % des cas, ce gène est amplifié au niveau des cellules tumorales, donnant lieu à un très mauvais pronostic et classant systématiquement le neuroblastome dans le groupe à haut risque ^[37]. D'autres amplifications ont été mises en évidence dans la famille du gène MYC (notamment c-myc) dans les neuroblastomes ^[55], suggérant une perte de contrôle transcriptionnel pour ce gène.

⁵ Le gène MYC produit un facteur de transcription régulant l'expression des gènes

Le profil cytogénétique permet également de prédire la sévérité du neuroblastome : d'une manière générale les aberrations chromosomiques (délétions, additions, mutations) assombrissent le pronostic. L'addition 17q11 (addition de matériel génétique issu du chromosome 11 au niveau du bras long du chromosome 17), la plus fréquente des anomalies cytogénétiques retrouvées dans les cellules de neuroblastome ^[29] est particulièrement défavorable. L'addition ou la délétion de chromosomes entiers tendent vers un meilleur pronostic. L'absence d'anomalie chromosomique au niveau du caryotype est un élément de pronostic très favorable.

D'autres éléments jouant un rôle pronostique ont été mis en évidence mais ne sont pas actuellement utilisés en première intention pour déterminer la gravité de la pathologie :

- L'importance de l'envahissement de la moelle osseuse, mesurée par immunocytologie ^[56].
- La quantification des cellules tumorales au niveau sanguin ^[57].
- NF1 est un gène suppresseur de tumeur capable de s'opposer à la prolifération du neuroblastome. Hölzel et *al.* ^[58] ont démontré que la perte d'expression de NF1 induisait une mauvaise réponse au traitement par acide rétinoïque et était donc un élément pronostique défavorable.

7. Prise en charge du neuroblastome

a. Introduction

L'hétérogénéité observée entre les différentes formes de neuroblastomes a conduit à modifier la prise en charge existante au profit de deux nouvelles stratégies :

- Dans le cas des tumeurs présentant un pronostic favorable, l'allègement de la thérapeutique est préconisé, avec notamment l'utilisation de chimiothérapies à doses modérées.
- Dans le cas des tumeurs possédant un mauvais pronostic, la tendance est au renforcement de la prise en charge, principalement par radiothérapies et chimiothérapies à hautes doses.

La prise en charge par thérapie standard (chirurgie, radiothérapie, chimiothérapie, greffe de cellules souches) permet le plus souvent une rémission complète. Cependant, l'éradication complète de la maladie reste difficile, causant fréquemment des rechutes, avec un risque de 70 % sur trois ans pour les patients à haut risque ^[2]. L'utilisation d'anticorps anti-GD2 en association avec différentes cytokines ^{6 [6]} a démontré une capacité à prévenir ces rechutes, ouvrant la voie à une amélioration notable du pronostic de la maladie.

b. Chirurgie

La chirurgie a pour objectif l'exérèse totale ou partielle de la tumeur. L'acte chirurgical peut être précédé d'une radiothérapie et/ou une chimiothérapie dans le but de diminuer la taille de la tumeur ^[59]. La mise en place de cet acte dépend de la taille de la tumeur, de sa localisation et de son niveau d'évolution (la chirurgie n'est pas utilisée en première intention pour les stades métastatiques). La résection chirurgicale est utilisée en première intention sur les tumeurs localisées ^[60].

La décision de l'intervention chirurgicale est toujours consécutive à une évaluation du rapport bénéfices/risques. Les principaux risques opératoires sont liés à la proximité du tissu nerveux et de gros vaisseaux (tumeur surrenalienne, du cou...).

c. Chimiothérapie

La chimiothérapie désigne les traitements médicamenteux ayant pour but la destruction des cellules cancéreuses par des mécanismes non spécifiques.

La prise en charge du neuroblastome s'effectue en trois phases distinctes ^[10] :

- l'induction de la rémission.
- la consolidation de la rémission.
- la phase de maintien, où l'objectif est la suppression de la maladie résiduelle.

⁶ Molécules permettant la communication entre les cellules du système immunitaire.

Des études ont mis en évidence un lien entre l'intensité de la chimiothérapie durant la phase d'induction et la qualité des réponses cliniques ^[61,62]. Le pronostic de la maladie étant fortement lié à la réponse pendant la phase d'induction ^[63], cette dernière est un enjeu majeur dans la prise en charge du neuroblastome et doit recourir à une chimiothérapie particulièrement agressive pour les neuroblastomes à haut risque.

Classiquement, la phase d'induction fait appel à des doses fortes de cisplatine et d'étoposide en alternance avec des cures de vincristine, de doxorubicine et de cyclophosphamide ^[61]. Cette chimiothérapie a été récemment complétée par du topotécan, molécule ayant prouvée son intérêt dans la prévention des rechutes ^[64,65].

La famille des rétinoïdes⁷ a démontré *in vitro* une capacité à induire la différenciation et l'inhibition de croissance des cellules de neuroblastome ^[66,67]. Cette découverte a motivé les essais cliniques effectués sur l'acide 13-cis-rétinoïque (CRA) ou isotrétinoïne. Dans cette étude, l'utilisation d'isotrétinoïne après une thérapie myéloablative diminue le risque de rechute ^[2]. L'isotrétinoïne a également démontré son efficacité clinique lors de son association avec une immunothérapie anti-GD2 ^[7].

d. Greffe de cellules souches hématopoïétiques

Cette méthode a pour objectif le renouvellement complet de la moelle osseuse d'un individu lorsque cette dernière est atteinte par des cellules cancéreuses. Dans un premier temps, on élimine entièrement les cellules de la moelle osseuse à l'aide d'une chimiothérapie ou d'une radiothérapie myeloablative. On réinjecte ensuite des cellules souches hématopoïétiques préalablement prélevées chez le malade. Ces cellules possèdent la capacité de recoloniser la moelle osseuse et de renouveler les différentes populations sanguines.

Les rechutes fréquentes chez les patients atteints de neuroblastome peuvent être liées à la présence de cellules tumorales résiduelles après la chimiothérapie. Ces cellules, naturellement chimiorésistantes, donnent naissance à de nouvelles tumeurs peu répondantes face à la chimiothérapie. L'élimination de ces cellules cancéreuses est donc un enjeu majeur durant les phases de consolidation et de maintien de la rémission. Ainsi, la

⁷ Molécules dérivées de la vitamine A.

greffe de cellules souches hématopoïétiques diminue le risque de rechute par rapport à un traitement de consolidation par chimiothérapie simple [2,68-70]. L'utilisation d'une chimiothérapie myéloablative rapide, séquentielle et combinée semble présenter la meilleure réponse clinique [71]. Ce protocole fait actuellement l'objet d'une étude clinique de phase III.

e. Radiothérapie

La radiothérapie utilise la radioactivité dans le but de détruire les cellules tumorales tout en évitant de toucher les cellules saines avoisinantes. Cette méthode peut être employée de différentes manières pour le traitement du neuroblastome. La radiothérapie peut être utilisée en complément de la chirurgie et de la chimiothérapie dans les neuroblastomes à haut risque [60] afin de supprimer les éventuelles cellules tumorales résiduelles. L'irradiation permet également la mise en aplasie avant les greffes de cellules souches hématopoïétiques. La radiothérapie est particulièrement indiquée pour le neuroblastome car les tumeurs sont radiosensibles [72].

f. Immunothérapie

L'immunothérapie est un traitement visant à stimuler la réponse immunitaire d'un individu vis-à-vis d'une maladie. Dans le cadre de la prise en charge du neuroblastome, l'immunothérapie a pour objectif l'élimination des cellules tumorales résiduelles tout en évitant les phénomènes de toxicité rencontrés avec les autres méthodes de prise en charge (greffe de cellules souches, chimiothérapie, radiothérapie...) [73]. Le ganglioside GD2 est le principal antigène ciblé par les anticorps thérapeutiques. Deux approches sont en cours d'investigation clinique : l'utilisation d'anticorps monoclonaux ciblant le GD2 et l'emploi de lymphocytes T exprimant un TCR (*T-cell receptor* : récepteur T cellulaire) chimérique spécifique du GD2 (**III. Immunociblage thérapeutique du marqueur ganglioside tumoral GD2**).

g. Synthèse de la prise en charge

	Pronostic du neuroblastome			
	Faible risque	Risque intermédiaire	Haut risque	Stade 4S
Histologie	Tumeur localisée	Tumeur localisée avec extension locorégionale aux ganglions lymphatiques	Métastases ostéo-médullaires (sauf patient < 1an)	Métastases hépatiques et cutanées (avec faible envahissement médullaire) chez l'enfant < 1an
Traitements	Chirurgie	Chimiothérapie modérée et/ou chirurgie	Radiothérapie, chimiothérapie à haute dose et chirurgie ou chimiothérapie myeloablative avec greffe de cellules souches hématopoïétiques, traitement par anticorps anti-GD2 et isotrétinoïne	Chimiothérapie à faible dose et/ou radiothérapie si pronostic vital engagé par métastases hépatiques
Taux de survie à 5ans	> 98 %	90 à 95 %	40 à 50 %	> 90 %

Tableau 4. Prise en charge du neuroblastome en fonction du stade de la maladie ^[10].

h. Parcours des malades atteints de neuroblastome ^[74]

- Annonce du diagnostic

Elle doit être claire et reprise en fonction des représentations des parents, en leur laissant le temps de l'élaboration. Elle doit préciser les risques réels encourus par l'enfant mais aussi laisser la place à un espoir de survie, dans la mesure du possible. C'est un temps essentiel pour créer une alliance thérapeutique avec les parents, qui devront être accompagnés psychologiquement tout au long de la maladie. Il est important de savoir que le temps de compréhension varie en fonction des familles et des patients. L'information donnée à l'enfant doit prendre en compte le niveau de compréhension des parents et leur capacité à accepter qu'on l'informe. Adaptée à son âge, elle sera aussi claire que possible sur le déroulement des processus thérapeutiques et des soins.

- Entrée dans la maladie

Après une première phase d'angoisse, de colère ou de sidération, l'enfant peut adopter deux types de réactions. Certains régressent vers des comportements de dépendance et un désintérêt apparent, ou encore vers l'opposition. Il peut à l'inverse apparaître un phénomène d'hypervigilance. Ce gain apparent de maturité est lié à un désir de retrouver une maîtrise sur son corps et sa maladie et se caractérise par un intérêt extrême sur la nature des traitements et leurs effets. Cependant, cette maturité se fait en fait « en secteurs », avec le risque de considérer ces enfants comme plus grands qu'ils ne le sont. L'âge moyen au diagnostic étant de 17 mois ^[11], ces éléments ne sont pas toujours retrouvés chez les patients les plus jeunes.

- Suivi et orientation pendant la maladie

La prise en charge du malade est effectuée par un personnel médical et paramédical qualifié : médecins, pharmaciens, pédopsychiatres... au sein d'un centre spécialisé. Au sein de la région des Pays de la Loire, le CHU de Nantes et d'Angers ont été désignés comme centres labellisés « Centre régional de cancérologie pédiatrique » par l'Agence Régionale d'Hospitalisation, et permettent de garantir une prise en charge de qualité.

Le patient est inclus dans un protocole thérapeutique en fonction du grade du neuroblastome et de ses facteurs pronostiques. En cas d'échec ou de rechute, le patient pourra être intégré à un essai clinique (selon les critères d'inclusion). Le suivi psychologique du patient et de son entourage est indispensable pendant la maladie. Le risque important de rechute incite également à continuer ce suivi pendant les phases de rémission.

- Prise en charge palliative

Les soins palliatifs sont des soins actifs délivrés dans une approche globale de la personne atteinte d'une maladie grave, évolutive ou terminale. L'objectif des soins palliatifs est de soulager les douleurs physiques et les autres symptômes, mais aussi de prendre en compte la souffrance psychologique, sociale et spirituelle. Les soins palliatifs et

l'accompagnement sont interdisciplinaires. Ils s'adressent au malade en tant que personne, à sa famille et à ses proches, à domicile ou en institution ^[75].

La prise en charge palliative du malade atteint de neuroblastome concerne tout d'abord le traitement symptomatique des effets secondaires inhérents à la prise en charge agressive : douleurs post opératoires ou liées à l'immunothérapie anti-GD2, nausées et vomissements liés à la chimiothérapie, prise en charge de l'anxiété... Quand cela est possible, l'écoute du patient est un élément primordial permettant d'orienter de manière efficace la prise en charge des symptômes les plus gênants.

i. Conclusion

Compte tenu du pronostic souvent défavorable et du jeune âge des patients atteints, le neuroblastome constitue un enjeu de santé publique important. En plus de la gravité de la tumeur, la prise en charge doit prendre en compte le patient et son entourage. Une collaboration pluridisciplinaire est donc indispensable.

Malgré les traitements lourds instaurés pour les formes de haut grade, le taux de survie reste faible et les rechutes fréquentes. La stratégie consistant à cibler le GD2 présente aujourd'hui des résultats encourageants lors d'essais cliniques. Cette innovation thérapeutique est porteuse d'espoir pour les malades et leur entourage.

II. Le marqueur gangliosidique tumoral GD2

1. Structure

a. Structure générale

Les gangliosides font partie de la famille des glycosphingolipides. Ces molécules amphiphiles sont composées d'un céramide hydrophobe ancré dans la membrane cellulaire et d'une chaîne oligosaccharidique orientée vers le milieu extra cellulaire. L'élément caractéristique des gangliosides est la présence d'acide neuraminique (ou acide sialique) au niveau de la chaîne oligosaccharidique. Les acides sialiques sont des molécules glucidiques composées de neuf carbones, conférant une charge négative au ganglioside ^[76].

La nomenclature utilisée pour l'appellation des gangliosides repose sur les travaux de Svennerholm et *al.* ^[77] : les gangliosides sont dénommés en fonction du nombre d'acides sialiques présents dans la molécule (GM : monosialoganglioside, GD : disialoganglioside...) et le chiffre correspond à l'ordre de migration sur CCM de silice. Une seconde classification a été mise en place par la commission internationale de nomenclature biochimique (IUPAC-IUB) afin de désigner les gangliosides plus complexes ^[78]. Compte tenu de la lourdeur du système, l'utilisation d'une nomenclature simplifiée basée sur ce système IUPAC-IUB est le plus souvent utilisée. La position de l'acide sialique substitué est indiquée par un chiffre romain, suivi du numéro du carbone glucidique servant à la liaison (chiffre arabe). L'acide sialique est représenté par l'abréviation NeuAc (pour *neuramidic acid*) suivi des lettres Gg (série **g**angliosidique), le nombre de groupements glucidiques (OseX) et enfin le groupement céramide (noté Cer).

b. Le ganglioside GD2

Comme son abréviation l'indique, ce ganglioside est substitué par deux acides sialiques. Cette substitution s'effectue au niveau du troisième carbone du deuxième groupe glucidique. Cette molécule possède trois résidus osidiques. Ce ganglioside peut donc être

nommé GalNAc β 4(Neu5Ac α 8Neu5Ac α 3)Gal β 4GlcCer ou sous forme simplifié : II³ (NeuAc)²-GgOse3-Cer (Figure 6).

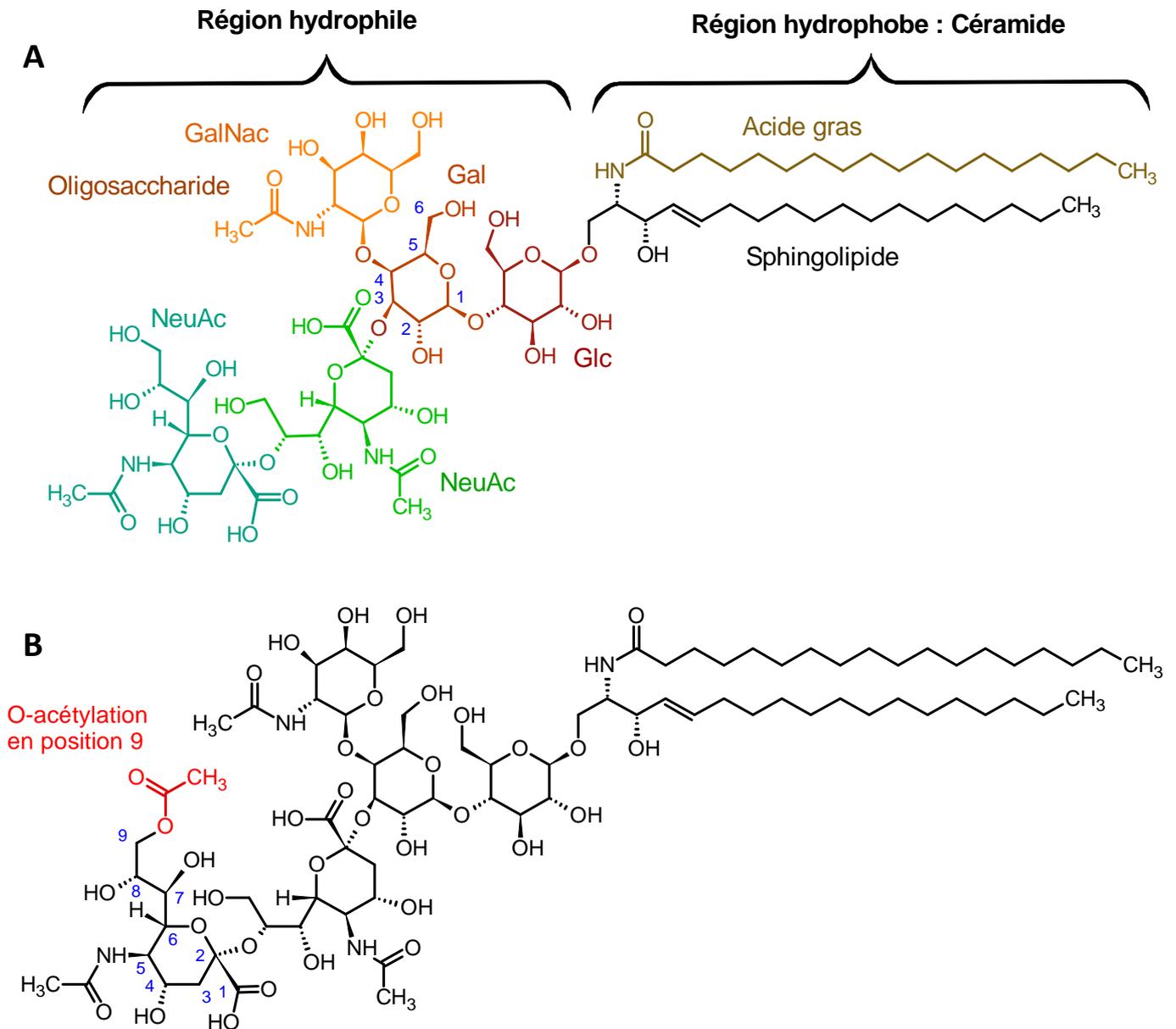


Figure 6. Structure du GD2 (A) et du GD2 *O*-acétylé (B). Glc : glucose. Gal : galactose. GalNAc : *N*-acétylgalactosamine. NeuAc : acide sialique ^[76].

Le ganglioside GD2 *O*-acétylé (Figure 6) est obtenu par l'ajout d'un groupement acétyl au niveau du carbone 9 de l'acide sialique terminal par une enzyme, la *O*-acétyltransférase. Le recyclage du GD2 *O*-acétylé est garanti par la *O*-estérase, hydrolysant spécifiquement la liaison *O*-acétyl.

2. Métabolisme du ganglioside GD2

a. Biosynthèse

La biosynthèse des gangliosides correspond à la glycosylation séquentielle du céramide. Des glycosyltransférases vont greffer successivement différents monosaccharides à partir d'un nucléotide-sucre vers la structure lipidique (Figure 7). Au cours de la synthèse, les molécules sont exportées depuis le réticulum endoplasmique vers la membrane plasmique en passant par l'appareil de Golgi^[79].

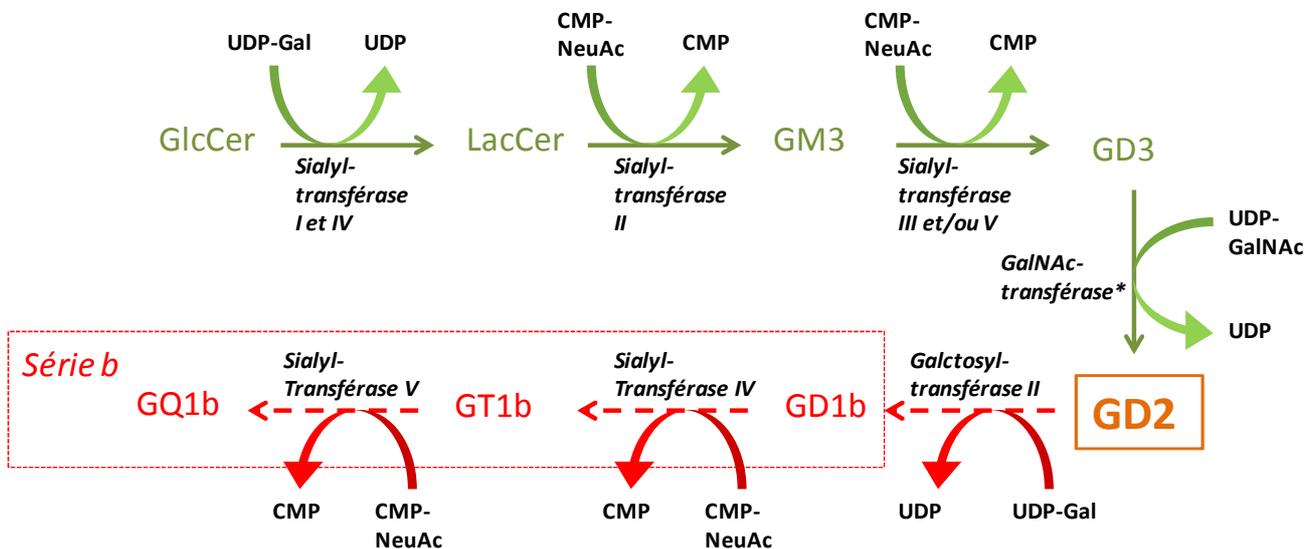


Figure 7. Biosynthèse du ganglioside GD2 (d'après les travaux de Van Echten et *al.*^[80]). Le GD2 est synthétisé à partir du GD3 par ajout d'un groupement galactosyl (Gal) par la Galactosyl-transférase II. *L'enzyme est également appelé GM2/GD2 synthétase

b. Catabolisme

Dans un premier temps, les gangliosides sont internalisés par endocytose puis acheminés jusqu'aux endosomes. Une partie des gangliosides peut rejoindre la membrane plasmique ou l'appareil de Golgi, mais la majorité des molécules sont recyclées au niveau des lysosomes.

Plusieurs enzymes sont responsables de la dégradation. Les exoglucidases ou les céramides glycanases éliminent les structures oligosaccharidiques. L'acide gras du céramide

peut être supprimé par une céramide *N*-désacylase. Enfin une sialidase permet le recyclage des acides sialiques. Cette dernière enzyme semble jouer un rôle clé dans la régulation du taux de gangliosides membranaires ^[81].

3. Distribution tissulaire

a. Tissus sains

Chez les mammifères, les gangliosides sont largement exprimés au niveau du système nerveux central, avec une concentration maximale au niveau du cortex cérébral ^[82]. Le GD2 est assez faiblement exprimé par rapport aux autres gangliosides. Il se retrouve principalement dans les neurones, les mélanocytes et les fibres nerveuses périphériques ^[83].

Le GD2 *O*-acétylé n'est que très faiblement exprimé dans les tissus sains. L'étude d'Alvarez et al. ^[8] a évalué par immunohistologie la fixation d'AcM anti-GD2 *O*-acétylé sur 32 sections de tissus sains congelés. Cette liste de tissus correspond aux recommandations de la FDA (*Food and Drug Administration* : Agence fédérale américaine des produits alimentaires et médicamenteux) vis-à-vis de la sûreté d'utilisation de nouveau médicaments. La Figure 8 résume les résultats de cette analyse. Il est important de noter que les tissus positifs présentent tous une expression de GD2 *O*-acétylé très faible.

Absence de GD2 O-acétylé	Présence de GD2 O-acétylé
Vessie	Glande surrénale
Cellules sanguines	Moelle osseuse
Cerveau (cortex)	Cerveau (cerebellum)
Sein	Tractus gastro-Intestinal*
Côlon	Ganglion lymphatique
Endothélium	Moelle épinière
Œil	Thyroïde
Trompe de Fallope	
Cœur	
Rein (Cortex et médulla)	
Foie	
Poumon	
Ovaire	
Pancréas	
Glande parathyroïde	
Glande pituitaire	
Placenta	
Muscle squelettique	
Peau	
Rate	
Thymus	
Testicule	
Uretère	
Utérus (Col et endomètre)	

Figure 8. Analyse immunohistologique de tissus vis-à-vis de l'expression de GD2 O-acétylé. Décrit par Alvarez et al. ^[8]. Les tissus présentant le GD2 O-acétylé ne présente qu'un faible marquage cytoplasmique. *Ce tissu présente un marquage non spécifique.

b. Tissus tumoraux

Le ganglioside GD2 est retrouvé en grande quantité à la surface des tumeurs neuroectodermiques, dont fait partie le neuroblastome ^[84]. La grande homogénéité ^[85] et sa forte expression au niveau du neuroblastome ^[3] et son expression limitée dans les tissus normaux en fait une cible thérapeutique intéressante. Le GD2 se retrouve également dans de nombreuses autres tumeurs à haut risque notamment dans les mélanomes ^[86] ainsi que la moitié des sarcomes et ostéosarcomes ^[87]. Enfin, il est à noter que le taux sérique de GD2 circulant est augmenté chez les patients atteints de neuroblastome par rapport à un individu sain ^[4,88].

Le GD2 *O*-acétylé est un dérivé structural du ganglioside GD2 obtenu par l'ajout d'une fonction *O*-acétyl sur le carbone C9 de l'acide sialique terminal par une *O*-acétyltransférase. On retrouve une concentration significative de ce marqueur à la surface des cellules de neuroblastome ^[89]. Le GD2 *O*-acétylé est d'autant plus intéressant qu'il est quasi indétectable au niveau des tissus sains ^[8].

4. Fonctions biologiques

Les gangliosides ont des fonctions de reconnaissance et de modulation de signal vis-à-vis de la migration, la différenciation et la prolifération cellulaire ^[90,91]. Ces molécules jouent également un rôle majeur en favorisant l'organisation et le développement des tissus tumoraux.

Plus spécifiquement au GD2, Muramatsu ^[92] a démontré l'implication du GD2 dans le transport de la testostérone depuis les cellules de Leydig vers la circulation sanguine. Il a été constaté que des souris privées de GD2 étaient viables mais stériles (absence de production de sperme). On note également que les souris sans GD2 présentent une conduction nerveuse légèrement inférieure aux souris normales. La dégénération des nerfs périphériques apparaît également de manière précoce, surlignant le rôle du ganglioside GD2 dans l'entretien du tissu nerveux périphérique ^[93]. Récemment, le rôle du GD2 dans la participation à l'entretien des tissus cérébraux a été démontré ^[94]. Une étude de l'interaction entre les anticorps anti-GD2 et le ganglioside GD2 ^[95] semble indiquer que le GD2 posséderait un rôle dans la régulation de l'apoptose cellulaire (Figure 9).

En ce qui concerne le GD2 *O*-acétylé, ses fonctions biologiques ne sont pas connues. L'absence de caractérisation de l'enzyme responsable de sa synthèse constitue un frein majeur à l'exploration du rôle de ce ganglioside.

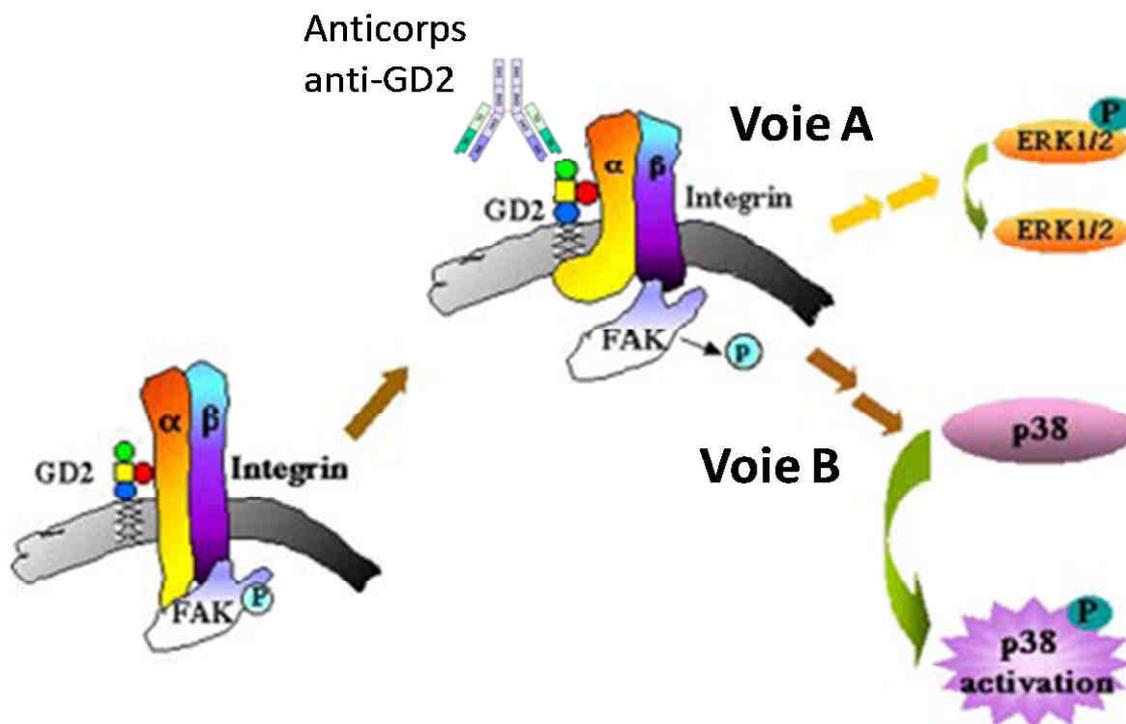


Figure 9. Mécanisme d'action des anticorps anti-GD2 (d'après Aixinjueluo et *al.* ^[95]). La liaison au GD2 entraîne une modification de la conformation l'intégrine, induisant une déphosphorylation de FAK (*Focal Adhesion kinase*). Ces changements sont responsables de la déphosphorylation de la kinase ERK1/2 (Voie A) et de l'activation de la protéine p38 (VoieB). Ces deux voies sont capables de transmettre un message pro-apoptotique.

5. Pouvoir immunogène

Le pouvoir immunogène des gangliosides a été mis en évidence par Portoukalian et *al.* ^[96] suite à la découverte d'anticorps dirigés contre des gangliosides dans le sérum de patients atteints de mélanomes.

Cependant, le pouvoir immunogène des gangliosides est faible : l'injection du ganglioside seul n'induit pas la production d'anticorps chez la souris ou chez l'homme. Il est toutefois possible d'obtenir une réponse humorale en adsorbant les gangliosides sur des bactéries jouant le rôle d'adjuvant. Des réponses satisfaisantes ont été obtenues chez la souris avec *Salmonella Minnesota* ^[97] et chez l'homme avec le Bacille de Calmette et Guérin ^[98]. Au cours de ces expériences, les réponses immunes étaient faibles et de courtes durées. Les injections répétées ne favorisaient pas l'apparition de réponses secondaires, excluant donc la formation de lymphocytes B mémoires.

III. Immunociblage thérapeutique du marqueur gangliosidique tumoral GD2

1. Présentation des anticorps monoclonaux

Une part croissante des traitements fait appel à des anticorps thérapeutiques. En effet, ces derniers présentent une demi-vie longue, sont spécifiques et possèdent une toxicité souvent limitée.

La production de ces anticorps monoclonaux fait appel à une technique découverte par G. Köhler en 1975 ^[99]. Dans un premier temps, des animaux (souvent le rat ou la souris) sont immunisés contre un antigène. Cette immunisation se traduit par une prolifération des plasmocytes et une réponse polyclonale⁸. Ensuite, les plasmocytes sont isolés et fusionnés avec des cellules de myélomes afin de créer des hybridomes, cellules ayant la capacité de se multiplier indéfiniment tout en produisant des anticorps. Grâce à l'ingénierie moléculaire, chaque hybridome produit un anticorps spécifique (ou anticorps monoclonal). Une dilution limite permet de séparer chaque hybridome afin d'analyser la spécificité de chaque AcM (par technique Western Blot ou ELISA). L'hybridome générant les anticorps les plus spécifiques de l'antigène cible est alors amplifié afin de produire des AcM.

Les AcM utilisés dans le traitement du neuroblastome sont des immunoglobulines de type G (IgG) (Figure 10). Elles se caractérisent par un poids moléculaire de 150 kDa, une bivalence et une capacité à activer le complément et l'ADCC.

⁸ Production d'anticorps dirigés contre de nombreux antigènes.

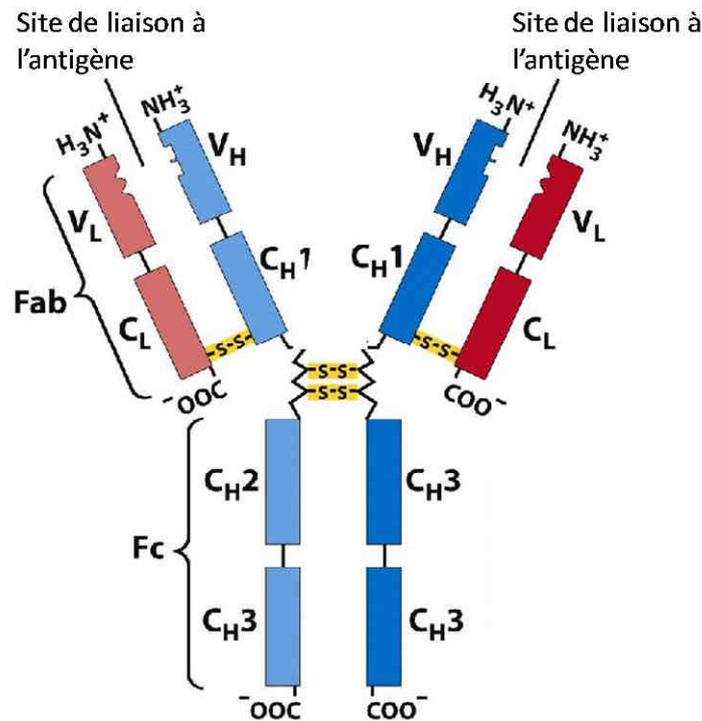


Figure 10. Structure d'une IgG ^[100]. Cette immunoglobuline est constituée de deux chaînes lourdes de 50 kDa (H) et de deux chaînes légères de 25 kDa (L). Deux sites de fixation de l'antigène sont disponibles au niveau des régions variables (V).

L'origine des anticorps utilisés est variable. Il existe plusieurs catégories d'anticorps :

- les anticorps monoclonaux de souris
- les anticorps chimériques composé d'une région constante humaine et de régions variables de l'AcM de souris.
- les anticorps humanisés : au sein de la région variable, seules les parties en contact direct avec l'antigène (CDR : *complementarity determining regions*, région déterminant la complémentarité) sont d'origine murine. Le reste de l'anticorps est humain.

Il existe deux familles d'AcM anti-GD2 employées en clinique. Une partie de ces AcM est issue du 14G2a, les autres sont préparés à partir du 3F8 ^[4,101-104]. Par leur grande spécificité, les anticorps monoclonaux dirigés contre le GD2 sont utilisés à la fois pour le diagnostic, le pronostic et le traitement du neuroblastome ^[56,57].

Dans le but d'améliorer l'efficacité des anticorps monoclonaux, des éléments peuvent leur être associées de manière covalente. La molécule ainsi obtenue s'appelle un anticorps

conjugué ou une protéine de fusion. L'élément ajouté à l'anticorps peut être un radionucléide (radioimmunoconjugué) une toxine, une molécule de chimiothérapie ou une cytokine. Cette dernière combinaison porte le nom d'immunocytokine. Les cytokines les plus utilisées dans le traitement du neuroblastome sont l'interleukine 2 et le facteur de croissance GM-CSF (*granulocyte macrophage colony stimulating factor*).

Les anticorps conjugués s'appuient sur la capacité des AcM à reconnaître et à se fixer spécifiquement au niveau d'un tissu cible, porteur d'un antigène spécifique (ici, le tissu tumoral). Cela permet alors la vectorisation des molécules liées à l'anticorps, favorisant leur activité et limitant leur potentiel toxique.

2. Les AcM dans la prise en charge du neuroblastome

a. L'anticorps monoclonal de souris 3F8⁹

Le 3F8 est un anticorps murin de type IgG3 dirigé contre le ganglioside GD2. Il s'agit du premier anticorps monoclonal testé en clinique dans le traitement du neuroblastome [5]. Le 3F8 a prouvé *in vitro* sa capacité à détruire des cellules tumorales par les mécanismes d'ADCC et de CDC [105,106]. Le 3F8 est produit à partir de liquide d'ascite chez la souris BALB/c [107]. Cet anticorps est actuellement en évaluation clinique de phase II.

b. L'anticorps monoclonal de souris 14G2a

L'AcM 14G2a est une immunoglobuline murine IgG2a spécifique du GD2. Cet anticorps est un variant isotypique du 14.18, une IgG3 également spécifique du GD2 [108]. Le 14G2a a été créé dans le but de renforcer l'activité ADCC mise en évidence avec le 14.18. Ses mécanismes d'action sont semblables à ceux du 3F8 (ADCC et CDC) [102]. Le 14G2a est produit à partir de liquide d'ascite chez la souris BALB/c [108]. Cet anticorps a été arrêté en phase I de son développement compte tenu de sa toxicité [109].

⁹ Cette molécule n'est plus autorisée en France.

c. L'anticorps chimérique ch14.18

Le ch14.18 est un anticorps chimérique humain-souris, créé dans le but de diminuer l'immunogénicité liée aux anticorps murins. Les régions variables, dirigées contre le ganglioside GD2, sont issues de l'anticorps murin 14.18. Les régions constantes (chaînes lourdes et légères) proviennent d'une immunoglobuline humaine IgG1 (Figure 11).

Initialement produit à partir des lignées cellulaires SP2/0 et NS0, le ch14.18 a été cloné dans une lignée CHO en vue de son utilisation en thérapeutique. L'équivalence d'efficacité entre ces lignées a été démontrée^[110]. Cet anticorps a apporté la preuve *in vitro* d'une moindre immunisation et d'une meilleure atteinte des cellules tumorales^[73]. Il est actuellement employé dans un essai de phase III.

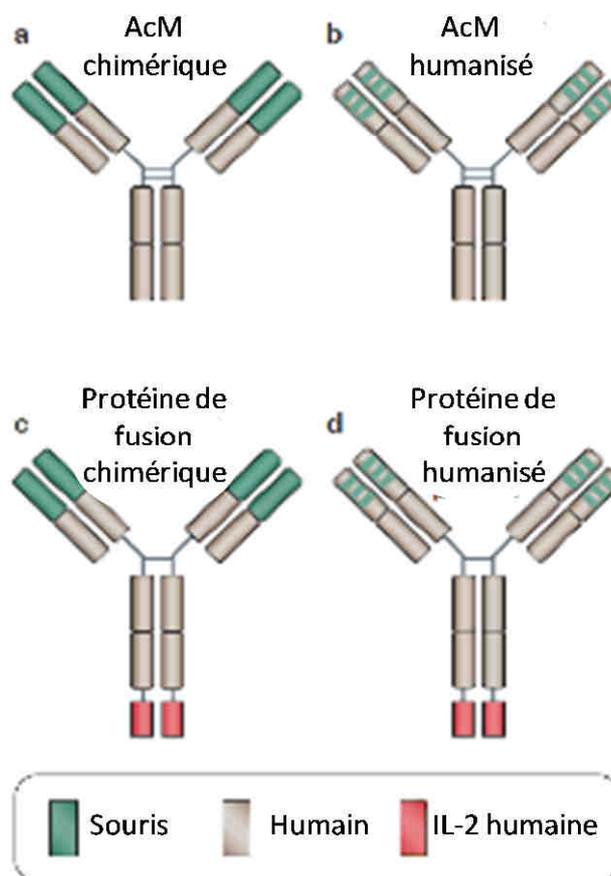


Figure 11. Anticorps monoclonaux et protéines de fusion. a : anticorps chimérique. b : anticorps humanisé. c et d : association d'un anticorps (chimérique ou humanisé) à l'IL-2. L'interleukine est liée de manière covalente sur les anticorps au niveau de la région C-terminale^[111].

d. Les anticorps humanisés hu14.18 et hu14.18K322A

Les résultats favorables obtenus avec le ch14.18 ont motivé le développement de l'AcM hu14.18, sa version humanisée. Ce format d'anticorps présente moins d'éléments structuraux issus de la souris et est donc moins immunogène.

Une seconde version de l'anticorps humanisé a été produite : le hu14.18K322A. Sur cet anticorps, une mutation au niveau de la région Fc a été apportée en remplaçant une lysine (K) par une alanine (A) en position 322. Ce changement a pour objectif la suppression de l'activation de la cascade du complément, partiellement responsable des phénomènes douloureux et allergiques. La réduction de la douleur liée à l'activation du complément a d'ailleurs été objectivée chez le rat ^[112]. Enfin, cet AcM est produit par la lignée cellulaire YB2/O, contrairement aux précédents anticorps synthétisés par les lignées CHO ou NS/O. Cet élément évite la fucosylation de la région Fc et devrait ainsi favoriser l'activité ADCC, porteuse de l'effet antitumoral ^[113]. Cet AcM est actuellement en cours d'évaluation clinique de phase I aux États-Unis. Les premiers résultats de cette évaluation ^[114,115] indiquent une amélioration de la tolérance.

e. Anticorps conjugués

- Immunotoxines

Les immunotoxines sont une combinaison entre une toxine et un anticorps. Les immunotoxines ont démontré *in vitro* une capacité à détruire des cellules de neuroblastome ^[116]. Des essais chez la souris ont confirmé l'activité antitumorale de la chaîne A de la ricine lors de sa fixation sur un anticorps anti-GD2 ^[117]. De même, le couplage de l'anticorps 14G2a avec la gélonine¹⁰ a présenté *in vitro* des activités intéressantes sur des lignées de mélanomes exprimant le GD2 ^[118]. Malgré ces essais concluant *in vitro* et chez l'animal, la stabilité de ces immunotoxines n'est pas satisfaisante. Les immunotoxines ne sont donc actuellement pas employées dans le traitement du neuroblastome.

¹⁰ Toxine de la plante *Gelonium multiflorum*.

- Immunocytokines

L'efficacité de l'immunothérapie est conditionnée par la mise en place des mécanismes d'élimination de la tumeur. Ces mécanismes immunologiques (ADCC, CDC...) peuvent cependant être enrayés par l'utilisation concomitante de molécules de chimiothérapie. L'utilisation de cytokines ou d'immunocytokines a pour objectif la stimulation du système immunitaire afin de promouvoir les mécanismes d'élimination tumorale ^[119,120]. La principale cytokine employée pour la génération d'immunocytokines est l'interleukine 2 ^[114,121-125] (Figure 11).

Le ch14.18-IL-2 est le résultat de la fusion de l'anticorps chimérique ch14.18 et de l'interleukine 2. L'objectif de cet anticorps conjugué est d'améliorer l'efficacité et la tolérance observée en clinique avec le ch14.18. Les études précliniques chez la souris ont mis en évidence un potentiel antitumoral plus important que l'association ch14.18 et IL-2 ^[123]. Ces résultats ont motivé le développement du hu14.18-IL-2, la version humanisée de cet anticorps. Le ch14.18-IL-2 n'a été évalué que chez l'animal ^[121]. L'immunocytokine ch14.18-IL-2 a été humanisée pour obtenir le hu14.18-IL-2, actuellement en évaluation clinique de phase II ^[125]. La production des ces deux immunocytokines a été confiée à la société Apeiron Biologics par le *National Cancer Institut* (NCI) ^[126].

- Radio-immunoconjugués

Compte tenu de la radiosensibilité du neuroblastome ^[127], il serait intéressant de développer des anticorps associés à un radioélément. L'utilisation de ces molécules repose sur le principe de la RIT (radio-immunothérapie). Dans un premier temps le radio-immunoconjugué va se fixer spécifiquement au niveau de son site d'action grâce à la reconnaissance antigénique de l'anticorps. Le radionucléide va alors irradier la zone avoisinant le site de fixation. Cette méthode permet d'allier la force de l'immunothérapie et de la radiothérapie : l'utilisation d'un radioélément renforce le pouvoir antitumoral de l'anticorps et la fixation spécifique au niveau de la tumeur rend l'irradiation plus efficace et moins nocive pour les cellules saines.

La seule molécule en cours d'évaluation clinique est le ¹³¹I-3F8 (phase II) ^[127,128].

f. Adjuvants à l'immunothérapie

- Cytokines

Les deux principales cytokines employées sont l'interleukine 2 et le facteur de croissance GM-CSF¹¹. L'IL-2 est une molécule à fort potentiel pro-inflammatoire, capable d'activer l'immunité innée (cellules NK) et l'immunité adaptative (cellules T)^[129]. Le GM-CSF est une molécule favorisant la croissance des monocytes et des granulocytes (éosinophile, neutrophile, basophile...). Ces deux cytokines ont prouvé leur intérêt en association avec le ch14.18 lors d'une étude de phase III^[7].

L'interleukine 12 est un puissant activateur des cellules NK et des lymphocytes T^[130]. Des effets antitumoraux ont été démontrés avec cette cytokine *in vitro*^[131] et chez la souris^[132]. Les résultats encourageants obtenus en clinique, notamment dans un essai de phase II concernant le carcinome rénal^[133], doivent inciter les futures recherches à inclure l'IL-12 dans le protocole de traitement.

- 3F8 et β -glucane

Le β -glucane est un polysaccharide constitué d'unités de D-glucose reliées par des liaisons béta. Cette molécule possède une forte capacité à activer l'immunité innée, à favoriser la sécrétion de TNF- α et à promouvoir l'ADCC par les cellules NK, les monocytes et les neutrophiles^[134-136]. Le β -glucane a également démontré un effet synergique avec les anticorps anti-GD2 sur un modèle de souris atteint de neuroblastome^[137].

L'association 3F8 et β -glucane est en cours d'investigation clinique de phase I.

¹¹ Le GM-CSF est interdit en Europe.

g. Immunothérapie active

A la différence de l'administration de cytokines et d'anticorps dirigés contre un antigène tumoral (immunothérapie passive ou adoptive), l'immunothérapie active a pour but l'induction d'une réponse antitumorale chez le malade. Cette approche a pour intérêt la génération d'une réponse immunitaire durable, à la différence de l'effet transitoire apporté par les anticorps thérapeutiques. Ainsi, la vaccination repose sur le principe l'immunothérapie active.

Deux éléments majeurs s'opposent à l'utilisation de l'immunothérapie active dans le traitement de certains cancers, dont le neuroblastome. Tout d'abord, les tumeurs peuvent échapper au système immunitaire en relarguant des molécules immunosuppressives comme l'IL-10 ou le TGF- β ^[138], et en exprimant faiblement le CMH de type I à leur surface, ce qui diminue l'efficacité des lymphocytes T cytotoxiques et des cellules dendritiques. Ensuite, les protocoles standards de traitements, par leur effet agressif sur le système immunitaire, réduisent significativement la capacité de l'organisme à créer une réponse antitumorale.

Un essai sur modèle murin a conduit à la création d'un vaccin à ADN ciblant le GD2. Le vecteur utilisé, *Salmonella typhimurium*, a permis une administration orale et une bonne immunisation grâce aux lipopolysaccharides présents à sa surface. Une régression tumorale a été observée ainsi que l'apparition d'une immunité spécifique, prévenant l'apparition de métastases hépatiques ^[139]. Au niveau moléculaire, il est intéressant de noter que le peptide obtenu par l'expression du vaccin à ADN est reconnu par l'AcM 14G2a, entraînant chez la souris une amélioration de la réponse anti-GD2 de l'ordre de 50 % au niveau sérique.

De la même manière, la tyrosine hydroxylase, une enzyme surexprimée dans le neuroblastome, a été ciblée. Une régression tumorale et une immunité dirigée contre le neuroblastome ont également été observées sur un modèle souris ^[140].

h. Lymphocytes T exprimant un TCR chimérique spécifique du GD2

L'activation des lymphocytes et la mise en place d'une mémoire immunitaire suite au traitement par anticorps monoclonaux ont été observées chez l'animal et chez l'homme au cours d'essais cliniques ^[141]. Il est possible d'améliorer l'efficacité de ces cellules T cytotoxiques en orientant le TCR (récepteur T cellulaire) contre un antigène tumoral ^[142].

Dans l'optique d'un traitement du neuroblastome, des lymphocytes T ont été génétiquement modifiés afin d'exprimer un TCR chimérique mimant une région variable d'un anticorps anti-GD2 lié à une structure de signalisation cytoplasmique (Figure 12). La stimulation du TCR entraîne les fonctions effectrices cytotoxiques ainsi que le relargage de cytokines pro-inflammatoires (interféron- γ , GM-CSF...). Cette méthode permet donc d'améliorer le potentiel antitumoral des cellules T tout en limitant la toxicité sur les cellules saines avoisinantes, non porteuses de l'antigène GD2 ^[143].

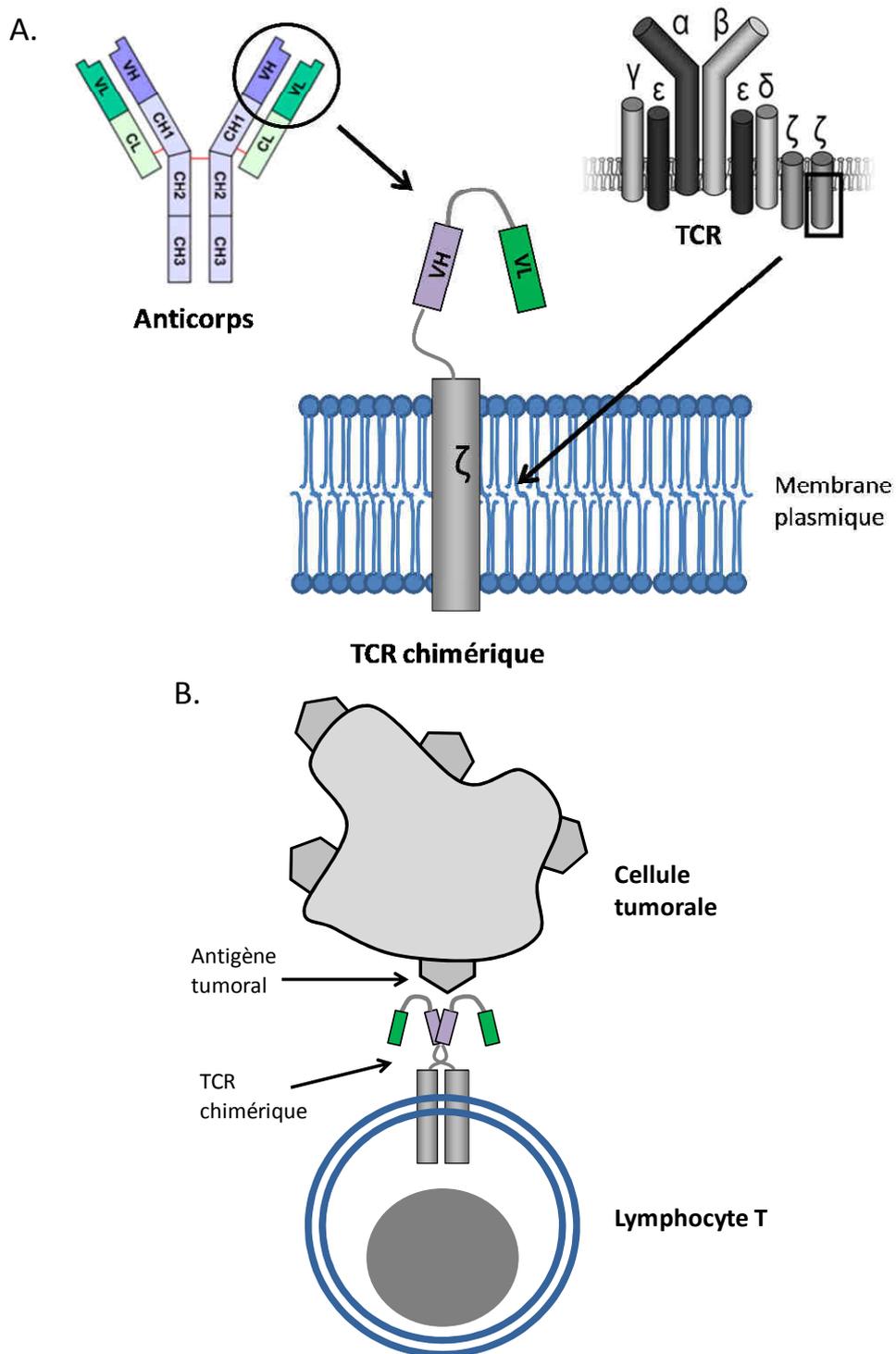


Figure 12. Structure et fonction du TCR chimérique. (A) Le TCR chimérique est formé à partir des régions variables d'un anticorps (VL et VH) et de la sous-unité ζ issue du TCR normal. (B) Le TCR chimérique complet possède deux sous-unités capables de reconnaître un antigène tumoral à l'aide des régions VL et VH de l'anticorps. D'après Ramos et *al.* ^[144].

Bien que cette approche concerne majoritairement les leucémies et les lymphomes, plusieurs essais cliniques visant le neuroblastome sont en cours ^[145]. Compte tenu du temps

nécessaire aux patients recevant une greffe de cellules souches pour recouvrer un système immunitaire normal (plusieurs mois), l'utilisation de cellules T dirigées contre le neuroblastome pourrait être une alternative thérapeutique judicieuse.

3. Les résultats cliniques

a. Introduction

Les résultats cliniques sont exprimés avec les termes définis ci-dessous :

- La somme des diamètres (*Longest Diameter* = LD) des tumeurs mesurables est calculée et représente la valeur de base pour l'évaluation de la réponse aux traitements. On évaluera au maximum cinq lésions par organe et dix lésions pour l'ensemble du corps.

- Réponse complète (*Complete Response* = CR) : disparition de toutes les lésions

- Réponse partielle (*Partial Response* = PR) : Diminution d'au moins 30 % de la somme des LD des lésions.

- Réponse mixte (*Mixed Response* = MR) : Amélioration de l'état clinique sans possibilité d'inclusion dans le groupe CR ou PR.

- Maladie stable (*Stable Disease* = SD) : Diminution des LD des lésions de moins de 30 % ou progression de moins de 20 %.

- Progression de la maladie (*Progressive Disease* = PD) : Augmentation des LD des lésions de plus de 20 %.

Ces termes sont issus du système RECIST (*Response Evaluation Criteria In Solid Tumors*). Publiés en 2000 en collaboration avec l'EORTC (*European Organisation for Research and Treatment of Cancer*), l'institut national du cancer des États-Unis et du Canada, ils établissent un langage commun dans la description de l'évolution des tumeurs face aux traitements^[146,147]. Cette classification a été révisée en 2009 par Eisenhauer et al.^[148].

b. Anticorps monoclonal murin 3F8

Essais	Phases	Doses	Réponses cliniques	Effets secondaires	Remarques
Cheung et al. [5]	I	5 à 100 mg/m ²	7 réponses anti tumorales (CR, PR ou MR)	Douleurs, hypertension, urticaire, déplétion du complément	17 patients inclus (mélanomes et neuroblastomes)
Cheung et al. [149]	II	NR	Survie à long terme (>6ans) sans complication : 3 patients	Douleurs aiguës, urticaire, fièvre, hyper/hypotension et troubles anaphylactoïdes mineurs	16 patients inclus
Cheung et al. [150]	II	NR	23 CR, 9 PR	Douleurs, fièvre, urticaire, troubles réversibles de la formule sanguine	Evaluation du 3F8 sur neuroblastome résiduel de grade 4, 34 patients inclus (>1an)
Cheung et al. [128]	II	400 mg/m ²	21 CR ou PR	Douleurs modérées, urticaire	Utilisation d'un protocole de chimio thérapie et de radio-anticorps (¹³¹ I-3F8) 24 patients inclus
Kushner et al. [151]	II	100 mg/m ² /cycle	12 CR, 3PR	Douleurs modérées, rash	Association du traitement par GM-CSF, 19 patients inclus
Kushner et al. [59]	NR	NR	5 CR	Présence d'HAMA	Utilisation du protocole N7, 7 patients inclus
Kushner et al. [152]	I	20 mg /m ² /jour	3 CR, 2 PR, 5 MR, 12 SD, 8 PD	Bonne tolérance à 160mg/m ² /jour (douleurs modérées)	Association du traitement avec GM-CSF, 30 patients inclus

Tableau 5. Synthèse des évaluations cliniques pour l'AcM 3F8.

Aucun effet antitumoral significatif n'a été mis en évidence pour l'AcM 3F8 durant les phases cliniques I et II. Cependant, des réponses favorables ont été enregistrées au niveau de la moelle osseuse ^[153]. De plus, l'utilisation de facteurs de croissance (GM-CSF) et d'anticorps armés (¹³¹I-3F8) apparaissent comme des stratégies thérapeutiques prometteuses. Les principaux effets secondaires sont la douleur (parfois sévère), l'hypertension, l'hypotension, la fièvre et des réactions allergiques de type urticaire. Le développement d'anticorps dirigés contre le 3F8 (HAMA : *Human Anti-Humanized Antibody*, anticorps humain anti-anticorps humanisés) limite l'efficacité du traitement.

c. Anticorps murin 14G2a

Essais	Phases	Doses	Réponses cliniques	Effets secondaires	Remarques
Handgretinger et al. [154]	I	100 à 400 mg /m ² (répartie sur 5 à 10 jours)	2CR, 2PR, 2SD	Diminution des niveau sériques de complément, réactions allergiques (prurit, urticaire...) hypotension et douleurs sévères	9 patients inclus (6 patients évalués)
Frost et al. [155]	I	15 mg/m ² /j (MTD)	1CR, 1PR, 3MR	Réactions allergiques et anaphylactiques, douleurs, fièvre Développement d'HAMA	Association à l'IL-2 33 patients inclus
Sondel et al. [156]	I	NR	NR	Développement d'HAMA	Combinaison avec IL-2 et GM-CSF

Tableau 6. Synthèse des évaluations cliniques pour l'AcM 14G2a.

Suite aux premières évaluations cliniques, le 14G2a présente les mêmes effets toxiques que le 3F8 (douleurs, réaction allergiques...). L'induction d'HAMA semble similaire. Le 14G2a n'est donc plus employé en thérapeutique et de nouvelles générations d'anticorps ont été créées afin de diminuer ces phénomènes d'immunisation : anticorps chimériques ou humanisés.

d. Anticorps chimérique ch14.18

Essais	Phases	Doses	Réponses cliniques	Effets secondaires	Remarques
Hand gretinger et <i>al.</i> [157]	I	30 à 50 mg /m ² /jour (5jours)	2 CR, 2 PR, 1 MR, 1 SD, 3 PD	Douleurs abdominales, prurit et urticaire Aucune réponse HAMA	9 patients inclus
Uttenreuther-Fisher et <i>al.</i> [158]	I	10 à 200 mg /m ²	Demi vie de l'Ac lors de la 1e injection : 66.6 +/- 27.4 h 2e injection : 31.7 +/- 18.4 h	NR	Diminution significative de la demi vie lors des administrations répétées, 10 patients inclus
Sondel et <i>al.</i> [156]	I	NR	NR	Développement d'alloAc	Combinaison avec IL-2 et GM-CSF
Yu et <i>al.</i> [159]	I	10 à 200 mg /m ²	1 PR, 4 MR, 1 SD	Douleurs, tachycardie, hypertension, fièvre, urticaire	10 patients inclus
Ozkaynak et <i>al.</i> [160]	I	20 à 50 mg /m ² /j (4jours)	NR	Douleurs neuropathiques sévères, fièvre, nausées, vomissement, hypotension, hyperperméabilité capillaire modérée, urticaire	Association avec GM-CSF, 19 patients inclus
Simon et <i>al.</i> [161]	NR	20 mg/m ² /j (5jours, 6cycles)	Survie globale amélioré par rapport à la chimiothérapie, EFS similaire	Fièvre, hausse de la CRP, toux, rash, douleurs	Traitement de consolidation après chimiothérapie, patients de plus d'un an, 166 patients inclus
Simon et <i>al.</i> [162]	NR	20 mg /m ² /j (5jours, 6cycles)	NR	Fièvre, hausse de la CRP, toux, rash, douleurs	Traitement de consolidation après chimiothérapie, 31 patients inclus
Gilman et <i>al.</i> [163]	I	25 mg /m ² /j (4 jours)	NR	Douleur, fièvre, vomissements, diarrhées, élévation des transaminases, hyperperméabilité capillaire et urticaire	Association avec IL-2 et GM-CSF, 25 patients inclus
Yu et <i>al.</i> [7]	III	25 mg /m ² /j (4jours, 5cycles)	Amélioration de la survie à 2 ans (84% contre 76% pour la chimiothérapie standard)	Douleur, hypotension, hyperperméabilité capillaire, réaction d'hypersensibilité, fièvre, hyponatrémie, hypokaliémie, élévation des transaminases	Association avec IL-2, isotrétinoïne et GM-CSF, 113 patients inclus

Tableau 7. Synthèse des évaluations cliniques pour l'AcM ch14.18.

La chimérisation de l'anticorps ch14.18 avait pour but la diminution de l'immunisation de l'organisme lors du traitement. Seule une étude ^[156] indique la présence d'anticorps dirigés contre le ch14.18 : l'amélioration de la tolérance est donc prouvée. La dernière étude de phase III ^[6] présente des résultats cliniques encourageants, avec une amélioration de la survie des patients traités par ch14.18. Cependant, l'étude de Simon et al. ^[162] indique que l'anticorps seul n'améliore pas le pronostic chez les enfants de moins de un an. L'association à l'IL-2, l'acide rétinoïque ou le GM-CSF contribue à la diminution du nombre de rechutes ^[2,7,163]. L'utilisation combinée de ch14.18 et de cytokines représente donc un espoir majeur dans l'amélioration du pronostic du neuroblastome de haut risque. Il est néanmoins nécessaire de noter que les syndromes douloureux liés à la fixation de l'AcM au niveau des fibres nerveuses périphériques obligent fréquemment un recours à des antalgiques opiacées et limitent l'efficacité de l'immunothérapie.

Compte tenu de l'interdiction de l'utilisation du GM-CSF en Europe. Un essai de phase III associant le ch14.18 et l'IL-2 sans facteur de croissance hématopoïétique est actuellement en cours ^[164].

e. Anticorps humanisés hu14.18 et hu14.18K322A

Une première étude a démontré la capacité de hu14.18 à activer *in vitro* des polynucléaires, traduisant ainsi la capacité à générer une réponse de type ADCC ^[104]. Il est à noter que l'utilisation de l'immunocytokine hu14.18-GM-CSF est plus efficace que l'anticorps seul ou associé au GM-CSF pour induire une réponse ADCC.

L'anticorps hu14.18 a également été évalué *in vitro* en combinaison avec une protéine de fusion (Fc-IL-7) sur un modèle de neuroblastome. Les lymphocytes $\gamma\delta$, responsables de l'activité antitumorale, voient leur potentiel cytotoxique amélioré par le hu14.18. L'ajout de Fc-IL-7 améliore la survie des lymphocytes ^[165]. Cette association devrait être approfondie sur modèle murin.

L'anticorps hu14.18K322A est actuellement en cours d'évaluation dans un essai de phase I aux États-Unis ^[115].

f. Anticorps conjugués

- hu14.18-IL-2

Cette immnuocytokine est issue de la combinaison de l'anticorps humanisé hu14.18 et de l'interleukine 2. Le Tableau 8 ci-dessous présente les résultats cliniques obtenus.

Essais	Phases	Doses	Réponses cliniques	Effets secondaires	Remarques
King et al. [166]	I	0.6 à 7.5 mg /m ² /j (3 jours)	27 SD	Hyperphosphatémie, hypoglycémie, hypoxie, arthralgie et/ou myalgie sévère	Essais sur mélanomes exprimant le GD2, 33 patients inclus MTD = 7.5 mg/m ² /j
Osenga et al. [114]	I	Croissante jusqu'à 12 mg /m ² /j (MTD)	15 SD	Hypotension, réaction allergique, trouble de la vision, neutropénie, leucopénie et thrombopénie (réversibles)	28 patients inclus
Hank et al. [123]	I	12 mg/m ² /j (3 jours x 4 semaines)	Réponse clinique chez 3 patients	Développement d'HAHA chez 44 patients (dont 12 réponses partielles)	61 patients inclus (neuroblastomes et mélanomes)
Shusterman et al. [125]	II	12 mg/m ² /j (3 jours x 4 semaines)	5 CR, 7 SD*, 24 PD*	Douleurs, rash, réactions allergiques, hypotension, hypoxie, élévation des transaminases hyperperméabilité capillaire	39 patients inclus (36 évalués)

Tableau 8. Synthèse des évaluations cliniques pour la protéine de fusion hu14.18-IL-2.

*Le groupe présentant des tumeurs volumineuses (visible à l'IRM) ne présente pas d'effet bénéfique (n= 13; 3 SD et 10 PD). MTD : *maximum tolerated dosis* (dose maximale tolérée).

Des régressions tumorales ont été mises en évidence au cours d'une étude clinique de phase II [125]. Ces résultats sont encourageants, car tous les patients inclus dans cette étude possédaient un neuroblastome réfractaire à une première prise en charge classique. Cependant, le traitement semble inefficace en cas de masse tumorale importante. Cet élément conforte la place de l'immunothérapie dans le traitement de la maladie résiduelle, après une prise en charge par chimiothérapie, radiothérapie et/ou geste chirurgical.

Il est à noter que l'étude de Hank et al. ^[123] met en évidence la présence d'HAHA (*Human Anti-Humanized Antibody*: anticorps dirigé vers un anticorps humanisé). Ce phénomène a déjà été décrit ^[167]. L'impact de cette immunisation sur l'efficacité de l'immunothérapie reste controversé. En effet, l'apparition d'anticorps anti idiotype n'est pas toujours corrélée à une détérioration de la réponse clinique, comme en témoignent les études de Cheung et al. ^[149,150,168,169]. Ces éléments corroboreraient l'existence d'anticorps anti anti-idiotypes, générés secondairement et porteurs d'une activité antitumorale.

- ¹³¹I-3F8

Une première évaluation clinique de phase I a été effectuée sur 23 patients avec un neuroblastome de grade 4. Sur les dix patients évaluables, deux ont présenté une rémission complète de la moelle osseuse et deux une réponse partielle ^[127]. Compte tenu de ces résultats encourageants, le ¹³¹I-3F8 a été inclus au protocole MSKCC (*Memorial Sloan-Kettering Cancer Center*) incluant des enfants avec un neuroblastome à haut risque ^[128].

4. Amélioration de l'immunothérapie

a. Mécanismes mis en jeu

Il a été prouvé *in vitro* que les anticorps anti-GD2 induisent une réponse de type ADCC (antibody-dependant cellular cytotoxicity) grâce à leur fragment Fc, capable d'activer les cellules NK, les monocytes et les macrophages ^[73,170].

La fixation des anticorps sur la tumeur entraîne l'activation de la voie du complément, entraînant une réponse CDC ^[102,103]. Ce mécanisme induit la production d'anaphylatoxines (C3a, C5a) responsables d'une partie des effets toxiques apparaissant au cours du traitement: douleurs, fièvre, réaction allergique... La diminution voire la suppression de ce mécanisme est donc à rechercher.

Un troisième élément semble intervenir: une réponse anti-idiotype (Figure 13). Dans un premier temps, des anticorps dirigés contre la partie idiotypique des anticorps thérapeutiques (partie reconnaissant le GD2) sont produits par l'organisme. Dans un second

temps, des anticorps anti-idiotypes sont générés et peuvent à leur tour reconnaître le GD2 et ainsi renforcer la réponse immunitaire contre la tumeur.

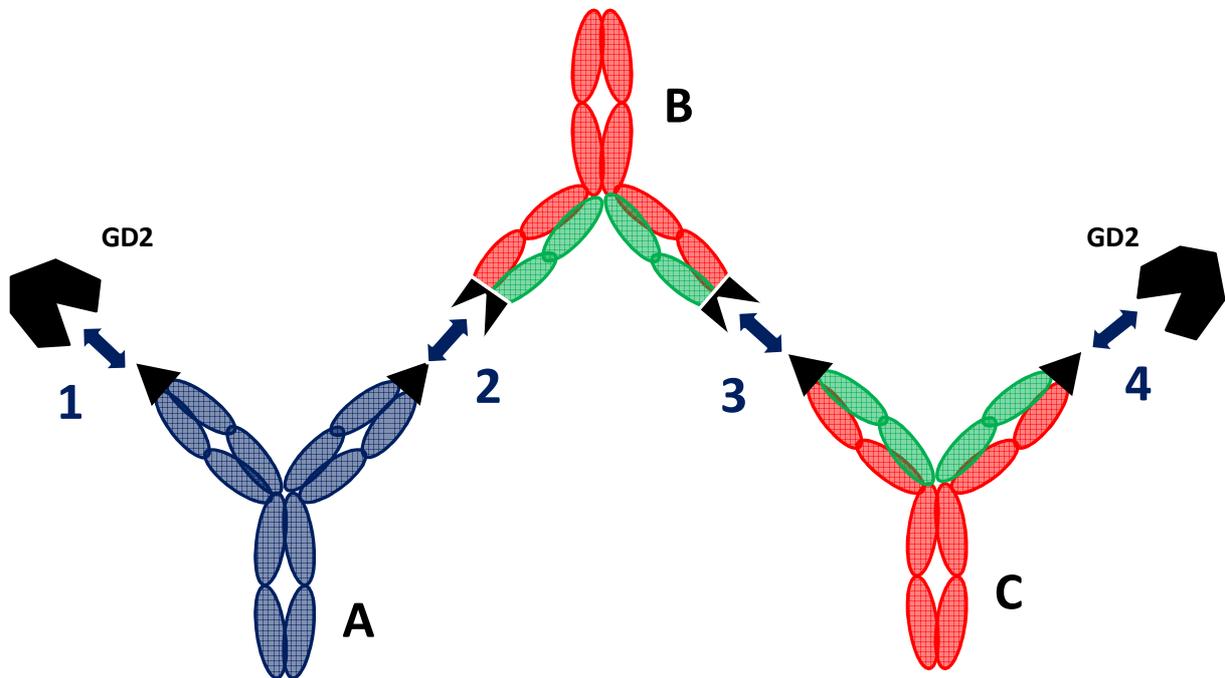


Figure 13. Schéma simplifié de la réponse anti anti-idiotype. 1 : Ac thérapeutique (A) reconnaissant le GD2. 2 : l'Ac anti-idiotype (B) est dirigé contre l'anticorps thérapeutique (A). 3 : l'Ac secondaire anti anti-idiotype (C) reconnaît l'Ac anti-idiotype (B). 4 : L'anticorps secondaire (C) est capable de se fixer au GD2

b. Voies d'optimisation des anticorps ciblant le GD2

L'une des limites de l'immunothérapie est le développement par le receveur d'anticorps dirigés contre les AcM. Le remplacement des anticorps murins par des anticorps chimériques ou humanisés est une parade face à ce phénomène d'immunisation. Ainsi, l'anticorps 14.18 existe sous forme chimérique (ch14.18) ou humanisé (hu14.18) et une version chimérique de l'anticorps 8B6 (anti-GD2 *O*-acétylé) est actuellement en développement au sein de l'IRT (INSERM UMRS 892).

Le renforcement de l'activité ADCC et la diminution de l'activation du complément permettent d'augmenter le pouvoir tumoricide des AcM tout en diminuant une partie des effets secondaires. Le développement de l'anticorps hu14.18K322A a permis d'atteindre ces deux objectifs au cours des phases précliniques. En effet, la mutation de la région Fc réduit

l'activation du complément et l'absence de fucosylation de l'anticorps favorise le mécanisme d'ADCC ^[113].

Malgré ces résultats encourageants, les anticorps ciblant le ganglioside GD2 sont responsables de douleurs sévères, souvent résistantes aux opiacées, limitant donc l'efficacité du traitement. Ce phénomène est lié à l'activation du complément par la fixation des anticorps sur le GD2 au niveau des fibres nerveuses périphériques ^[171].

Par sa très faible distribution au niveau des tissus sains et sa présence importante au sein des neuroblastomes, le GD2 *O*-acétylé représente une nouvelle cible thérapeutique prometteuse. L'anticorps 8B6¹² est une IgG3 d'origine murine ciblant le GD2 *O*-acétylé. À ce jour, aucun article n'a été publié concernant l'efficacité clinique de l'anticorps 8B6 anti-GD2 *O*-acétylé. Cependant, Alvarez et al. ^[8] ont mis en évidence *in vitro* des propriétés antitumorales semblables à celles obtenues avec le 14G2a. Sa fixation exclusive sur le GD2 *O*-acétylé a également été prouvée par test à l'immunoperoxidase sur lignées cellulaires exprimant le GD2 *O*-acétylé ainsi que par analyse immunohistologique de plusieurs coupes de tissus sains. Cette spécificité permettrait d'éviter les épisodes douloureux liés à la fixation des anticorps sur le GD2 présent à la surface des fibres nerveuses périphériques.

Il est à noter que l'analyse immunohistologique révèle une fixation du 8B6 sur certains tissus normaux tels que la moelle osseuse, les ganglions lymphatiques ou la thyroïde, indiquant une possible expression du GD2 *O*-acétylé. Cette fixation n'est cependant pas considérée significative et n'interdit donc pas la poursuite de l'évaluation *in vitro* du 8B6.

L'emploi de l'IL-2 ou de facteurs de croissance GM-CSF lors des immunothérapies a permis une amélioration de la réponse clinique, en stimulant les voies de signalisations responsables de la réponse antitumorale. Dans cette optique, le développement d'anticorps conjugués pourrait permettre une nouvelle avancée dans la prise en charge du neuroblastome.

D'autres pistes de recherches sont aujourd'hui envisagées et sont susceptibles d'apporter un bénéfice supplémentaire dans le traitement du neuroblastome. Des anticorps bispécifiques (anti-CD3 / anti-GD2) sont actuellement évalués en phases précliniques ^[172]. Ils pourraient augmenter le potentiel tumoricide des lymphocytes T en redirigeant leur réponse cytotoxique contre le neuroblastome.

¹² Le GD2 *O*-acétylé est produit au sein du laboratoire INSERM UMR 892 ^[173].

SECONDE PARTIE

Production et évaluation des propriétés
biologiques d'anticorps monoclonaux
spécifiques du GD2 *O*-acétylé

I. Introduction

La recherche de nouvelles cibles thérapeutiques dans la prise en charge du neuroblastome à aboutit, au sein de l'équipe 14 du laboratoire de l'IRT, à l'obtention d'un anticorps monoclonal de souris spécifique du dérivé *O*-acétylé du GD2 : le 8B6. Les premiers résultats *in vitro* ont confirmé la spécificité de fixation de cet anticorps ^[8] et ont motivé la poursuite du développement de cet AcM par la création d'une jeune société de biotechnologies : ATLAB Pharma (Nantes).

L'objectif de mon travail au sein de l'IRT était le développement et l'évaluation *in vitro* de cet anticorps dans le respect des BPL. Mes activités de recherche se sont articulées en trois axes :

- La production de l'anticorps 8B6 par des techniques de culture cellulaire et de purification sur colonne d'affinité.
- L'évaluation de la capacité d'inhibition de la viabilité cellulaire de l'anticorps par méthode MTT.
- La rédaction de procédures opérationnelles standardisées et d'une fiche de lot en conformité avec les BPL en collaboration avec la société ATLAB Pharma.

Les lots d'anticorps ont permis de préciser que les propriétés tumoricides de cet AcM étaient liées au blocage du cycle cellulaire et à la mise en apoptose des cellules tumorales exprimant le GD2 *O*-acétylé. Les résultats sont rapportés dans un article soumis pour publication dans *Cancer Letters* dont je suis cosignataire : « *Cell cycle arrest and apoptosis induced by O-Acetyl-GD2-specific monoclonal antibody 8B6 inhibits tumor growth in vitro and in vivo* ».

Les POS sont actuellement utilisées par ATLAB Pharma et l'équipe 14 de l'IRT.

II. Matériel et méthodes

1. Lignées cellulaires

- **IMR32** : lignée de neuroblastome humain, obtenue auprès de l'ATCC (*American Type Culture Collection*) et exprimant le GD2 et le GD2 O-acétylé.
- **NXS2** : lignée de neuroblastome de souris exprimant le GD2 et le GD2 O-acétylé, obtenue gracieusement auprès du Pr. H. Lode, Université de Greifswald, Allemagne.
- **17C9** : clone transformant de cellule CHO sécrétant l'anticorps chimérique c.8B6 obtenu au laboratoire.
- **EL-4** : lignée de cellules de lymphome murin, obtenue auprès de l'ATCC exprimant le GD2 et le GD2 O-acétylé.

2. Hybridomes

- **Hybridome 8B6** : producteur d'AcM 8B6 de souris, spécifique du GD2 O-acétylé (IgG₃, κ)^[173].
- **Hybridome 10B8** : producteur d'AcM 10B8 de souris, dirigé contre le GD2 (IgG₃, κ), obtenu au laboratoire.

Anticorps	Nature	Isotype	Spécificité
10B8	souris	IgG2a	GD2
8B6	souris	IgG3	GD2 O-acétylé
c.8B6	Chimérique homme-souris	IgG1	GD2 O-acétylé
Rituxan	Chimérique homme-souris	IgG1	CD20 humain

Tableau 9. Nature, isotype et spécificité des anticorps.

3. Milieux de culture

Le milieu utilisé pour les lignées d'hybridomes et de neuroblastome est le RPMI 1640 additionné de 10 % de d.SVF, 20 mM de L-glutamine, 10 UI/mL de pénicilline et 10 µg/mL de streptomycine.

Les lignées NXS2 et EL4 requièrent le milieu DMEM auquel sont ajoutés les composants précédemment cités. Les cellules CHO nécessitent un milieu composé de Power CHO2-CD additionné de 10 mL de proHT 100X et 20 mL de glutamine pour un litre de milieu.

Les lignées cellulaires sont cultivées en incubateur à 37°C, dans une atmosphère maintenue à 5 % de CO₂ et avec une humidité de 95 %.

4. Evaluation de la viabilité cellulaire

Il repose sur l'utilisation d'éosine, un colorant vital¹³. Un volume de suspension cellulaire est mélangé à un volume égal d'éosine à 0,15 %. Les cellules sont ensuite dénombrées sur une cellule de Malassez : l'éosine colore les cellules mortes en rouge. À l'issue du comptage, le pourcentage de viabilité est calculé selon la formule suivante :

$$\% \text{ de viabilité} = \frac{\text{Nombre de cellules vivantes}}{\text{Nombre total de cellules}}$$

Ce test permet également d'effectuer un calcul de la concentration cellulaire au sein du milieu :

$$\text{Nombre de cellules par mL} = \text{Nombre total de cellules} * 2 * 1000$$

¹³ Colorant ne pénétrant pas dans les cellules vivantes.

5. Purification des AcM par chromatographie d'affinité

a. AcM 10B8

La colonne de protéine A (5 mL, GE Healthcare Amersham Biosciences, Uppsala, Sueden) est d'abord équilibrée par une solution tampon 0,1 M Tris-HCl (Sigma) pH 7,8. On procède au passage du surnageant par fraction de 2,5 litres sur la colonne avec un débit de 1,5 mL/min. La colonne est ensuite lavée avec 10 volumes de solution tampon d'équilibration. Le matériel fixé à la protéine A est ensuite élué avec un tampon glycine 0,1 M, pH 2,6 puis collecté par fraction de 1 mL. Ces fractions sont immédiatement neutralisées par le dépôt préalable dans les tubes collecteurs de 100 µL d'une solution tampon 1 M Tris-HCl pH 9. La DO des fractions récoltées est lu à 280 nm. Cette DO est proportionnelle à la quantité de protéines présentes dans le milieu (ici, des IgG). Lorsque la concentration est supérieure à 0,1 mg/mL, la fraction est conservée. L'AcM est ensuite dialysé à l'aide de cassettes de dialyse (*Slide-A-Lyzer* Dialysis cassette* - MWCO : 10000, Thermo scientific, Rockford, IL, USA) dans une solution tampon de PBS (Sigma) pH 7,4 et la concentration finale en AcM est déterminée par la mesure de la densité optique de la solution d'anticorps à 280 nm. Une dernière étape de filtration stérilisante est réalisée à l'aide d'une seringue et d'un filtre 0,22 µm.

b. AcM 8B6

La purification de l'AcM 8B6 est réalisée de la même manière que celle de l'AcM 10B8. Cependant, compte tenu de la propension de cet AcM à précipiter, l'élution sera réalisée ici à l'aide d'un tampon glycine 0,1M – NaCl 0,2 M (pH 2,6). Pour la même raison, le bain de dialyse sera composé de PBS – NaCl 0,2 M.

6. Test immunoenzymatique ELISA sur cellules dessiquées

On utilise pour ce test des plaques 96 puits à fond plat (Nunc, Roskilde, Danemark). Elles sont préparées en répartissant des cellules cibles à raison de $5 \cdot 10^4$ cellules IMR32 par puits en suspension dans 50 μL de PBS. Les plaques sont conservées à température ambiante après dessiccation à 37°C pendant une nuit.

Avant utilisation, on procède à trois lavages par ajout de 200 μL de PBS par puits. On utilise éventuellement un papier absorbant pour éliminer le liquide résiduel. Les puits sont ensuite saturés avec 200 μL d'une solution de PBS pH 7,4 contenant 1 % de BSA (Sigma) pendant une heure sous agitation lente. Le milieu d'incubation est ensuite éliminé. Après élimination du surnageant, 100 μL d'AcM dilué au PBS – BSA 0,1 %, pH 7,4 sont ajoutés et incubés pendant deux heures à température ambiante sous agitation lente. Trois lavages (200 μL de PBS par puits) sont alors effectués avant l'ajout d'Ac secondaire (AcP de chèvre anti IgG de souris biotinylé (Jackson immunoresearch) dilué au $1/2000^e$ au PBS – BSA 0,1 % pH 7,4. Après une nouvelle incubation d'une heure et trois nouveaux lavages (200 μL PBS par puits), le complexe streptavidine biotine peroxydase dilué au $1/2000^e$ dans du PBS – BSA 0,1 %, pH 7,4 est ajouté (100 μL par puits) et incubé pendant une heure. Après trois derniers lavages (200 μL de PBS par puits), on ajoute 200 μL de solution d'ABTS (Roche) puis on surveille le développement d'une coloration verte. L'absorbance est déterminée à 405 nm à l'aide d'un spectrophotomètre (Thermo).

7. Cytométrie en flux sur cellules vivantes

Les cellules ($2 \cdot 10^5$) sont remises en suspension dans 100 μL de solution de tampon PBS – BSA 1 % pH 7,4 et incubées à 4°C pendant 30 minutes. Le surnageant est ensuite éliminé après centrifugation à 900g pendant 1 minute à 4°C. Les cellules sont remises en suspension dans une solution d'AcM (10 $\mu\text{L}/\text{mL}$) diluée dans du PBS – BSA 1 % puis incubées 45 minutes à 4°C. La solution d'AcM est alors éliminée après une centrifugation à 900g

(1 minute à 4°C). Les cellules sont reprises dans une solution d'anticorps de détection (AcP de chèvre couplé à l'isothiocyanate de fluorescéine). La fluorescence est analysée en cytométrie de flux à l'aide d'un cytomètre en flux FACScan (*Cell Quest**, Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA).

8. Analyse électrophorétique SDS-PAGE

Les échantillons d'AcM sont repris en tampon Tris-HCl 0,5M pH 6,8 contenant 10 % de glycérol (VWR, Strasbourg, France), et 5 % de 2-mercaptoéthanol (Promega, Madison, USA) pour l'électrophorèse en conditions réductrices et sans 2-mercaptoéthanol en conditions non réductrices. Ils sont portés à 99°C pendant deux minutes, puis analysés en électrophorèse SDS-PAGE selon la technique de Laemmli ^[174]. Les protéines sont déposées à raison de 3 µg dans des puits d'un gel « miniprotean-TGX » (Biorad, Marne la Coquette, France) de 1,5 mm d'épaisseur avec pour gels supérieur et inférieur des concentrations en polyacrylamide de 4 % et 15 %. Après électrophorèse à 100V pendant deux heures à température ambiante, les gels sont fixés et colorés avec du bleu de Coomassie R250 (Quantum, Wixon, Michigan, USA). Les masses moléculaires sont calculées à partir de la migration de marqueurs de masse moléculaire « *precision plus all blue standard* » (Biorad, Marne la Coquette, France).

9. Test d'inhibition de la prolifération cellulaire au MTT

L'inhibition de la viabilité cellulaire est mesurée à l'aide du test au MTT ^[175]. Le MTT est un sel de tétrazolium qui peut être réduit en formazan par la SDH (succinate déshydrogénase), une enzyme mitochondriale. Il se forme alors un précipité de couleur violette dans la mitochondrie. La quantité de précipité formée est proportionnelle à l'activité métabolique des cellules. Il suffit de lyser les cellules et de solubiliser les cristaux dans une

solution de lyse pour déterminer la quantité relative de cellules vivantes et métaboliquement actives par mesure de la densité optique.

5.10^3 cellules sont mises en suspension dans 100 μ L de milieu de culture et déposées dans un puits de plaque de microtitration 96 puits (Nunc, Roskilde, Danemark). Les cellules sont incubées pendant 24 heures avant l'ajout de l'AcM 8B6. Après une nouvelle incubation de 24 heures à 37°C et 5 % CO₂, 10 μ L de solution mère de MTT (Roche) sont ajoutés. Quatre heures plus tard, 100 μ L de la solution de lyse (Roche) sont ajoutés. Après une dernière incubation de 12 heures à 37°C, l'absorbance est lue à 570 nm et à 650 nm à l'aide d'un spectrophotomètre (Thermo Electron corporation, Waltham, MA, USA). La valeur obtenue à 650 nm correspond au bruit de fond et doit donc être soustraite à la valeur obtenue à 570 nm. Les résultats seront exprimés en pourcentage d'inhibition de croissance, la valeur de référence étant la moyenne des puits ne contenant pas d'anticorps.

Le tableau ci-dessous présente les caractéristiques des lignées étudiées :

Lignées	Type	Origine	Profil gangliosidique
NXS2	Neuroblastome	Souris	GD2, GD2 <i>O</i> -acétylé, GD3
IMR32	Neuroblastome	Humaine	GD2, GD2 <i>O</i> -acétylé
EL4	Lymphome	Souris	GD2, GD2 <i>O</i> -acétylé

Tableau 10. Type, origine et profil gangliosidique des lignées NXS2, IMR32 et EL4.

III. Résultats

1. Production des anticorps monoclonaux 8B6 et 10B8

a. Suivi de croissance cellulaire

Les hybridomes 8B6 et 10B8 ont été utilisés pour obtenir respectivement les AcM 8B6 et 10B8. Les anticorps ont été obtenus à partir du surnageant de culture. Les cellules sont cultivées dans le milieu RPMI 1640 contenant 10 % de sérum de veau foetal décomplémenté, additionné de L-glutamine et de pénicilline - streptomycine et incubées à 37°C avec 5 % de CO₂. Tous les jours, la concentration cellulaire et la viabilité sont déterminées. Un exemple caractéristique de courbe de croissance est présenté dans la Figure 14. Les cellules sontensemencées à J₀ à hauteur de 200 000 cellules par mL. On observe une phase exponentielle de J₀ à J₄. Ensuite les cellules commencent à mourir en raison de l'épuisement du milieu. Le temps de doublement est de 31 heures pour l'hybridome 10B8 (mesuré entre J₁ et J₃).

Le surnageant contenant l'AcM est récolté lorsque la viabilité cellulaire est proche de 85 %. En deçà de cette viabilité, le surnageant se retrouve pollué par de nombreux débris cellulaires, rendant la purification de l'AcM très délicate. Parallèlement, le titre en AcM est déterminé par test immunoenzymatique ELISA sur cellules dessiquées. Il est maximum à J₄ (données non présentées).

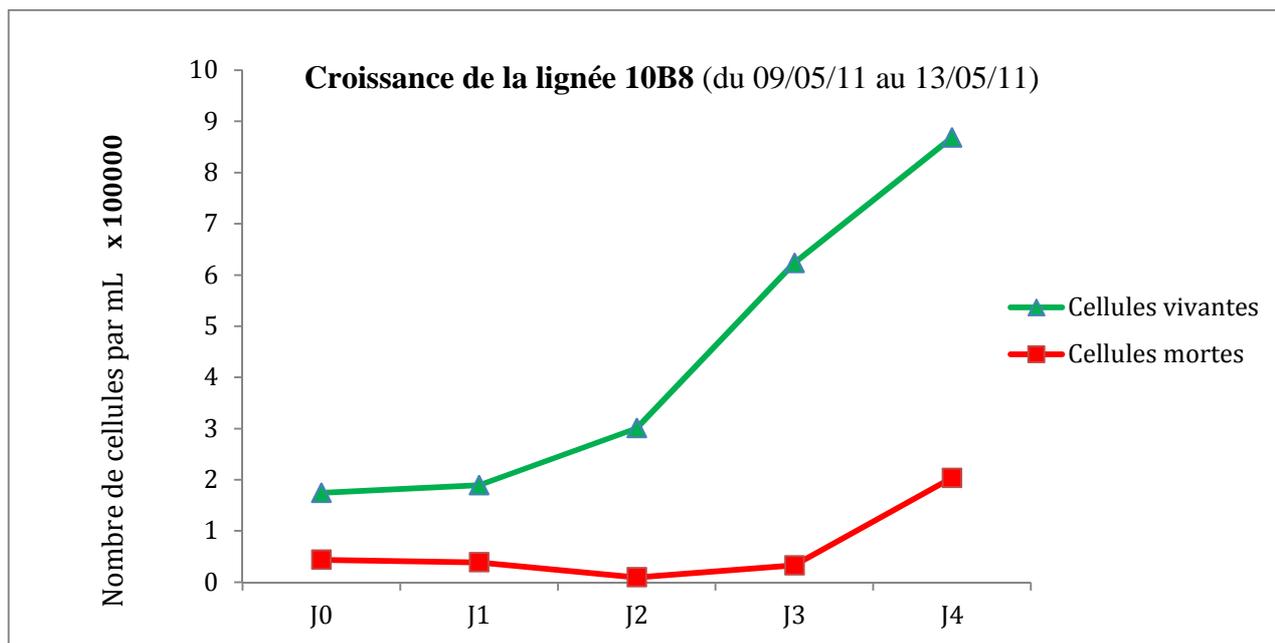


Figure 14. Courbe de croissance cellulaire de l'hybridome 10B8.

b. Purification des anticorps monoclonaux à partir du surnageant de culture

Les AcM 8B6 et 10B8 ont été purifiés à partir de leur surnageant de culture respectifs par chromatographie d'affinité sur colonne de protéine A.

Le Tableau 11 présente les volumes de surnageant traités pour chacune des lignées et les quantités d'anticorps obtenues.

Une fois l'AcM fixé sur la protéine A, on utilise une solution d'éluion pour récupérer ce dernier. L'AcM est récupéré en solution sous la forme de 20 fractions de 1 mL. La Figure 15 montre un exemple de profil d'éluion correspondant au matériel retenu sur la protéine A après passage de 2,6 litres de surnageant de culture de 8B6. Ce profil est obtenu par passage des différentes fractions au spectrophotomètre (Nanodrop ND-1000*). Les fractions 5 à 9 sont rassemblées dialysées dans du PBS – NaCl 0,2M.

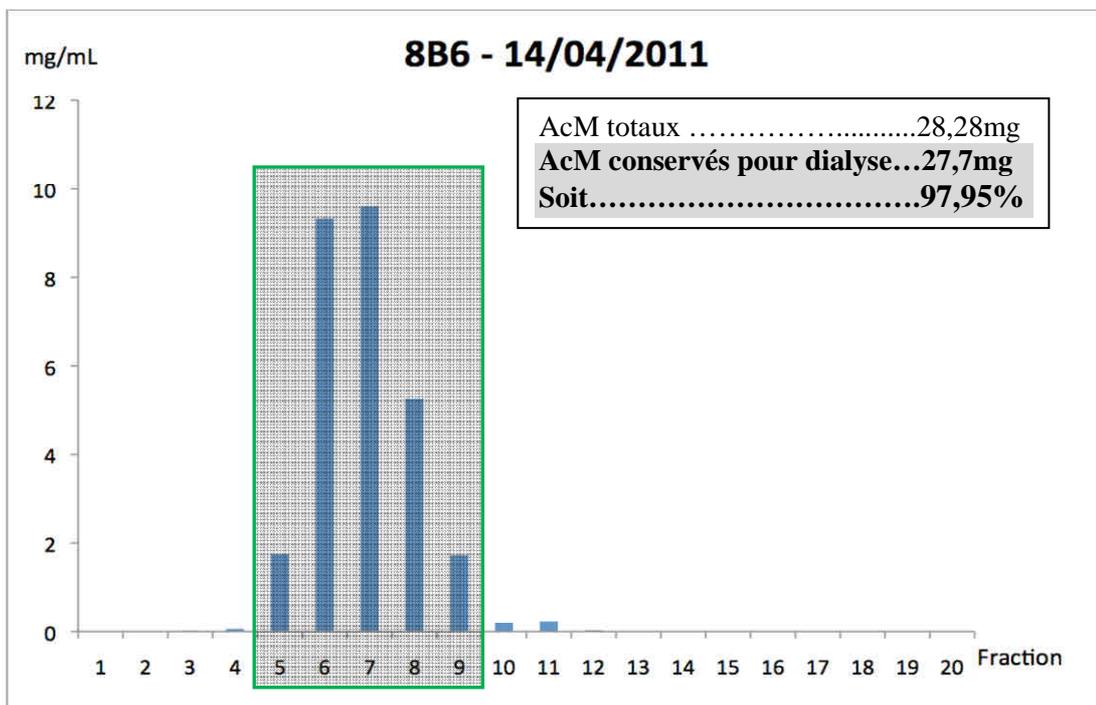


Figure 15. Profil d'élution de l'AcM 8B6 purifié par chromatographie d'affinité. La zone grisée correspond aux fractions conservées pour l'étape de dialyse.

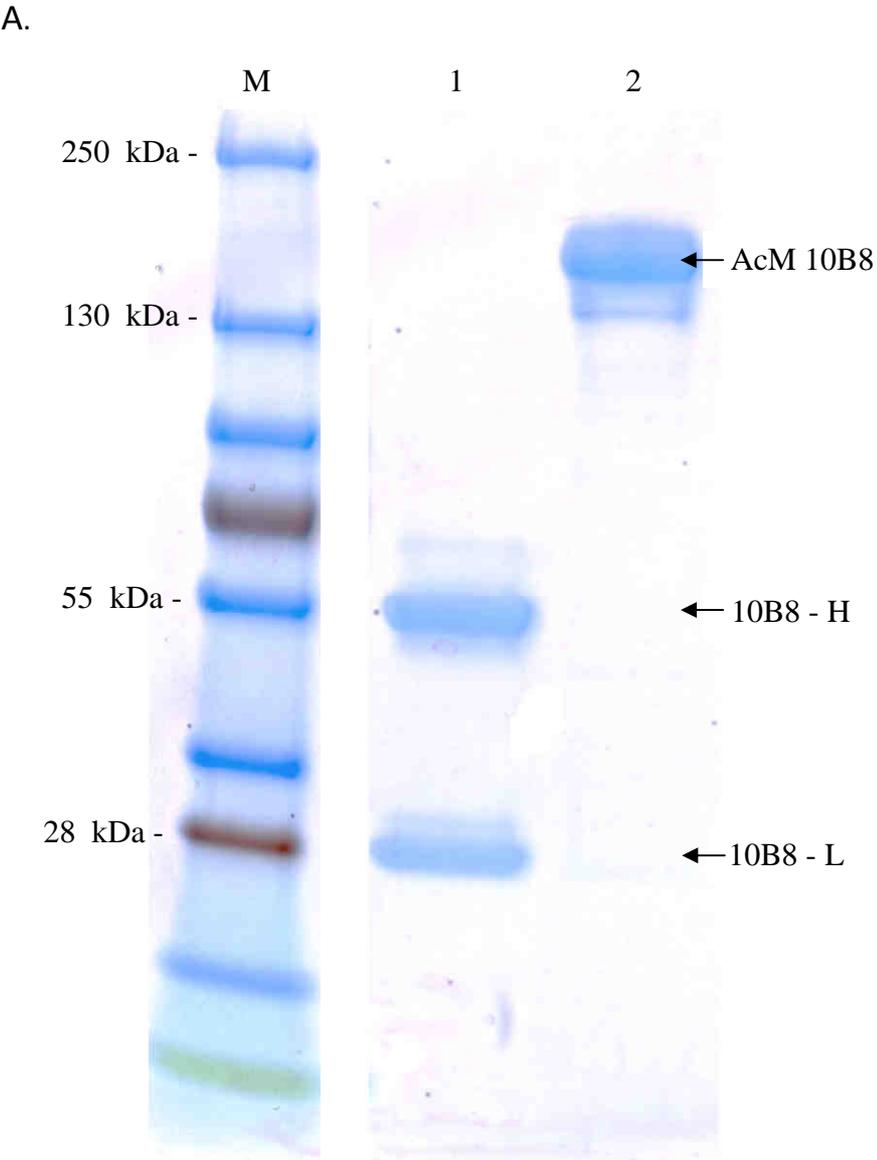
AcM	8B6	10B8
Surnageant de culture	7,5 Litres	9,7 Litres
Quantité d'AcM purifiée après passage sur protéine A	73,68 mg	41,88 mg
Quantité d'AcM obtenue après dialyse et filtration terminale	69,9 mg	27,8 mg

Tableau 11. Volume de surnageant et quantité d'AcM produit pour le 10B8 et 8B6.

c. Analyse de la pureté des anticorps purifiés

L'analyse par électrophorèse en gel de polyacrylamide en milieu dissociant SDS des échantillons purifiés permet d'identifier les espèces moléculaires qui ont été éluées en fonction de leur poids moléculaire. Les immunoglobulines de classe IgG sont définies en

électrophorèse SDS-PAGE par une bande de migration d'environ 150 kDa. En conditions dénaturantes et réductrices, nous observons deux bandes : la première d'un poids moléculaire de 50 kDa correspondant aux chaînes lourdes et une seconde d'un poids moléculaire de 25 kDa correspondant aux chaînes légères. Ces résultats sont présentés dans la Figure 16.



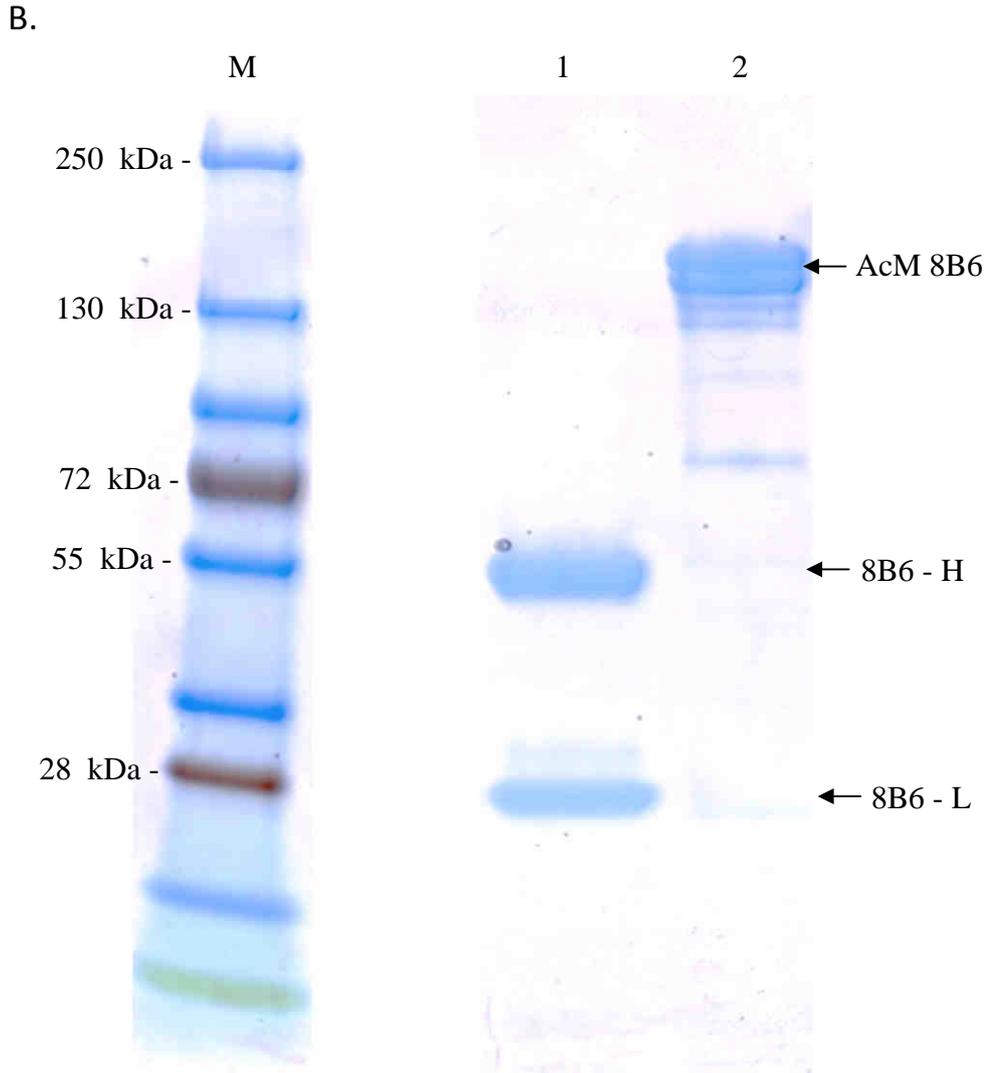
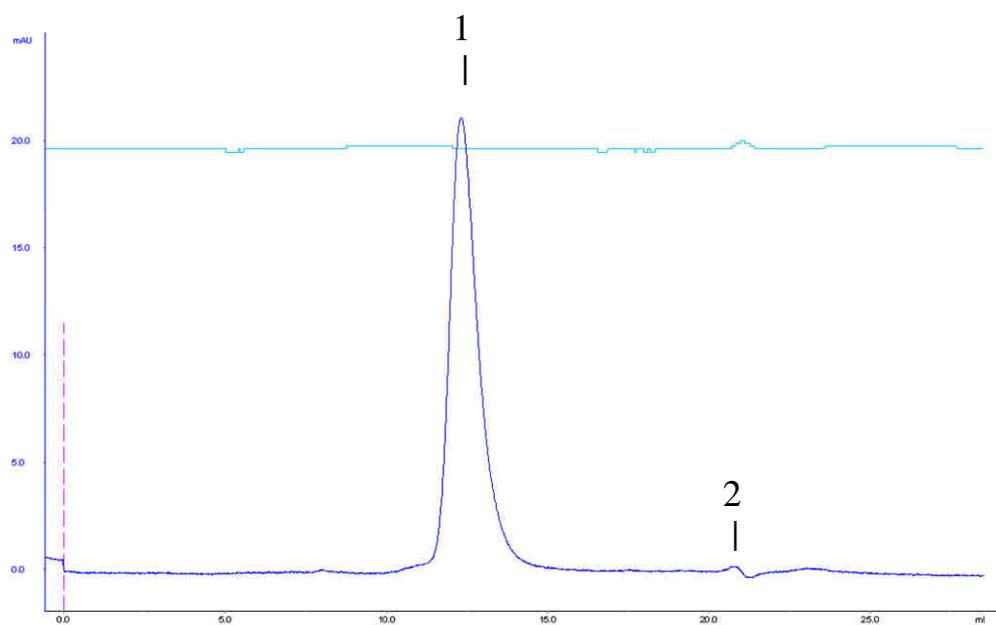


Figure 16. Analyse électrophorétique des AcM 10B8 (Panneau A) et 8B6 (Panneau B) par SDS-PAGE sur gel de polyacrylamide (4 – 15 %) en conditions réductrices (1) et non réductrice (2). La coloration est réalisée à l'aide de bleu de Coomassie. Piste 1, AcM traité en conditions dénaturantes et réductrices ; Piste 2, AcM traité en conditions dénaturantes non réductrice ; Piste M, marqueurs de poids moléculaire. La présence de doublets s'explique par différents niveaux de glycosylation des AcM. L'analyse électrophorétique SDS-PAGE révèle également la présence de bandes minoritaires de différents poids moléculaires. Le degré de pureté des lots d'AcM 8B6 et 10B8 estimé par l'analyse densitométrique du gel d'électrophorèse est de 92 % pour l'AcM 8B6 et 99 % pour l'AcM 10B8. H (= *heavy*) chaîne lourde et L (= *light*) chaîne légère de l'anticorps.

La pureté des AcM a également été contrôlée par chromatographie d'exclusion moléculaire à haute performance utilisant une colonne HPLC *Superdex** 200. Le profil d'éluion de l'AcM 8B6 obtenu est présenté dans la Figure 17.

A.



B.

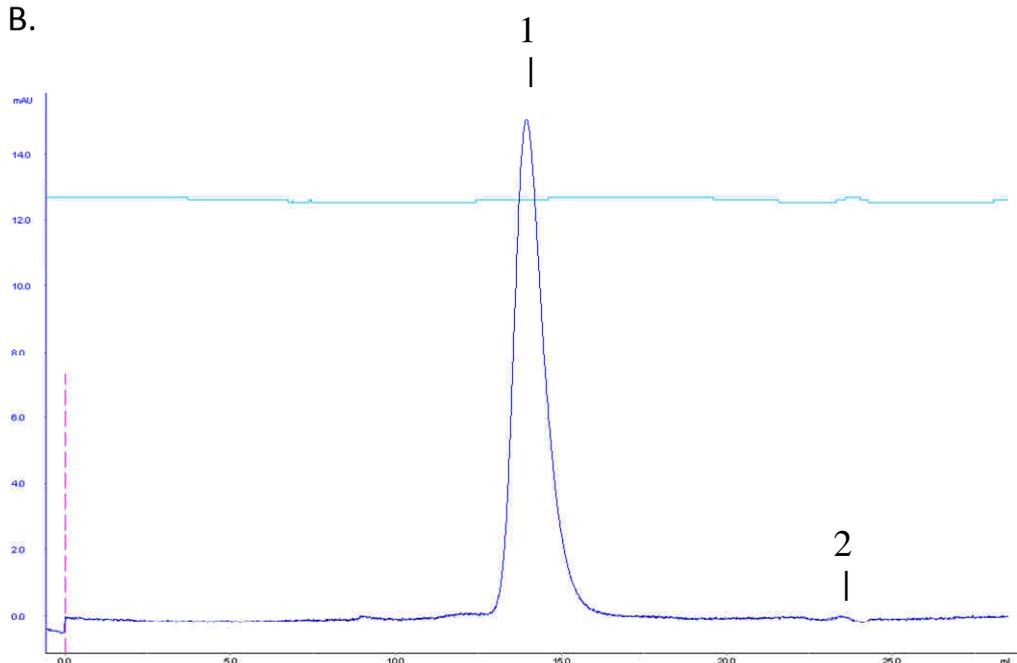


Figure 17. Profil HPLC de l'AcM 8B6 avant (A) et après (B) dialyse. L'analyse du chromatogramme indique un pic majoritaire (1) à 13 minutes avec un contaminant minoritaire (2) à 21 minutes (Panneau A). Après dialyse, on retrouve le pic majoritaire (1) à 14 minutes avec une impureté (2) quasi indétectable à 24 minutes (Panneau B).

d. Analyse de la spécificité des anticorps monoclonaux

L'analyse de la spécificité des AcM purifiés a été réalisée par test immunoenzymatique ELISA sur cellules desséchées. Les courbes de titration respectives des AcM 8B6 et 10B8 sur les cellules desséchées IMR32 exprimant le GD2 et sa forme *O*-acétylé sont présentées dans la Figure 18. Le titre est de 7,16 mg/mL pour le 8B6 (Panneau A) et de 6,2 mg/mL pour le 10B8 (Panneau B). Les titres sont conformes à ceux retrouvés avec les précédents lots d'AcM préparés (données non présentées).

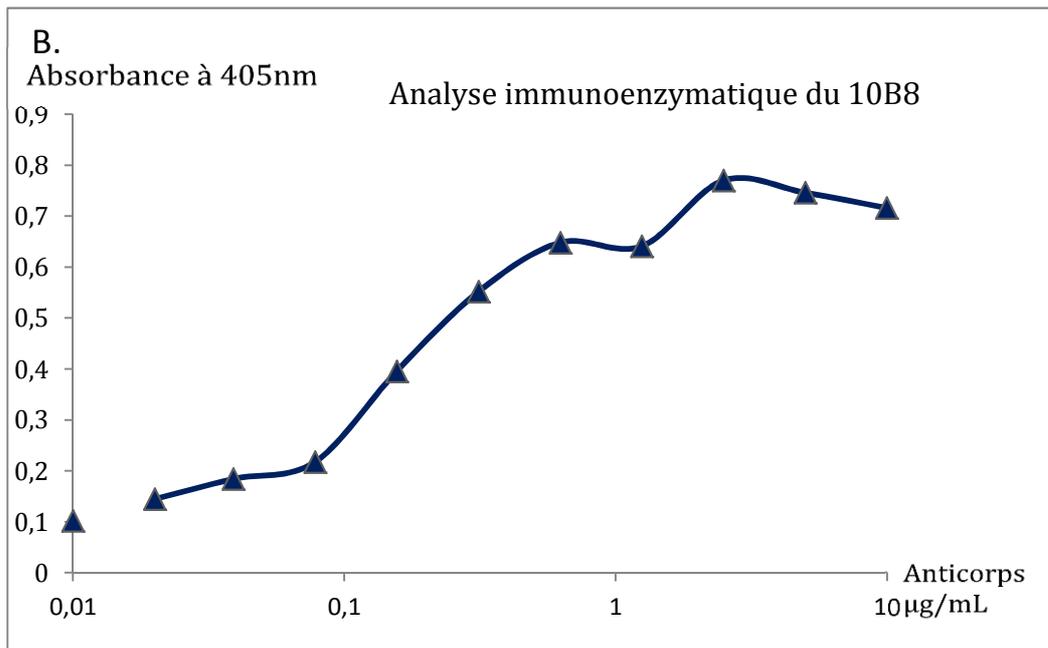
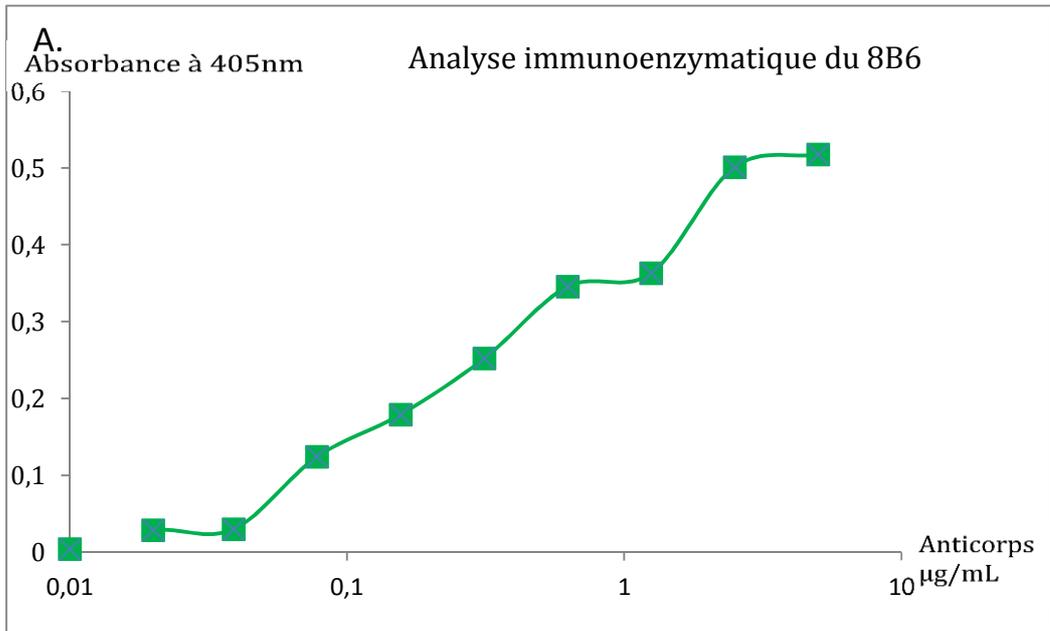


Figure 18. Analyse immunoenzymatique ELISA de l'AcM 8B6 (Panneau A) et de l'AcM 10B8 (Panneau B). Les courbes représentent l'absorbance à 405 nm en fonction du titre en AcM. Les résultats sont présentés sous forme semi logarithmique.

e. Discussion

Nous avons préparé un lot d'AcM 8B6 anti-GD2 *O*-acétylé et un lot d'AcM 10B8 anti-GD2. Les rendements mesurés après purification par chromatographie d'affinité sont de 9,73 mg/mL pour l'hybridome 8B6 et 4,13 mg/mL pour l'hybridome 10B8. L'analyse de la pureté par SDS-PAGE et par chromatographie à haute performance par perméation montre que les lots obtenus sont purs à plus de 95 %. L'analyse de la spécificité des AcM réalisée par test immunoenzymatique ELISA sur cellules desséchées démontre que les AcM purifiés ont conservé leur propriété de reconnaissance spécifique de leur antigène cible.

2. Criblage des anticorps monoclonaux et des ACC par la méthode MTT

a. Mise au point de la méthode

Avant d'appliquer un test MTT à une molécule d'intérêt, on réalise un test MTT sur cellules seules afin de déterminer le meilleur nombre de cellulesensemencées par puits de plaque de microtitration 96 puits. Un nombre trop faible ne permettra pas d'observer des différences significatives de DO alors qu'un nombre trop important peut conduire à une mortalité par épuisement du milieu.

Une fois ce nombre déterminé, une gamme de dilution est réalisée avec la molécule à tester. Une cinétique peut également être effectuée (24h, 48h, 72h) afin d'évaluer le délai d'action de la molécule.

b. Résultats obtenus

La capacité d'inhiber la viabilité cellulaire de l'AcM 8B6 a été analysée sur les lignées cellulaires IMR32 et NXS2 (Figure 19) qui expriment le GD2 et le GD2 *O*-acétylé. On remarque qu'il y a une inhibition de la prolifération avec l'AcM 8B6 qui est dose dépendante et est maximale à 20 µg/mL. Ainsi, à 48 heures elle est d'environ 40 % sur les cellules NXS2

et de 80 % sur les cellules IMR32. On note enfin que l'AcM 7H2 anti GD3 O-acétylé ne présente pas d'effet sur ces deux lignées qui n'expriment pas le GD3 O-acétylé.

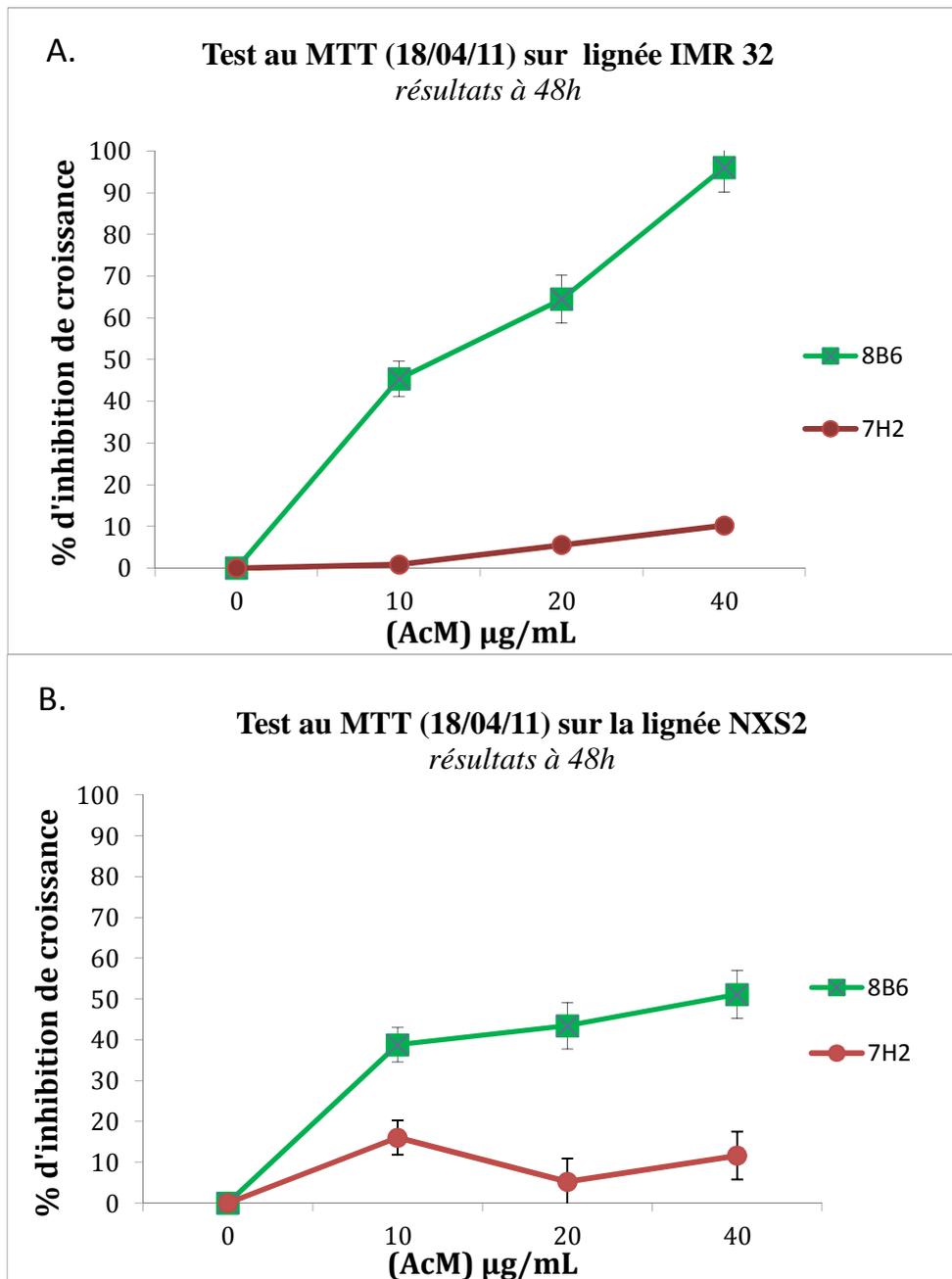


Figure 19. Résultats du test MTT. Inhibition de la viabilité cellulaire des cellules de neuroblastome humain IMR32 (Panneau A) et des cellules de neuroblastome de souris (Panneau B) après 48h d'incubation avec l'AcM 8B6 (■) ou l'AcM contrôle 7H2 (●).

c. Discussion

Les tests MTT réalisés dans les conditions définies dans la section « Matériel et méthodes » montre qu'il est possible d'analyser les propriétés d'inhibition de la viabilité cellulaire de l'AcM 8B6 sur la lignée de neuroblastome de souris NXS2 et sur la lignée de neuroblastome humain IMR32. Toutefois, une mise au point supplémentaire est à réaliser pour la lignée EL4 où les résultats obtenus n'ont pas permis de valider la méthode utilisée avec les cellules NXS2 et IMR32. Quoi qu'il en soit, nos résultats indiquent que les AcM anti-GD2 *O*-acétylé présentent une cytotoxicité intrinsèque vis-à-vis des cellules tumorales exprimant l'antigène cible. Cette cytotoxicité est indépendante du système immunitaire comme le complément ou les cellules immunitaires exprimant un récepteur Fc.

Ces résultats sont à rapprocher des résultats obtenus avec les AcM spécifiques du GD2 ^[174], qui présentent une activité pro-apoptotique sur les cellules tumorales exprimant le GD2. Toutefois, dans le cas de l'AcM 8B6 spécifique du GD2 *O*-acétylé, il reste à mettre en évidence les mécanismes conduisant à cette inhibition de viabilité. Outre l'apoptose d'autres mécanismes sont envisageables, comme le blocage du cycle cellulaire. Par ailleurs, les propriétés de cytotoxicité directe des AcM anti-GD2 *O*-acétylé que nous mettons en évidence ici présentent un intérêt clinique chez le patient. En effet, les cellules tumorales peuvent acquérir des mécanismes de résistance à la CDC et à l'ADCC. Il devient maintenant intéressant de connaître les voies de signalisation induites par la liaison de l'AcM 8B6 au GD2 *O*-acétylé à la surface de la cellule tumorale et d'identifier les ACC présentant un effet additif ou synergique afin d'améliorer l'efficacité antitumorale des AcM anti-GD2 *O*-acétylé.

Le test MTT adapté aux cellules de neuroblastome NXS2 et IMR32 permettra ici de réaliser un criblage rapide pour la mise en évidence de nouvelles associations au pouvoir tumoricide plus important.

3. Rédaction de documents à visée BPL

a. Les procédures opérationnelles standardisées

Dans le cadre de l'instauration de procédures conformes aux BPL pour la production d'AcM de qualité compatible avec une utilisation dans des modèles *in vivo*, j'ai participé à la rédaction de procédures opérationnelles standardisées (POS). Ces procédures sont élaborées à partir d'un cadre commun à l'ensemble des procédures. Ce cadre est présenté dans la Figure 20. L'ensemble des chapitres doit être rempli ou, à défaut, porter la mention NR (non renseigné). Chaque POS doit être vérifiée et approuvée par les personnes habilitées avant d'être utilisée. Chaque POS doit être régulièrement remise à jour. Seule la dernière version de chaque POS fait figure de document de travail ; l'ensemble des POS de version antérieure doit être archivé.

Ma participation à la rédaction des POS concerne la liste de procédures suivantes :

- POS congélation de la lignée cellulaire CHO-S,
- POS décongélation de cellules,
- POS préparation de plaques ELISA avec cellules IMR32 dessiquées,
- POS test immunoenzymatique ELISA indirect sur cellules dessiquées IMR32 ¹⁴,
- POS analyse électrophorétique SDS-PAGE,
- POS Scatchard avec les anticorps MJ7 sur les cellules U937/CD105,
- POS marquage à l'Iode 125 d'un anticorps,
- POS utilisation du cytomètre en flux FACS.

Toutes ces POS sont issues de la mise à jour des procédures INSERM dans le cadre d'un transfert de technologies vers la jeune société innovante en biotechnologies ATLAB Pharma. Les POS sont en cours de validation par la responsable qualité d'ATLAB Pharma (M. Dorvillus).

¹⁴ Cette POS est présentée en Annexe 2.

1	2	3
 RADIO ANTIBODIES AGAINST CANCER 7 Rue A. Menard 44300 Nantes	Procédure Opérationnelle Standardisée :	POS 2011.008 Version 1 <hr/> Page : 1 / 8

1. OBJET

2. DOMAINE D'APPLICATION

3. DOCUMENTS DE REFERENCE

4. DEFINITION

Abréviations :

5. AUTORITE et RESPONSABILITES

6. LISTE DU MATERIEL, REACTIFS ET APPAREILLAGE NECESSAIRES

6.1. Matériel

6.2. Réactifs

6.3. Appareillage

7. MODE OPERATOIRE

4	5	6
<u>Rédigé par :</u> Date : Signature	<u>Vérifié par :</u> Date : Signature	<u>Approuvé par :</u> Date : Signature

Figure 20. Document type permettant la rédaction de POS. Le cadre supérieur indique le logo et l'adresse du laboratoire (1), le titre de la POS (2) ainsi que le nombre de pages, la version et la référence de la POS (3). Le cadre inférieur doit mentionner la date et signature du rédacteur (4), vérificateur (5) et approbateur (6). Les éventuelles annexes sont à figurer à la fin de la POS.

b. Le dossier de lot de l'AcM 8B6

Le dossier de lot est un document attestant de la conformité d'un produit et garantissant sa qualité et sa traçabilité. Le dossier de lot de l'AcM 8B6 que j'ai préparé est présenté en Annexe 3.

DISCUSSION

La stratégie de prise en charge du neuroblastome s'est modifiée au cours des dernières années afin d'améliorer le pronostic des formes de haut grade. La classification des neuroblastomes fait désormais appel à de nombreux paramètres, allant de la clinique à la biochimie en passant par la biologie moléculaire, afin de définir précisément le niveau de risque et ainsi adapter au mieux la thérapeutique. L'utilisation de stratégies agressives pour les neuroblastomes présentant les pronostics les plus défavorables et l'allègement des traitements pour les formes moins sévères ont rendu la prise en charge plus efficiente.

Malgré une entrée en rémission fréquente, les patients présentent souvent des rechutes liées à des cellules cancéreuses résiduelles peu réceptives aux traitements conventionnels. Ces rechutes sont d'autant plus problématiques que les tumeurs secondaires sont souvent chimiorésistantes ou radiorésistantes. Au cours d'essais cliniques, le recours aux anticorps thérapeutiques dirigés contre le ganglioside GD2 a permis une diminution significative de ces rechutes grâce à l'élimination de ces cellules résiduelles ^[6,7].

Bien que le recours à l'immunothérapie soit efficace, le ciblage du GD2 induit des effets toxiques liés à la fixation des AcM sur les fibres nerveuses périphériques ^[171]. L'utilisation d'anticorps non humains entraîne également une réponse de l'organisme susceptible de neutraliser les effets bénéfiques de l'immunothérapie ^[125,156]. Le ciblage de la sous-population gangliosidique GD2 O-acétylé et l'utilisation d'anticorps chimériques ou humanisés sont actuellement les voies de recherche privilégiées pour contourner les limites du traitement par anticorps anti-GD2. Plusieurs anticorps chimériques ou humanisés ont démontré lors d'essais cliniques une efficacité comparable à leurs homologues murins ^[7,125]. Ces anticorps ont également présenté une meilleure tolérance clinique, avec une immunisation faible voire nulle. L'anticorps 8B6 a prouvé *in vitro* une capacité à se fixer exclusivement sur les lignées cellulaires exprimant le GD2 O-acétylé sans reconnaître le GD2 ^[8].

L'immunothérapie repose sur l'efficacité du système immunitaire à induire une réponse antitumorale. La chimiothérapie et la radiothérapie portent souvent atteinte au système immunitaire et limitent ainsi l'efficacité des anticorps thérapeutiques. L'inclusion de cytokines dans les protocoles d'immunothérapie permet de stimuler le système immunitaire et ainsi améliorer les réponses cliniques ^[6,121]. Pour améliorer encore les pronostics, des anticorps ont été fusionnés avec des cytokines d'intérêts, notamment l'interleukine 2. Les protéines de fusion ainsi obtenues présentent des résultats préliminaires favorables, autorisant leur utilisation en clinique ^[114,123,125]. Sur le même modèle, des essais sont en cours avec des AcM couplés à des radioéléments afin de renforcer l'activité antitumorale tout en diminuant le risque d'irradiation des tissus sains ^[127,128].

Le mécanisme d'activité des AcM repose principalement sur deux mécanismes : l'ADCC, responsable de l'activité antitumorale et l'activation de la voie du complément (CDC), responsable d'une partie des effets secondaires (douleurs, allergie...). L'amélioration des AcM passe donc par une orientation de leurs mécanismes vers l'ADCC. La mutation décrite avec l'anticorps hu14.18K322A empêche la fixation du complément au niveau du fragment Fc et réduit ainsi le phénomène de CDC ^[112,115]. De plus, l'utilisation de lignées cellulaires évitant la fucosylation des AcM (notamment YB2/O) favorise l'activité ADCC ^[113]. Ainsi, l'extension de ces techniques à d'autres anticorps permettrait un renforcement de leurs activités tout en améliorant leur tolérance.

En 2012, l'American Cancer Society indiquait que 8 % de la mortalité par cancer aux États-Unis était imputable à des tumeurs exprimant le GD2. De plus, plusieurs cancers majeurs expriment le GD2 *O*-acétylé : mélanomes ^[86], sarcomes d'Ewing ^[87], carcinomes ovariens ^[177] et cancers pulmonaires à petites cellules ^[8]. Le développement d'anticorps dirigés contre le GD2 ou le GD2 *O*-acétylé pourrait donc représenter une avancée importante dans le pronostic de plusieurs pathologies malignes.

En dehors du ciblage du GD2, il est à noter que d'autres voies de recherche sont également explorées, afin de compléter ou remplacer les stratégies de prise en charge existantes. Par exemple, β -D-glucane a démontré un effet synergique avec les anticorps anti-

GD2 sur un modèle de souris atteint de neuroblastome ^[137]. Le ciblage de l'ornithine décarboxylase, enzyme clé dans les tumeurs exprimant N-myc, est également étudié ^[178]. Des résultats encourageants ont été obtenus *in vitro* avec l' α -difluoromethylornithine, un inhibiteur suicide, sur un modèle de neuroblastome humain. L'approche par virothérapie a été testée chez un nombre restreint de patients ^[179]. La stratégie consiste à injecter un poliovirus modifié capable de lyser spécifiquement les cellules cancéreuses. Bien qu'effectuée sur un nombre limité de patients, cette approche présente un potentiel intéressant. Enfin, l'immunothérapie active a démontré sur des modèles animaux la possibilité de créer à la fois une réponse antitumorale et une immunité durable face aux récurrences ^[139,140]. L'emploi de cette dernière méthode pourrait ainsi renforcer de manière significative le maintien en rémission.

CONCLUSION

Principale tumeur extra crânienne du jeune enfant, le neuroblastome constitue un enjeu majeur en oncologie pédiatrique ^[1]. La grande hétérogénéité de localisation, de symptômes et d'agressivité ont conduit à la mise en place de nombreuses classifications et méthodes de détection.

Les thérapies conventionnelles du neuroblastome (chimiothérapie, radiothérapie, chirurgie...) permettent souvent d'atteindre la rémission ^[7,61-67]. Cependant, les formes de haut grade conservent un pronostic défavorable. Une mortalité importante est imputable aux rechutes et aux maladies réfractaires ^[2]. Le ciblage du ganglioside GD2 par immunothérapie a démontré un bénéfice au cours des essais cliniques dans le traitement des maladies résiduelles ou réfractaires : la dernière étude de phase III utilisant l'AcM ch14.18 ^[7] présente une amélioration du temps de survie sans rechute à deux ans de l'ordre de 20 %. L'efficacité des anticorps est encore renforcée lors de l'utilisation concomitante de cytokines et l'emploi d'AcM hypofucosylés favorisant la voie ADCC ^[113]. La tolérance de ces traitements est quant à elle améliorée par l'emploi d'anticorps chimériques ou humanisés, diminuant l'activation de la voie du complément. Des mutations ponctuelles sur la partie Fc des anticorps permet également une moindre activation de la voie CDC.

Avec une cible originale, le GD2 *O*-acétylé, l'AcM 8B6 ouvre la voie à une nouvelle amélioration dans le traitement du neuroblastome. La grande spécificité du marqueur GD2 *O*-acétylé pourrait en effet réduire les effets toxiques liés à la fixation des anticorps sur les cellules saines porteuses du marqueur GD2. Les premiers essais concernant le 8B6 sont encourageants ^[8].

Le ciblage du marqueur gangliosidique GD2 à l'aide d'anticorps monoclonaux n'est pas encore utilisé dans les protocoles de traitement conventionnel du neuroblastome, mais le recours à cette immunothérapie pourrait contribuer à l'amélioration du pronostic de la maladie, notamment vis-à-vis des rechutes. L'amélioration des modèles d'anticorps anti-GD2

et le ciblage de la sous-population gangliosidique GD2 *O*-acétylé sont des éléments recélant un fort potentiel dans l'amélioration de la prise en charge du neuroblastome au cours des prochaines années. Par sa distribution homogène et majoritaire au niveau de plusieurs types de tissus tumoraux, le ganglioside GD2 et la sous-population gangliosidique GD2 *O*-acétylé constituent des voies de recherche et de développement majeures dans le domaine de l'oncologie pédiatrique.

BIBLIOGRAPHIE

1. Maris JM, Hogarty MD, Bagatell R et al. Neuroblastoma. *Lancet*. 2007 Jun 23;369(9579):2106-20. Review.
2. Matthay KK, Villablanca JG, Seeger RC et al. Treatment of high-risk neuroblastoma with intensive chemotherapy, radiotherapy, autologous bone marrow transplantation, and 13-cis-retinoic acid. Children's Cancer Group. *N Engl J Med*. 1999 Oct 14;341(16):1165-73.
3. Wu ZL, Schwartz E, Seeger R et al. Expression of GD2 ganglioside by untreated primary human neuroblastomas. *Cancer Res*. 1986 Jan;46(1):440-3.
4. Schulz G, Cheresch DA, Varki NM et al. Detection of ganglioside GD2 in tumor tissues and sera of neuroblastoma patients. *Cancer Res*. 1984 Dec;44(12 Pt 1):5914-20.
5. Cheung NK, Lazarus H, Miraldi FD et al. Ganglioside GD2 specific monoclonal antibody 3F8: a phase I study in patients with neuroblastoma and malignant melanoma. *J Clin Oncol*. 1987 Sep;5(9):1430-40.
6. Yu A, Gilman A, Ozkaynak F et al. COG ANBL0032. A Phase III trial of ch14.18 mAb plus IL2 plus GM-CSF for children with high risk neuroblastoma following ASCT. COG protocol, open. 2001 Dec.
7. Yu AL, Gilman AL, Ozkaynak MF et al. Children's Oncology Group. Anti-GD2 antibody with GM-CSF, interleukin-2, and isotretinoin for neuroblastoma. *N Engl J Med*. 2010 Sep 30;363(14):1324-34.
8. Alvarez-Rueda N, Desselle A, Cochonneau D et al. A monoclonal antibody to O-acetyl-GD2 ganglioside and not to GD2 shows potent anti-tumor activity without peripheral nervous system cross-reactivity. *PLoS One*. 2011;6(9):e25220.
9. Hoehner JC, Gestblom C, Hedborg F et al. A developmental model of neuroblastoma: differentiating stroma-poor tumors' progress along an extra-adrenal chromaffin lineage. *Lab Invest*. 1996 Nov;75(5):659-75.
10. Maris JM. Recent advances in neuroblastoma. *N Engl J Med*. 2010 Jun 10;362(23):2202-11. Review.
11. London WB, Castleberry RP, Matthay KK et al. Evidence for an age cutoff greater than 365 days for neuroblastoma risk group stratification in the Children's Oncology Group. *J Clin Oncol*. 2005 Sep 20;23(27):6459-65.
12. Cotran RS, Kumar V, Robbins SL: Robbins Pathologic Basis of Disease. 5th ed. Philadelphia, W.B. Saunders 1994.
13. Brodeur GM, Pritchard J, Berthold F et al. Revisions of the international criteria for neuroblastoma diagnosis, staging, and response to treatment. *J Clin Oncol*. 1993 Aug;11(8):1466-77. Review.
14. Ladenstein R, Pötschger U, Hartman O et al. (June 2008). "28 years of high-dose therapy and SCT for neuroblastoma in Europe: lessons from more than 4000 procedures". *Bone Marrow Transplant*. 41 Suppl 2: S118-27

15. Lacour B, Guyot-Goubin A, Guissou S et al. Incidence of childhood cancer in France: National Children Cancer Registries, 2000-2004. *Eur J Cancer Prev.* 2010 May;19(3):173-81.
16. Registre national des tumeurs de l'enfant [en ligne] mis à jour le 10 Mai 2010 [consulté le 30 aout 2012] <http://www.chu-nancy.fr/rntse/>
17. Agence nationale sanitaire et scientifique en cancérologie [en ligne] mis à jour le 9 Juin 2012 [consulté le 30 aout 2012] <http://www.e-cancer.fr>
18. Jemal A, Siegel R, Ward E et al. Cancer statistics, 2007. *CA Cancer J Clin* 2007 Jan–Feb;57(1):43–66.
19. Desandes E, Berger C, Tron I et al. Childhood cancer survival in France, 1990-1999. *Eur J Cancer.* 2008 Jan;44(2):205-15.
20. Brodeur GM, Seeger RC, Barrett A et al. International criteria for diagnosis, staging, and response to treatment in patients with neuroblastoma. *J Clin Oncol.* 1988 Dec;6(12):1874-81.
21. Shimada H, Ambros IM, Dehner LP et al. Terminology and morphologic criteria of neuroblastic tumors: recommendations by the International Neuroblastoma Pathology Committee. *Cancer.* 1999 Jul 15;86(2):349-63.
22. Shimada H, Umehara S, Monobe Y, et al. International neuroblastoma pathology classification for prognostic evaluation of patients with peripheral neuroblastic tumors: a report from the Children's Cancer Group. *Cancer* 92 (9): 2451-61, 2001.
23. Goto S, Umehara S, Gerbing RB, et al. Histopathology (International Neuroblastoma Pathology Classification) and MYCN status in patients with peripheral neuroblastic tumors: a report from the Children's Cancer Group. *Cancer* 92 (10): 2699-708, 2001.
24. Umehara S, Nakagawa A, Matthay KK et al. Histopathology defines prognostic subsets of ganglioneuroblastoma, nodular. *Cancer.* 2000 Sep 1;89(5):1150-61.
25. Peuchmaur M, d'Amore ES, Joshi VV et al. Revision of the International Neuroblastoma Pathology Classification: confirmation of favorable and unfavorable prognostic subsets in ganglioneuroblastoma, nodular. *Cancer.* 2003 Nov 15;98(10):2274-81.
26. Institut de cancérologie Gustave Roussy cancérologie [en ligne] mis à jour le 6 Juillet 2011 [consulté le 2 septembre 2012] <http://www.igr.fr>
27. Monclair T, Brodeur GM, Ambros PF et al. INRG Task Force. The International Neuroblastoma Risk Group (INRG) staging system: an INRG Task Force report. *J Clin Oncol.* 2009 Jan 10;27(2):298-303.
28. Cohn SL, Pearson AD, London WB et al. INRG Task Force. The International Neuroblastoma Risk Group (INRG) classification system: an INRG Task Force report. *J Clin Oncol.* 2009 Jan 10;27(2):289-97.
29. Vandesompele J, Baudis M, De Preter K et al. Unequivocal delineation of clinicogenetic subgroups and development of a new model for improved outcome prediction in neuroblastoma. *J Clin Oncol.* 2005 Apr 1;23(10):2280-99.

30. Mossé YP, Laudenslager M, Longo L, *et al.* (October 2008). Identification of ALK as a major familial neuroblastoma predisposition gene. *Nature* 455 (7215): 930–5. DOI:[10.1038/nature07261](https://doi.org/10.1038/nature07261).
31. George RE, Sanda T, Hanna M *et al.* Activating mutations in ALK provide a therapeutic target in neuroblastoma. *Nature*. 2008 Oct 16;455(7215):975-8.
32. Trochet D, O'Brien LM, Gozal D *et al.* PHOX2B genotype allows for prediction of tumor risk in congenital central hypoventilation syndrome. *Am J Hum Genet*. 2005 Mar;76(3):421-6.
33. Mosse YP, Laudenslager M, Khazi D *et al.* Germline PHOX2B mutation in hereditary neuroblastoma. *Am J Hum Genet*. 2004 Oct;75(4):727-30.
34. Trochet D, Bourdeaut F, Janoueix-Lerosey I *et al.* Germline mutations of the paired-like homeobox 2B (PHOX2B) gene in neuroblastoma. *Am J Hum Genet*. 2004 Apr;74(4):761-4.
35. Maris JM, Mosse YP, Bradfield JP *et al.* Chromosome 6p22 locus associated with clinically aggressive neuroblastoma. *N Engl J Med*. 2008 Jun 12;358(24):2585-93.
36. Capasso M, Devoto M, Hou C *et al.* Common variations in BARD1 influence susceptibility to high-risk neuroblastoma. *Nat Genet*. 2009 Jun;41(6):718-23.
37. Rubie H, Hartmann O, Michon J *et al.* N-Myc gene amplification is a major prognostic factor in localized neuroblastoma: results of the French NBL 90 study. Neuroblastoma Study Group of the Société Française d'Oncologie Pédiatrique. *J Clin Oncol*. 1997 Mar;15(3):1171-82.
38. Olshan AF, Smith JC, Bondy ML *et al.* Maternal vitamin use and reduced risk of neuroblastoma. *Epidemiology*. 2002 Sep;13(5):575-80.
39. Goh YI, Bollano E, Einarson TR *et al.* Prenatal multivitamin supplementation and rates of pediatric cancers: a meta-analysis. *Clin Pharmacol Ther*. 2007 May;81(5):685-91. Review.
40. Ahmad K. Folic acid in food prevents neuroblastoma. *Lancet Oncol*. 2003 Nov;4(11):649.
41. French AE, Grant R, Weitzman S *et al.* Folic acid food fortification is associated with a decline in neuroblastoma. *Clin Pharmacol Ther*. 2003 Sep;74(3):288-94.
42. Yang Q, Olshan AF, Bondy ML *et al.* Parental smoking and alcohol consumption and risk of neuroblastoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2000 Sep;9(9):967-72.
43. Corpus médical de la faculté de médecine de Grenoble[en ligne] mis à jour en Mai 2005 [consulté le 16 aout 2012] <http://www.sante.ujf-grenoble.fr>
44. Candito M, Billaud E, Chauffert M *et al.* [Biochemical diagnosis of pheochromocytoma and neuroblastomas]. *Ann Biol Clin (Paris)*. 2002 Jan-Feb;60(1):15-36. Review.
45. Programme d'enseignement sur le neuroblastome [en ligne] mis à jour en 1996 [consulté le 18 aout 2012] <http://www.med.univ-rennes1.fr>
46. Treuner J, Feine U, Niethammer D *et al.* Scintigraphic imaging of neuroblastome with [131-I] iodobenzylguanidine. *Lancet*. 1984 Feb 11;1(8372):333-4.

47. Smith FW, Gilday DL, Ash JM et al. Primary neuroblastoma uptake of 99mtechnetium methylene diphosphonate. *Radiology*. 1980 Nov;137(2):501-4.
48. Yeh SD, Larson SM, Burch L et al. Radioimmunodetection of neuroblastoma with iodine-131-3F8: correlation with biopsy, iodine-131-metaiodobenzylguanidine and standard diagnostic modalities. *J Nucl Med*. 1991 May;32(5):769-76.
49. Sawada T, Hirayama M, Nakata T et al. Mass screening for neuroblastoma in infants in Japan. Interim report of a mass screening study group. *Lancet*. 1984 Aug 4;2(8397):271-3.
50. Renaux P, Mathieu P, Chauvin F et al. [Neuroblastoma in the Rhone-Alpes area: epidemiologic data]. *Pediatric*. 1990;45(1):59-64.
51. Schilling FH, Erttmann R, Dohrmann S et al. [Early neuroblastoma detection in Germany. On the status of the Hamburg-Stuttgart cooperative pilot study]. *Klin Padiatr*. 1992 Jul-Aug;204(4):282-7.
52. Woods WG, Lemieux B, Leclerc JM et al. Screening for neuroblastoma (NB) in North America: the Quebec Project. *Prog Clin Biol Res*. 1994;385:377-82.
53. Woods WG, Gao RN, Shuster JJ et al. Screening of infants and mortality due to neuroblastoma. *N Engl J Med*. 2002 Apr 4;346(14):1041-6.
54. Esiashvili N, Goodman M, Ward K et al. Neuroblastoma in adults: Incidence and survival analysis based on SEER data. *Pediatr Blood Cancer*. 2007 Jul;49(1):41-6.
55. Hemmi H, Yamada K, Yoon UH et al. Coexpression of the myc gene family members in human neuroblastoma cell lines. *Biochem Mol Biol Int*. 1995 Aug;36(6):1135-41.
56. Moss TJ, Reynolds CP, Sather HN et al. Prognostic value of immunocytologic detection of bone marrow metastases in neuroblastoma. *N Engl J Med*. 1991 Jan 24;324(4):219-26.
57. Seeger RC, Reynolds CP, Gallego R et al. Quantitative tumor cell content of bone marrow and blood as a predictor of outcome in stage IV neuroblastoma: a Children's Cancer Group Study. *J Clin Oncol*. 2000 Dec 15;18(24):4067-76.
58. Hölzel M, Huang S, Koster J et al. NF1 is a tumor suppressor in neuroblastoma that determines retinoic acid response and disease outcome. *Cell*. 2010 Jul 23;142(2):218-29.
59. Kushner BH, Kramer K, LaQuaglia MP et al. Curability of recurrent disseminated disease after surgery alone for local-regional neuroblastoma using intensive chemotherapy and anti-G(D2) immunotherapy. *J Pediatr Hematol Oncol*. 2003 Jul;25(7):515-9.
60. Kushner BH, Wolden S, LaQuaglia MP et al. Hyperfractionated low-dose radiotherapy for high-risk neuroblastoma after intensive chemotherapy and surgery. *J Clin Oncol*. 2001 Jun 1;19(11):2821-8.
61. Kushner BH, LaQuaglia MP, Bonilla MA et al. Highly effective induction therapy for stage 4 neuroblastoma in children over 1 year of age. *J Clin Oncol*. 1994 Dec;12(12):2607-13.
62. Pearson AD, Pinkerton CR, Lewis IJ et al. European Neuroblastoma Study Group; Children's Cancer and Leukaemia Group (CCLG formerly United Kingdom Children's Cancer Study Group). High-dose

rapid and standard induction chemotherapy for patients aged over 1 year with stage 4 neuroblastoma: a randomised trial. *Lancet Oncol.* 2008 Mar;9(3):247-56.

63. Cheung NV, Heller G. Chemotherapy dose intensity correlates strongly with response, median survival, and median progression-free survival in metastatic neuroblastoma. *J Clin Oncol.* 1991 Jun;9(6):1050-8. Review.
64. Längler A, Christaras A, Abshagen K et al. Topotecan in the treatment of refractory neuroblastoma and other malignant tumors in childhood - a phase-II-study. *Klin Padiatr.* 2002 Jul-Aug;214(4):153-6.
65. Garaventa A, Luksch R, Biasotti S et al. A phase II study of topotecan with vincristine and doxorubicin in children with recurrent/refractory neuroblastoma. *Cancer.* 2003 Dec 1;98(11):2488-94.
66. Sidell N. Retinoic acid-induced growth inhibition and morphologic differentiation of human neuroblastoma cells in vitro. *J Natl Cancer Inst.* 1982 Apr;68(4):589-96.
67. Thiele CJ, Reynolds CP, Israel MA. Decreased expression of N-myc precedes retinoic acid-induced morphological differentiation of human neuroblastoma. *Nature.* 1985 Jan 31-Feb 6;313(6001):404-6.
68. Berthold F, Boos J, Burdach S et al. Myeloablative megatherapy with autologous stem-cell rescue versus oral maintenance chemotherapy as consolidation treatment in patients with high-risk neuroblastoma : a randomized controlled trial. *Lancet Oncol.* 2005 Sep;6(9):649-58.
69. Pritchard J, Cotterill SJ, Germond SM et al. High dose melphalan in the treatment of advanced neuroblastoma: results of a randomised trial (ENSG-1) by the European Neuroblastoma Study Group. *Pediatr Blood Cancer.* 2005 Apr;44(4):348-57.
70. Fish JD, Grupp SA. Stem cell transplantation for neuroblastoma. *Bone Marrow Transplant.* 2008 Jan;41(2):159-65. Review.
71. George RE, Li S, Medeiros-Nancarrow C et al. High-risk neuroblastoma treated with tandem autologous peripheral-blood stem cell-supported transplantation: long-term survival update. *J Clin Oncol.* 2006 Jun 20;24(18):2891-6.
72. Deacon JM, Wilson PA, Peckham MJ. The radiobiology of human neuroblastoma. *Radiother Oncol.* 1985 Apr;3(3):201-9.
73. Barker E, Mueller BM, Handgretinger R et al. Effect of a chimeric anti-ganglioside GD2 antibody on cell-mediated lysis of human neuroblastoma cells. *Cancer Res.* 1991 Jan 1;51(1):144-9.
74. Prise en charge et accompagnement d'un enfant cancéreux à tous les stades de la maladie[en ligne] mis à jour en 2008 [consulté le 22 aout 2012] <http://www.medecine.ups-tlse.fr/dcem3/module10/>
75. Les Soins Palliatifs au 21ème siècle Face aux situations difficiles, Comment évoluer ou réinventer[en ligne] mis à jour le 7 juin 2003 [consulté le 22 aout 2012] <http://www.sfap.org/pdf/VI-D2a-pdf.pdf>
76. LEPRIEUR TRUET Stéphanie. *Production et évaluation chez l'animal d'anticorps thérapeutiques anti ganglioside GD2.* Thèse de pharmacie, Nantes, 2007, 83p.
77. Svennerholm L. The gangliosides. *J Lipid Res.* 1964 Apr;5:145-55. Review.

78. Chester MA. IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature (JCBN). Nomenclature of glycolipids--recommendations 1997. *Eur J Biochem.* 1998 Oct 15;257(2):293-8.
79. Schwarzmann G, Sandhoff K. Metabolism and intracellular transport of glycosphingolipids. *Biochemistry.* 1990 Dec 11;29(49):10865-71. Review.
80. Van Echten G, Sandhoff K. Ganglioside metabolism. Enzymology, Topology, and regulation. *J Biol Chem.* 1993 Mar 15;268(8):5341-4. Review.
81. Sasaki A, Hata K, Suzuki S et al. Overexpression of plasma membrane-associated sialidase attenuates insulin signaling in transgenic mice. *J Biol Chem.* 2003 Jul 25;278(30):27896-902.
82. Ledeen RW, Yu RK. Gangliosides: structure, isolation, and analysis. *Methods Enzymol.* 1982;83:139-91. Review.
83. Svennerholm L, Boström K, Fredman P et al. Gangliosides and allied glycosphingolipids in human peripheral nerve and spinal cord. *Biochim Biophys Acta.* 1994 Sep 15;1214(2):115-23.
84. Cahan LD, Irie RF, Singh R et al. Identification of a human neuroectodermal tumor antigen (OFA-I-2) as ganglioside GD2. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1982 Dec;79(24):7629-33.
85. Kramer K, Gerald WL, Kushner BH et al. Disialoganglioside G(D2) loss following monoclonal antibody therapy is rare in neuroblastoma. *Clin Cancer Res.* 1998 Sep;4(9):2135-9.
86. Sjöberg ER, Manzi AE, Khoo KH et al. Structural and immunological characterization of O-acetylated GD2. Evidence that GD2 is an acceptor for ganglioside O-acetyltransferase in human melanoma cells. *J Biol Chem.* 1992 Aug 15;267(23):16200-11.
87. Lipinski M, Braham K, Philip I et al. Neuroectoderm-associated antigens on Ewing's sarcoma cell lines. *Cancer Res.* 1987 Jan 1;47(1):183-7.
88. Ladisch S, Wu ZL. Detection of a tumour-associated ganglioside in plasma of patients with neuroblastoma. *Lancet.* 1985 Jan 19;1(8421):136-8.
89. Ye JN, Cheung NK. A novel O-acetylated ganglioside detected by anti-GD2 monoclonal antibodies. *Int J Cancer.* 1992 Jan 21;50(2):197-201.
90. Crocker PR, Kelm S, Dubois C et al. Purification and properties of sialoadhesin, a sialic acid-binding receptor of murine tissue macrophages. *EMBO J.* 1991 Jul;10(7):1661-9.
91. Mirkin BL, Clark SH, Zhang C. Inhibition of human neuroblastoma cell proliferation and EGF receptor phosphorylation by gangliosides GM1, GM3, GD1A and GT1B. *Cell Prolif.* 2002 Apr;35(2):105-15.
92. Muramatsu T. Essential roles of carbohydrate signals in development, immune response and tissue functions, as revealed by gene targeting. *J Biochem.* 2000 Feb;127(2):171-6. Review.
93. Takamiya K, Yamamoto A, Furukawa K et al. Mice with disrupted GM2/GD2 synthase gene lack complex gangliosides but exhibit only subtle defects in their nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996 Oct 1;93(20):10662-7.

94. Ohmi Y, Ohkawa Y, Yamauchi Y et al. Essential roles of gangliosides in the formation and maintenance of membrane microdomains in brain tissues. *Neurochem Res.* 2012 Jun;37(6):1185-91. Apr 10. Review.
95. Aixinjueluo W, Furukawa K, Zhang Q et al. Mechanisms for the apoptosis of small cell lung cancer cells induced by anti-GD2 monoclonal antibodies: roles of anoikis. *J Biol Chem.* 2005 Aug 19;280(33):29828-36.
96. Portoukalian J, Zwingelstein G, Doré JF et al. Studies of a ganglioside fraction extracted from human malignant melanoma. *Biochimie.* 1976;58(10):1285-7.
97. Livingston PO, Ritter G, Calves MJ. Antibody response after immunization with the gangliosides GM1, GM2, GM3, GD2 and GD3 in the mouse. *Cancer Immunol Immunother.* 1989 ;29(3):179-84.
98. Livingston PO, Ritter G, Srivastava P et al. Characterization of IgG and IgM antibodies induced in melanoma patients by immunization with purified GM2 ganglioside. *Cancer Res.* Dec 15 1989 ;49(24 Pt 1):7045-50.
99. Köhler G, Hengartner H, Shulman MJ. Immunoglobulin production by lymphocyte hybridomas. *Eur J Immunol.* 1978 Feb;8(2):82-8.
100. Mecchanism of Chorismate Mutase Activity –V [en ligne] mis à jour le 28 Mars 2012 [consulté le 11 aout 2012] <http://www.chemistry.umeche.maine.edu>
101. Saito M, Yu RK, Cheung NK. Ganglioside GD2 specificity of monoclonal antibodies to human neuroblastoma cell. *Biochem Biophys Res Commun.* 1985 Feb 28;127(1):1-7.
102. Mujoo K, Kipps TJ, Yang HM et al. Functional properties and effect on growth suppression of human neuroblastoma tumors by isotype switch variants of monoclonal antiganglioside GD2 antibody 14.18. *Cancer Res.* 1989 Jun 1;49(11):2857-61.
103. Mueller BM, Romerdahl CA, Gillies SD et al. Enhancement of antibody-dependent cytotoxicity with a chimeric anti-GD2 antibody. *J Immunol.* 1990 Feb 15;144(4):1382-6.
104. Metelitsa LS, Gillies SD, Super M et al. Antidisialoganglioside/granulocyte macrophage-colony-stimulating factor fusion protein facilitates neutrophil antibody-dependent cellular cytotoxicity and depends on FcγRII (CD32) and Mac-1 (CD11b/CD18) for enhanced effector cell adhesion and azurophil granule exocytosis. *Blood.* 2002 Jun 1;99(11):4166-73.
105. Cheung NK, Walter EI, Smith-Mensah WH et al. Decay-accelerating factor protects human tumor cells from complement-mediated cytotoxicity in vitro. *J Clin Invest.* 1988 Apr;81(4):1122-8.
106. Kushner BH, Cheung NK. GM-CSF enhances 3F8 monoclonal antibody-dependent cellular cytotoxicity against human melanoma and neuroblastoma. *Blood.* 1989 May 15;73(7):1936-41.
107. Cheung NK, Saarinen UM, Neely JE et al. Monoclonal antibodies to a glycolipid antigen on human neuroblastoma cells. *Cancer Res.* 1985 Jun;45(6):2642-9.

108. Mujoo K, Cheresch DA, Yang HM et al. Disialoganglioside GD2 on human neuroblastoma cells: target antigen for monoclonal antibody-mediated cytotoxicity and suppression of tumor growth. *Cancer Res.* 1987 Feb 15;47(4):1098-104.
109. Murray JL, Cunningham JE, Brewer H et al. Phase I trial of murine monoclonal antibody 14G2a administered by prolonged intravenous infusion in patients with neuroectodermal tumors. *J Clin Oncol.* 1994 Jan;12(1):184-93.
110. Zeng Y, Fest S, Kunert R et al. Anti-neuroblastoma effect of ch14.18 antibody produced in CHO cells is mediated by NK-cells in mice. *Mol Immunol.* 2005 Jul;42(11):1311-9.
111. Yang RK, Sondel PM. Anti-GD2 Strategy in the Treatment of Neuroblastoma. *Drugs Future.* 2010;35(8):665.
112. Sorkin LS, Otto M, Baldwin WM 3rd, Vail E, Gillies SD, Handgretinger R, Barfield RC, Ming Yu H, Yu AL. Anti-GD(2) with an FC point mutation reduces complement fixation and decreases antibody-induced allodynia. *Pain.* 2010 Apr;149(1):135-42.
113. Ito A, Ishida T, Yano H et al. Defucosylated anti-CCR4 monoclonal antibody exercises potent ADCC-mediated antitumor effect in the novel tumor-bearing humanized NOD/Shi-scid, IL-2Rgamma(null) mouse model. *Cancer Immunol Immunother.* 2009 Aug;58(8):1195-206.
114. Osenga KL, Hank JA, Albertini MR et al. Children's Oncology Group. A phase I clinical trial of the hu14.18-IL2 (EMD 273063) as a treatment for children with refractory or recurrent neuroblastoma and melanoma: a study of the Children's Oncology Group. *Clin Cancer Res.* 2006 Mar 15;12(6):1750-9.
115. Navid F, Barfield RC, Handgretinger R et al. A novel anti-GD2 monoclonal antibody (mAb), hu14.18K322A, in children with refractory or recurrent neuroblastoma: Early-phase evaluation. *J Clin Oncol* 29: 2011
116. Cassano WF, Zaytoun AM. Specific killing of neuroblastoma cells in vitro by immunotoxins. *Prog Clin Biol Res.* 1990;333:217-23.
117. Gottstein C, Schön G, Tawadros S et al. Antidisialoganglioside ricin A-chain immunotoxins show potent antitumor effects in vitro and in a disseminated human neuroblastoma severe combined immunodeficiency mouse model. *Cancer Res.* 1994 Dec 1;54(23):6186-93.
118. Mujoo K, Reisfeld RA, Cheung L et al. A potent and specific immunotoxin for tumor cells expressing disialoganglioside GD2. *Cancer Immunol Immunother.* 1991;34(3):198-204.
119. Hank JA, Robinson RR, Surfus J et al. Augmentation of antibody dependent cell mediated cytotoxicity following in vivo therapy with recombinant interleukin 2. *Cancer Res.* 1990 Sep 1;50(17):5234-9.
120. Sondel PM, Hank JA. Antibody-directed, effector cell-mediated tumor destruction. *Hematol Oncol Clin North Am.* 2001 Aug;15(4):703-21. Review.
121. Becker JC, Pancook JD, Gillies SD et al. Eradication of human hepatic and pulmonary melanoma metastases in SCID mice by antibody-interleukin 2 fusion proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996 Apr 2;93(7):2702-7.

122. Hank JA, Surfus JE, Gan J et al. Activation of human effector cells by a tumor reactive recombinant anti-ganglioside GD2 interleukin-2 fusion protein (ch14.18-IL2). *Clin Cancer Res.* 1996 Dec;2(12):1951-9.
123. Hank JA, Gan J, Ryu H et al. Immunogenicity of the hu14.18-IL2 immunocytokine molecule in adults with melanoma and children with neuroblastoma. *Clin Cancer Res.* 2009 Sep 15;15(18):5923-30.
124. Ribas A, Kirkwood JM, Atkins MB et al. Morse MA. Phase I/II open-label study of the biologic effects of the interleukin-2 immunocytokine EMD 273063 (hu14.18-IL2) in patients with metastatic malignant melanoma. *J Transl Med.* 2009 Jul 29;7:68.
125. Shusterman S, London WB, Gillies SD et al. Antitumor activity of hu14.18-IL2 in patients with relapsed/refractory neuroblastoma: a Children's Oncology Group (COG) phase II study. *J Clin Oncol.* 2010 Nov 20;28(33):4969-75.
126. *APEIRON Biologics* [en ligne] mis à jour le 22 aout 2012 [consulté le 9 septembre 2012] <http://www.apeiron-biologics.com/>
127. Modak S, Cheung NK. Antibody-based targeted radiation to pediatric tumors. *J Nucl Med.* 2005 Jan;46 Suppl 1:157S-63S. Review.
128. Cheung NK, Kushner BH, LaQuaglia M et al. N7: a novel multi-modality therapy of high risk neuroblastoma (NB) in children diagnosed over 1 year of age. *Med Pediatr Oncol.* 2001 Jan;36(1):227-30.
129. Mulé JJ, Yang JC, Afreniere RL et al. Identification of cellular mechanisms operational in vivo during the regression of established pulmonary metastases by the systemic administration of high-dose recombinant interleukin 2. *J Immunol.* 1987 Jul 1;139(1):285-94.
130. Trinchieri G. Proinflammatory and immunoregulatory functions of interleukin-12. *Int Rev Immunol.* 1998;16(3-4):365-96.
131. Siapati KE, Barker S, Kinnon C et al. Improved antitumour immunity in murine neuroblastoma using a combination of IL-2 and IL 12. *Br J Cancer.* 2003 May 19;88(10):1641-8.
132. Redlinger RE Jr, Shimizu T, Remy T et al. Cellular mechanisms of interleukin-12-mediated neuroblastoma regression. *J Pediatr Surg.* 2003 Feb;38(2):199-204.
133. Motzer RJ, Rakhit A, Thompson JA et al. Randomized multicenter phase II trial of subcutaneous recombinant human interleukin-12 versus interferon-alpha 2a for patients with advanced renal cell carcinoma. *J Interferon Cytokine Res.* 2001 Apr;21(4):257-63.
134. Czop JK, Austen KF. Properties of glycans that activate the human alternative complement pathway and interact with the human monocyte beta-glucan receptor. *J Immunol.* 1985 Nov;135(5):3388-93.
135. Di Renzo L, Yefenof E, Klein E. The function of human NK cells is enhanced by beta-glucan, a ligand of CR3 (CD11b/CD18). *Eur J Immunol.* 1991 Jul;21(7):1755-8.

136. Vetvicka V, Thornton BP, Ross GD. Soluble beta-glucan polysaccharide binding to the lectin site of neutrophil or natural killer cell complement receptor type 3 (CD11b/CD18) generates a primed state of the receptor capable of mediating cytotoxicity of iC3b-opsonized target cells. *J Clin Invest.* 1996 Jul 1;98(1):50-61.
137. Cheung NK, Modak S. Oral (1-->3),(1-->4)-beta-D-glucan synergizes with antiganglioside GD2 monoclonal antibody 3F8 in the therapy of neuroblastoma. *Clin Cancer Res.* 2002 May;8(5):1217-23.
138. Shurin GV, Shurin MR, Bykovskaia S et al. Neuroblastoma-derived gangliosides inhibit dendritic cell generation and function. *Cancer Res.* 2001 Jan 1;61(1):363-9.
139. Fest S, Huebener N, Weixler S et al. Characterization of GD2 peptide mimotope DNA vaccines effective against spontaneous neuroblastoma metastases. *Cancer Res.* 2006 Nov 1;66(21):10567-75.
140. Huebener N, Fest S, Strandsby A, et al. A rationally designed tyrosine hydroxylase DNA vaccine induces specific antineuroblastoma immunity. *Mol Cancer Ther.* 2008 Jul;7(7):2241-51.
141. Coughlin CM, Vance BA, Grupp SA et al. RNA-transfected CD40-activated B cells induce functional T-cell responses against viral and tumor antigen targets: implications for pediatric immunotherapy. *Blood.* 2004 Mar 15;103(6):2046-54.
142. Rossig C, Brenner MK. Genetic modification of T lymphocytes for adoptive immunotherapy. *Mol Ther.* 2004 Jul;10(1):5-18. Review.
143. Rossig C, Bollard CM, Nuchtern JG et al. Targeting of G(D2)-positive tumor cells by human T lymphocytes engineered to express chimeric T-cell receptor genes. *Int J Cancer.* 2001 Oct 15;94(2):228-36.
144. Ramos CA, Dotti G. Chimeric antigen receptor (CAR)-engineered lymphocytes for cancer therapy. *Expert Opin Biol Ther.* 2011 Jul;11(7):855-73. Epub 2011 Apr 4. Review.
145. Park JR, Digiusto DL, Slovak M et al. Adoptive transfer of chimeric antigen receptor re-directed cytolytic T lymphocyte clones in patients with neuroblastoma. *Mol Ther.* 2007 Apr;15(4):825-33.
146. Aaronson NK, Ahmedzai S, Bergman B et al. The European Organization for Research and Treatment of Cancer QLQ-C30: a quality-of-life instrument for use in international clinical trials in oncology. *J Natl Cancer Inst.* 1993 Mar 3;85(5):365-76.
147. Therasse et al. New guideline to evaluate the response to treatment in solid tumors. *Journal of the National Cancer Institute.* Vol 92, No. 3, February 2, 2000.
148. Eisenhauer EA, Therasse P, Bogaerts J et al. New response evaluation criteria in solid tumours: revised RECIST guideline (version 1.1). *Eur J Cancer.* 2009 Jan;45(2):228-47.
149. Cheung NK, Kushner BH, Yeh SD et al. 3F8 monoclonal antibody treatment of patients with stage 4 neuroblastoma: a phase II study. *Int J Oncol.* 1998 Jun;12(6):1299-306.
150. Cheung NK, Kushner BH, Cheung IY et al. Anti-G(D2) antibody treatment of minimal residual stage 4 neuroblastoma diagnosed at more than 1 year of age. *J Clin Oncol.* 1998 Sep;16(9):3053-60.

151. Kushner BH, Kramer K, Cheung NK. Phase II trial of the anti-G(D2) monoclonal antibody 3F8 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor for neuroblastoma. *J Clin Oncol.* 2001 Nov 15;19(22):4189-94.
152. Kushner BH, Kramer K, Modak S et al. Successful multifold dose escalation of anti-GD2 monoclonal antibody 3F8 in patients with neuroblastoma: a phase I study. *J Clin Oncol.* 2011 Mar 20;29(9):1168-74.
153. Cheung IY, Lo Piccolo MS, Kushner BH et al. Early molecular response of marrow disease to biologic therapy is highly prognostic in neuroblastoma. *J Clin Oncol.* 2003 Oct 15;21(20):3853-8.
154. Handgretinger R, Baader P, Dopfer R et al. A phase I study of neuroblastoma with the anti-ganglioside GD2 antibody 14G2a. *Cancer Immunol Immunother.* 1992;35(3):199-204.
155. Frost JD, Hank JA, Reaman GH et al. A phase I/IB trial of murine monoclonal anti-GD2 antibody 14G2a plus interleukin-2 in children with refractory neuroblastoma: a report of the Children's Cancer Group. *Cancer.* 1997 Jul 15;80(2):317-33.
156. Sondel PM, Hank JA. Combination therapy with interleukin-2 and antitumor monoclonal antibodies. *Cancer J Sci Am.* 1997 Dec;3 Suppl 1:S121-7. Review.
157. Handgretinger R, Anderson K, Lang P et al. A phase I study of human/mouse chimeric antiganglioside GD2 antibody ch14.18 in patients with neuroblastoma. *Eur J Cancer.* 1995;31A(2):261-7.
158. Uttenreuther-Fischer MM, Huang CS, Yu AL. Pharmacokinetics of human-mouse chimeric anti-GD2 mAb ch14.18 in a phase I trial in neuroblastoma patients. *Cancer Immunol Immunother.* 1995 Dec;41(6):331-8.
159. Yu AL, Uttenreuther-Fischer MM, Huang CS et al. Phase I trial of a human-mouse chimeric anti-disialoganglioside monoclonal antibody ch14.18 in patients with refractory neuroblastoma and osteosarcoma. *J Clin Oncol.* 1998 Jun;16(6):2169-80.
160. Ozkaynak MF, Sondel PM, Krailo MD et al. Phase I study of chimeric human/murine anti-ganglioside G(D2) monoclonal antibody (ch14.18) with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in children with neuroblastoma immediately after hematopoietic stem-cell transplantation: a Children's Cancer Group Study. *J Clin Oncol.* 2000 Dec 15;18(24):4077-85.
161. Simon T, Hero B, Faldum A et al. Consolidation treatment with chimeric anti-GD2-antibody ch14.18 in children older than 1 year with metastatic neuroblastoma. *J Clin Oncol.* 2004 Sep 1;22(17):3549-57.
162. Simon T, Hero B, Faldum A et al. Infants with stage 4 neuroblastoma: the impact of the chimeric anti-GD2-antibody ch14.18 consolidation therapy. *Klin Padiatr.* 2005 May-Jun;217(3):147-52.
163. Gilman AL, Ozkaynak MF, Matthay KK et al. Phase I study of ch14.18 with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukin-2 in children with neuroblastoma after autologous bone marrow transplantation or stem-cell rescue: a report from the Children's Oncology Group. *J Clin Oncol.* 2009 Jan 1;27(1):85-91.

164. International Society of Paediatric Oncology European Neuroblastoma Research Network [en ligne] mis à jour le 4 septembre 2012 [consulté le 8 septembre 2012] <https://www.siopen-r-net.org/>
165. Otto M, Barfield RC, Martin WJ et al. Combination immunotherapy with clinical-scale enriched human gammadelta T cells, hu14.18 antibody, and the immunocytokine Fc-IL7 in disseminated neuroblastoma. *Clin Cancer Res*. 2005 Dec 1;11(23):8486-91.
166. King DM, Albertini MR, Schalch H et al. Phase I clinical trial of the immunocytokine EMD 273063 in melanoma patients. *J Clin Oncol*. 2004 Nov 15;22(22):4463-73.
167. Ritter G, Cohen LS, Williams C Jr et al. Serological analysis of human anti-human antibody responses in colon cancer patients treated with repeated doses of humanized monoclonal antibody A33. *Cancer Res*. 2001 Sep 15;61(18):6851-9.
168. Cheung NK, Cheung IY, Canete A et al. Antibody response to murine anti-GD2 monoclonal antibodies: correlation with patient survival. *Cancer Res*. 1994 Apr 15;54(8):2228-33.
169. Cheung NK, Guo HF, Heller G et al. Induction of Ab3 and Ab3' antibody was associated with long-term survival after anti-G(D2) antibody therapy of stage 4 neuroblastoma. *Clin Cancer Res*. 2000 Jul;6(7):2653-60.
170. Honsik CJ, Jung G, Reisfeld RA. Lymphokine-activated killer cells targeted by monoclonal antibodies to the disialogangliosides GD2 and GD3 specifically lyse human tumor cells of neuroectodermal origin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1986 Oct;83(20):7893-7.
171. Yuki N, Yamada M, Tagawa Y et al. Pathogenesis of the neurotoxicity caused by anti-GD2 antibody therapy. *J Neurol Sci*. 1997 Aug;149(2):127-30.
172. Yankelevich M, Kondadasula SV, Thakur A et al. Anti-CD3 x anti-GD2 bispecific antibody redirects T-cell cytolytic activity to neuroblastoma targets. *Pediatr Blood Cancer*. 2012 Jun 15. doi: 10.1002/pbc.24237.
173. Cerato E, Birkle S, Portoukalian J et al. Variable region gene segments of nine monoclonal antibodies specific to disialogangliosides (GD2, GD3) and their O-acetylated derivatives. *Hybridoma*. 1997 Aug;16(4):307-16.
174. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970 Aug 15;227(5259):680-5.
175. Denizot F, Lang R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J Immunol Methods*. 1986 May 22;89(2):271-7.
176. Yoshida S, Fukumoto S, Kawaguchi H et al. Ganglioside G(D2) in small cell lung cancer cell lines: enhancement of cell proliferation and mediation of apoptosis. *Cancer Res*. 2001 May 15;61(10):4244-52.
177. Ravindranath MH, Muthugounder S, Presser N et al. Immunogenic gangliosides in human ovarian carcinoma. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007 Feb 9;353(2):251-8. Erratum in: *Biochem Biophys Res Commun*. 2008 Dec 26;377(4):1331.

178. Rounbehler RJ, Li W, Hall MA et *al.* Targeting ornithine decarboxylase impairs development of MYCN-amplified neuroblastoma. *Cancer Res.* 2009 Jan 15;69(2):547-53.
179. Ramírez M, García-Castro J, Alemany R. Oncolytic virotherapy for neuroblastoma. *Discov Med.* 2010 Nov;10(54):387-93. Review.

ANNEXES

ANNEXE 1: Classification IDRf

ANNEXE 2 : POS ELISA sur cellules IMR32

ANNEXE 3 : Dossier de lot de l'AcM 8B6

ANNEXE 1: Classification IDRF

Ipsilateral tumor extension within two body compartments Neck-chest, chest-abdomen, abdomen-pelvis	
Neck	Tumor encasing carotid and/or vertebral artery and/or internal jugular vein Tumor extending to base of skull Tumor compressing the trachea
Cervico-thoracic junction	Tumor encasing brachial plexus roots Tumor encasing subclavian vessels and/or vertebral and/or carotid artery Tumor compressing the trachea
Thorax	Tumor encasing the aorta and/or major branches Tumor compressing the trachea and/or principal bronchi Lower mediastinal tumor, infiltrating the costo-vertebral junction between T9 and T12
Thoraco-abdominal Abdomen/pelvis	Tumor encasing the aorta and/or vena cava Tumor infiltrating the porta hepatis and/or the hepatoduodenal ligament Tumor encasing branches of the superior mesenteric artery at the mesenteric root Tumor encasing the origin of the coeliac axis, and/or of the superior mesenteric artery Tumor invading one or both renal pedicles Tumor encasing the aorta and/or vena cava Tumor encasing the iliac vessels Pelvic tumor crossing the sciatic notch
Intraspinal tumor extension whatever the location provided that:	More than one third of the spinal canal in the axial plane is invaded and/or the perimedullary leptomenigeal spaces are not visible and/or the spinal cord signal is abnormal
Infiltration of adjacent organs/structures	Pericardium, diaphragm, kidney, liver, duodeno-pancreatic block, and Mesentery
Conditions to be recorded, but <i>not</i> considered IDRFs	Multifocal primary tumors Pleural effusion, with or without malignant cells Ascites, with or without malignant cells

ANNEXE 2 : POS ELISA sur cellules IMR32

 <p>7 Rue A. Menard 44300 Nantes</p>	<p>Procédure Opérationnelle Standardisée : ELISA indirect sur cellules dessiquées IMR32 pour dosage de surnageant de culture cellulaire</p>	<p>POS 2011.008 Version 1</p> <hr/> <p>Page : 110 / 8</p>
---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----------------------------------------------------------------------

1. OBJET

Cette procédure opérationnelle standardisée décrit la réalisation du test enzymatique qui permet de doser les anticorps anti-GD2 ou anti-OAcGD2 présents dans le surnageant de culture des cellules productrices (hybridomes, CHO transfectées).

2. DOMAINE D'APPLICATION

Cette procédure s'applique à toutes les étapes employant la méthode ELISA indirecte dans les conditions définies dans « 1. Objet ». Cela inclue également les phases de préparation des milieux/réactifs ainsi que la phase d'élimination des déchets.

3. DOCUMENTS DE REFERENCE

- POS 2011.007 ou 005 : Coating des plaques ELISA avec cellules dessiquées
- Bonnes pratiques de laboratoires (BPL)

4. DEFINITION

Enzymatic Linked ImmunoSorbent Assay (= ELISA) : test immunoenzymatique permettant la détection d'anticorps primaires, fixés sur un antigène immobilisé, par ajout d'anticorps secondaires conjugués à une enzyme de type peroxydase.

Abréviations :

Ac: Anticorps
BSA: Bovine serum albumine
CHO: Chinese hamster ovary
PBS: Phosphate buffered saline
POS: Procédure opérationnelle standardisée
PSM: Poste de sécurité microbiologique
QSP: Quantité suffisante pour
SN 1, 2, 3: Surnageant 1, 2, 3
STD: Standard

<p><u>Rédigé par</u> Nicolas Gautier Date : 3/05/2012 Signature</p>	<p><u>Vérfié par :</u> Date : Signature</p>	<p><u>Approuvé par :</u> Date : Signature</p>
---------------------------------------------------------------------------------	----------------------------------------------------------	------------------------------------------------------------

 <p>7 Rue A. Menard 44300 Nantes</p>	<p>Procédure Opérationnelle Standardisée : ELISA indirect sur cellules dessiquées IMR32 pour dosage de surnageant de culture cellulaire - 110-</p>	<p>POS 2011.008 Version 1</p> <hr/> <p>Page : 2 / 8</p>
---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-------------------------------------------------------------

5. AUTORITE et RESPONSABILITES

5.1. Autorité

Le responsable du laboratoire détient l'autorité nécessaire pour établir, examiner, et mettre à jour cette procédure.

5.2. Responsabilités

5.2.1. Rédaction :

La rédaction et la mise à jour régulière de la POS peut être effectuée par n'importe quel membre du personnel de laboratoire habilité à réaliser les manipulations décrites dans la procédure concernée.

5.2.2. Vérification

La vérification de cette POS est réalisée par le chef de projet.

5.2.3. Validation

Le chef de projet est responsable de la validation de la procédure.

5.2.4. Lecture et application

Il est de la responsabilité de tout le personnel du laboratoire habilité de lire et d'appliquer cette POS lors des opérations en lien avec elle.

<p><u>Rédigé par</u> Nicolas Gautier Date : 3/05/2012 Signature</p>	<p><u>Vérfié par :</u> Date : Signature - 111 -</p>	<p><u>Approuvé par :</u> Date : Signature</p>
---------------------------------------------------------------------------------	------------------------------------------------------------------	------------------------------------------------------------

 <p>7 Rue A. Menard 44300 Nantes</p>	<p>Procédure Opérationnelle Standardisée : ELISA indirect sur cellules desséchées IMR32 pour dosage de surnageant de culture cellulaire</p>	<p>POS 2011.008 Version 1</p> <hr/> <p>Page : 3 / 8</p>
---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-------------------------------------------------------------

6. LISTE DU MATERIEL, REACTIFS ET APPAREILLAGE NECESSAIRES

6.1. Matériel

- Pipettes sérologiques stériles (5ml, 10ml, 25 ml)
- Micropipettes (2-20 µl, 20-200 µl, 100-1000 µl)
- Micropipettes multicanaux
- Pointes de précision (200 µl et 1000 µl)
- Tubes fond coniques 15 ml et 50 ml
- Tubes Eppendorf de 1,5 ml
- Plaque 96 puits à fond plat tapissée avec des cellules IMR32 desséchées (POS 2011.005)
- Film adhésif « seal plate » (Réf. 760201, Lot : 5001294, Exp 01/2013)

6.2. Réactifs

- Solution de PBS 10X
- Albumine de sérum bovin (Sigma, Réf. A2153, lot 010M1506 ou équivalent)
- Ac primaires de référence : c8B6 lot DC 23112011 à 0.82 mg/mL
- Echantillons à doser (Surnageant de culture)
- Ac secondaires Goat anti-Human IgG (H+L) conjugués à la HRP (Southern biotech, Réf. 2040 05, lot 2407 NF09)
- Gélule phosphate-citrate avec perborate de sodium (Sigma, Réf. P4922)
- Comprimé de substrat coloré : ABTS (Roche Applied Science, Réf. 11112422001)

6.3. Appareillage

- PSM de Classe 2
- Centrifugeuse Eppendorf 5417R située au 4^{ème} étage de l'IRT-UN en pièce 429
- Balance de précision Mettler A5150 située au 4^{ème} étage de l'IRT-UN en pièce 432
- Pipeteur électrique
- Vortex

<p><u>Rédigé par</u> Nicolas Gautier Date : 3/05/2012 Signature</p>	<p><u>Vérfié par :</u> Date : Signature</p>	<p><u>Approuvé par :</u> Date : Signature</p>
---------------------------------------------------------------------------------	----------------------------------------------------------	------------------------------------------------------------

 ATLAB PHARMA <small>RADIO*ANTIBODIES AGAINST CANCER</small> 7 Rue A. Menard 44300 Nantes	Procédure Opérationnelle Standardisée : ELISA indirect sur cellules desséchées IMR32 pour dosage de surnageant de culture cellulaire	POS 2011.008 Version 1
		Page : 4 / 8

7. MODE OPERATOIRE

L'ensemble des étapes décrites dans ce mode opératoire doit être réalisé en condition aseptique (sous PSM, port de gants...). L'ensemble des déchets biologiques doit être éliminé dans les sanicontainers jaunes de 50 litres.

7.1. Préparation des solutions

Toutes les solutions ainsi préparées doivent être identifiées, datées et paraphées.

7.1.1. Préparation de 1 litre de PBS 1X (QSP 3 plaques ELISA)

- Dilution au 1/10^e de PBS 10X : Prélever 100 mL de PBS 10X, les transférer dans une bouteille d'un litre et compléter à 1 litre avec de l'eau distillée et déminéralisée.

7.1.2. Préparation de 50 ml de PBS-BSA 1% (QSP 1 plaque)

- A l'aide d'une spatule et d'une nacelle de pesée jetable, peser 0,5 g de BSA. Transférer ces 0,5 g dans un tube à fond conique de 50 mL et ajouter 50 mL de PBS 1X. Agiter doucement jusqu'à totale dissolution.

7.1.3. Préparation de 50 ml de PBS-BSA 0,1% (QSP 2 plaques)

- Dilution au 1/10^e de PBS-BSA 1% : Dans un tube à fond conique de 50 mL, transférer 5 ml de PBS-BSA 1% et compléter à 50 mL avec de l'eau distillée et déminéralisée.

7.1.4. Préparation de 10 ml de solution d'anticorps secondaires au 1/1000^e (QSP 1 plaque)

- Dans un tube à fond conique de 15 mL, diluer 10 µL de la solution mère d'anticorps secondaires goat anti-human IgG conjugués à la peroxydase (GAH-HRP) dans 10 mL de PBS-BSA 0,1%.
- Dans un flacon de 100 mL, dissoudre une gélule de phosphate-citrate avec perborate de sodium dans 100 mL d'eau distillée et déminéralisée.
- Dans un tube à fond conique de 50 mL, dissoudre un comprimé d'ABTS dans 50 mL de la solution de phosphate-citrate avec perborate de sodium. Cette solution doit être conservée à +4°C à l'abri de la lumière.

<u>Rédigé par</u> Nicolas Gautier Date : 3/05/2012 Signature	<u>Vérfié par :</u> Date : Signature	<u>Approuvé par :</u> Date : Signature
-----------------------------------------------------------------------	------------------------------------------------	--------------------------------------------------

 <p>7 Rue A. Menard 44300 Nantes</p>	<p>Procédure Opérationnelle Standardisée : ELISA indirect sur cellules desséchées IMR32 pour dosage de surnageant de culture cellulaire</p>	<p>POS 2011.008 Version 1</p> <hr/> <p>Page : 5 / 8</p>
---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-------------------------------------------------------------

7.1.5. Préparation de la solution d'anticorps de référence (QSP 1 Plaque)

- Calculer le volume V_p de la solution mère (Anticorps de référence c8B6 à une concentration initiale $C_i = 0.82 \text{ mg/mL}$) à prélever pour préparer 0.5 mL (volume final, V_f) d'une solution de concentration finale $C_f = 10 \text{ } \mu\text{g/mL}$ (= 0.01mg/mL).

$$C_i \times V_p = C_f \times V_f$$

$$0,82 \times V_p = 0.5 \times 0.01$$

$$V_p = (0.5 \times 0.01) / 0,82 = 0.0061 \text{ ml soit } \underline{6,1 \text{ } \mu\text{L}}.$$

- Dans un tube Eppendorf de 1,5 mL, déposer 494 μL de PBS-BSA 0,1% et ajouter 6,1 μL de la solution mère d'anticorps de référence c8B6. Bien homogénéiser au vortex.

7.1.6. Préparation des échantillons

- En salle de culture cellulaire, prélever en conditions stériles sous PSM, 1 mL de surnageant du ou des surnageant à doser avec une pipette de 2 mL et les transférer dans un tube Eppendorf (changer de pipette à chaque échantillon).
- Centrifuger le ou les surnageant durant 10 minutes à 3000g. Récolter chaque surnageant clarifié et le transférer dans un tube Eppendorf. Si besoin est, les surnageants peuvent être conservés quelques jours à +4°C avant utilisation.

7.2. Saturation de la plaque ELISA

Cette opération est effectuée afin de s'affranchir des interactions aspécifiques, ce qui réduit le bruit de fond.

- Avant de commencer l'expérimentation, s'assurer que tous les puits des plaques sont parfaitement tapissés de cellules.
- Laver chaque plaque ELISA par ajout de 200 μL de PBS 1X par puits et la vider par renversement. Répéter cette opération 2 fois.
- Déposer 200 μl de PBS-BSA 1% par puits, sceller la plaque avec un film adhésif et laisser incubé une heure à température ambiante sous agitation douce.

<p><u>Rédigé par</u> Nicolas Gautier Date : 3/05/2012 Signature</p>	<p><u>Vérifié par :</u> Date : Signature</p>	<p><u>Approuvé par :</u> Date : Signature</p>
---------------------------------------------------------------------------------	-----------------------------------------------------------	------------------------------------------------------------

 <p>7 Rue A. Menard 44300 Nantes</p>	<p>Procédure Opérationnelle Standardisée : ELISA indirect sur cellules desséchées IMR32 pour dosage de surnageant de culture cellulaire</p>	<p>POS 2011.008 Version 1</p> <hr/> <p>Page : 6/ 8</p>
---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	------------------------------------------------------------

7.3. Dépôt des échantillons

- NB :** Bien homogénéiser au vortex la solution d'anticorps de référence et les surnageant à doser avant de les déposer sur la plaque.
- Vider la plaque par renversement.
 - Laver la plaque par ajout de 200 µl de PBS 1X par puits et la vider par renversement. Répéter cette opération 2 fois.
 - Pour déposer la solution d'anticorps primaires c8B6 de référence ainsi que les échantillons, se référer à l'annexe 1.
 - Sur la première colonne de la plaque :
Déposer en duplicate (ligne 1 et 2) 200 µL de la dilution d'anticorps primaires de référence à 10 µg/mL (=STD sur le schéma de plaque). Déposer ensuite en duplicate (ligne 3 et 4) 200 µL de surnageant pur (= SN sur le schéma de plaque). Procéder de la même manière pour les autres échantillons.
 - Déposer 100 µL de PBS-BSA 0,1% dans tous les autres puits de la plaque.
 - A l'aide d'une micropipette multicanaux, réaliser des dilutions en cascade au 1/2, en prélevant 100 µL des puits de la colonne 1 et en déposant ces 100 µL dans la colonne 2. Bien homogénéiser par va-et-vient avec la micropipette. Ensuite, prélever 100 µL des puits de la colonne 2 et les déposer dans la colonne 3. Bien homogénéiser avec la micropipette. Procéder de la même façon jusqu'à la colonne 11. La dernière colonne (12) ne contient que du PBS-BSA 0,1 %. Après homogénéisation dans la colonne 11, prélever 100 µL dans les puits et les éliminer. Il ne doit rester qu'un volume de 100 µL dans l'ensemble de tous les puits de la plaque ELISA.
 - Couvrir la plaque et laisser incubé 2 heures à température ambiante sous agitation douce.
 - Après incubation, vider la plaque par renversement et effectuer 3 lavages par ajout de 200 µL de PBS 1X par puits et renversement.

<p><u>Rédigé par</u> Nicolas Gautier Date : 3/05/2012 Signature</p>	<p><u>Vérifié par :</u> Date : Signature</p>	<p><u>Approuvé par :</u> Date : Signature</p>
---------------------------------------------------------------------------------	-----------------------------------------------------------	------------------------------------------------------------

 <p>7 Rue A. Menard 44300 Nantes</p>	<p>Procédure Opérationnelle Standardisée : ELISA indirect sur cellules desséchées IMR32 pour dosage de surnageant de culture cellulaire</p>	<p>POS 2011.008 Version 1</p> <hr/> <p>Page : 7 / 8</p>
---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-------------------------------------------------------------

7.4. Révélation

- Déposer 100 µL de solution d'anticorps secondaires GAH-HRP par puits. Couvrir la plaque puis laisser incuber une heure à température ambiante sous agitation douce.
- Vider la plaque par renversement et effectuer 3 lavages par ajout de 200 µL de PBS 1X par puits et renversement.
- Déposer 100 µL de solution d'ABTS par puits et incuber à température ambiante à l'abri de la lumière en recouvrant la plaque de papier aluminium. Lire l'absorbance au lecteur ELISA à 405 nm dès qu'une coloration verte apparaît. Si besoin, arrêter la réaction par ajout de 100 µL de SDS 20% par puits.

7.5. Lecture Absorbance

- Allumer le lecteur ELISA pour le connecter à l'ordinateur (bouton ON/OFF situé à l'arrière de l'appareil).
- Allumer l'ordinateur et cliquer sur l'icône « Assent Software of Multiscan ».
- Dans l'onglet procédure
 - >> Sélectionner la fenêtre général >> Réglage des paramètres (plage de lecture de la plaque / Sample ou Standard)
 - >> Sélectionner « Shake 1 »
 - >> Sélectionner la fenêtre « Measure 1 » et régler le filtre à 405 nm
- Placer la plaque (attention au sens d'insertion) et cliquer sur START.
- Transfert des tableaux de résultats sur fichiers excel et copie sur clé USB (Nom de fichier : Année Mois Jour_SN_Nom du clone 2011 03 14_SN_10C6).
- Ne pas oublier d'éteindre le lecteur de plaques après utilisation.

<p><u>Rédigé par</u> Nicolas Gautier Date : 3/05/2012 Signature</p>	<p><u>Vérfié par :</u> Date : Signature</p>	<p><u>Approuvé par :</u> Date : Signature</p>
---------------------------------------------------------------------------------	----------------------------------------------------------	------------------------------------------------------------

ANNEXE 1 : Schéma de dépôt sur la plaque ELISA

Numéro de colonne	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Témoin	STD pur	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
	STD pur	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Echantillon 1	SN1 pur	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
	SN1 pur	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Echantillon 2	SN2 pur	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
	SN2 pur	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Echantillon 3	SN3 pur	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
	SN3 pur	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*

* = PBS-BSA 0,1%

STD = standard, SN = surnageant.

Rédigé par
Nicolas Gautier
Date : 3/05/2012
Signature

Vérfié par :

Date :
Signature

Approuvé par :

Date :
Signature

ANNEXE 3 : Dossier de lot de l'AcM 8B6

Fabrication de :Anticorps monoclonal de souris (IgG₃, κ) anti GD2 OAcétylé : 8B6**Opérateurs de fabrication :****Nicolas Gautier**
INSERM_U892**Stéphane Birklé**IRT-UN_ 8 quai Moncousu
B.P. 70721
44007 NANTES Cedex 1**Code opérateur : SB / NG****Date de purification du lot :**

13/04/2011

Date d'expiration du lot :

12/04/2012

Référence : 8B6XXX

Fiche produit

Nom du Produit : 8B6, Anticorps monoclonal de souris spécifique du OAcGD2(IgG₃, κ)

Référence : 8B6XXX

Lot N° (C.110322 – P.110415 – F.110418)

Etat physique : En solution

Volume : 30 ml

Concentration : 2,33 mg/ml

Quantité d'anticorps purifié : 73,8mg

Tampon de conservation : Phosphate Buffered Saline 1X – Chlorure de sodium 0,2M (PBS / NaCl - 1X / 0,2M)

Agent stabilisateur : Aucun

Conservateur : Aucun

Filtration Stérilisante : Oui

Conditions de stockage : Conservation à + 4°C

Date de production : 13/04/2011

Date d'expiration : 12/04/2012

Pureté : conformité vérifiée par SDS-PAGE et HPLC

Spécificité : conformité vérifiée par ELISA indirect et par cytométrie en flux

Pays d'origine : FRANCE

Remarque : Produit à des fins de recherche uniquement. Ne convient pas pour une utilisation diagnostique ou thérapeutique.

FABRICATION DU LOT

Matière première	Fournisseur
Surnageant de culture de l'hybridome 8B6	INSERM_U892 IRT-UN_ 8 quai Moncoustu B.P. 70721 44007 NANTES Cedex 1

Equipement	Fournisseurs
Incubateur Jouan EG110R (salle de culture 408b_ 4 ^{ème} étage)	Jouan

Date décongélation et mise en culture : le 22 mars 2011

Type cellulaire : hybridome de souris issus de la fusion de splénocytes de souris immunisées avec la lignée de myélome SP2O

Milieu de culture : RPMI 1640

Fournisseur : GIBCO

Référence : 31870-025

Lot : 904084

Date expiration : 03/2013

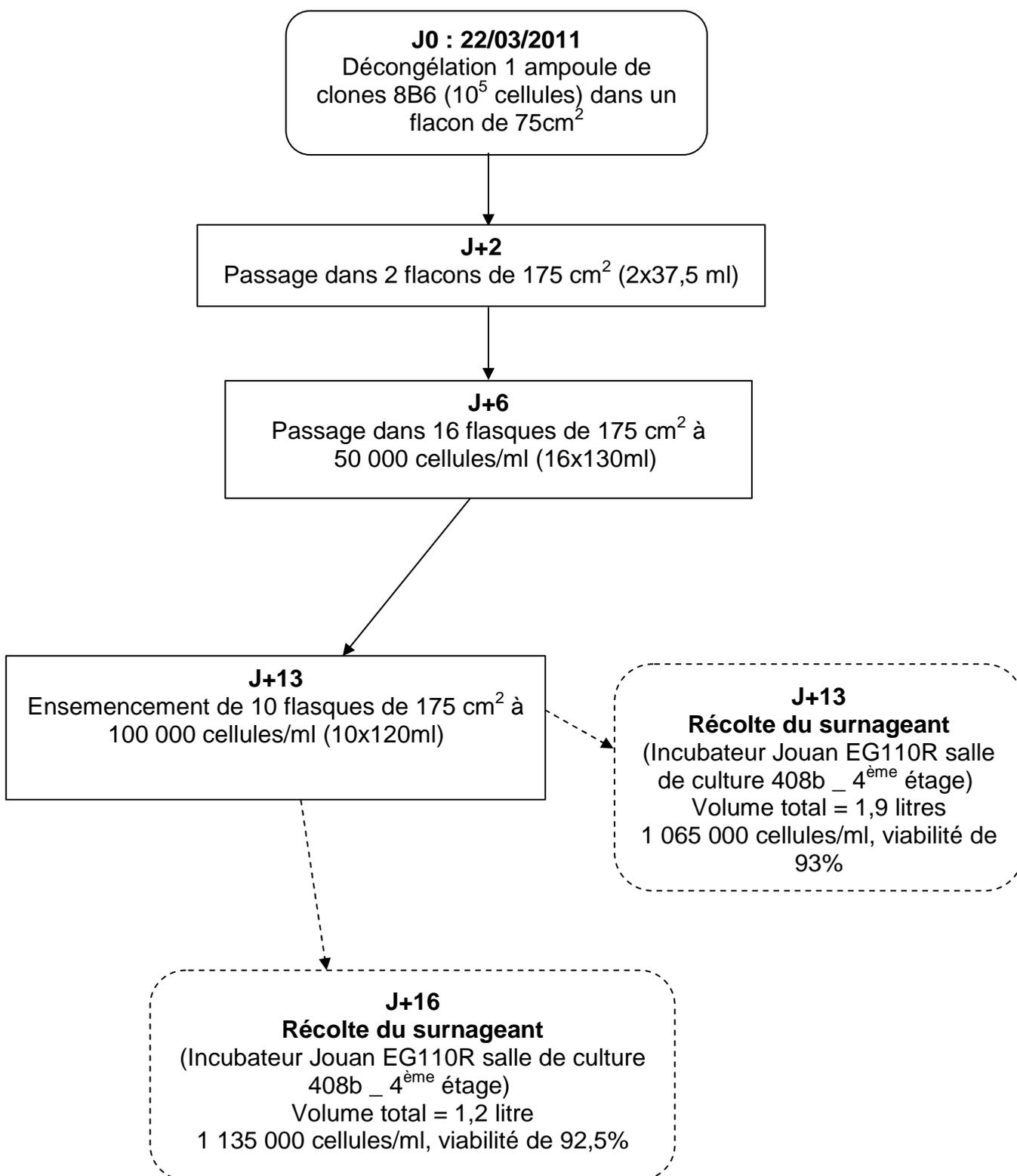
Supplément :

10% d.SVF (Sérum de Veau Fœtal) (Gibco / Réf. 10270-106 / Lot : 41Q7091K / Date expiration : 01/2014)

Pénicilline (10UI/mL) Streptomycine (10µg/mL) : (Gibco / Réf. 15140-122 / Lot 730832/Date expiration : 01/2011)

20 mM L-Glutamine (Gibco / Réf. 25030-024 / Lot : 670372 / Date expiration : 02/2011)

Conditions de culture : Incubation à 37°C sous atmosphère contenant 5% d e CO₂

FlowChart Production : Production à partir du clone 8B6

PURIFICATION

Equipement	Fournisseurs
PSM de classe II (salle de culture 4 ^{ème} étage : Modèle MSC 9 JOUAN Modèle BH-EN-2003-S	Thermo Fisher Scientific 61105 Rockford - Etats-Unis FASTER Via Merendi, 22 20010 Cornaredo (MI) - Italy
Pompe péristaltique Protéine A Ref : 61 0F9 553	Gilson 19 avenue des entrepreneurs BP 45, 95400 Villier le bel, France
Tubulure pour pompe péristaltique Réf : F117946	Gilson 19 avenue des entrepreneurs BP 45, 95400 Villier le bel, France

Matériels	Fournisseurs
Purification : Colonne HiTrap™ Protein A HP Volume de colonne : 5 mL Réf. : 17-0403-01 Lot : 10042508 Date d'expiration : novembre 2012	GE Healthcare Bio-Science AB SE-751 84 Uppsala – Suède
Dialyse : Cassette de dialyse, capacité 12 -30 mL Slide A Lyser® Dialyse cassette 10 000 MWCO Référence : 66830 Lot : JJ126786 5 Date d'expiration : 31/07/2008	Thermo Fisher Scientific 61105 Rockford - Etats-Unis
Filtration stérilisante : Filtre Millex®GV 0,22 µm PVDF Référence : SLGV033RB Lot : R8JN01490	Millipore 290 Concord Road, Billerica - Etats-Unis

Date d'expiration : Juillet 2011

Conditionnement du surnageant : le 15 Avril 2011

Clarification par centrifugation 10 minutes à 3000 rpm

Filtration sur Stéricup 0,45 µm (Millipore / référence SCHVUOIRE/ Lot MP006824SA). Exp 05 / 2013

Conservation à 4°C jusqu'à purification.

Date de purification : le 13 Avril 2011

Type de purification : Chromatographie liquide d'affinité sur protéine A avec élution isocratique

Tampon de charge : PBS 1X

Tampon préparé par INSERM (Laverie RDC Bâtiment IRT-UN)

Débit : 2 ml/min

Charge de 3 x 2500 ml de surnageant de culture

Tampon d'élution : Glycine 0,1 M pH 2.6

Préparé avec 7,5 g Glycine QSP 800 ml H₂O (Eau purifiée à partir de MilliQ integral5*, N°série : F8NN13161D)

pH ajusté avec HCl (37%, Lot : 09A300525, Réf : 20252.290, Exp 01/2014)

Volume ajusté à 1 litre avec H₂O

Profil chromatographique après protéine A _ Size exclusion chromatography (SEC) sur colonne Superdex GL 10/300

Profil chromatographique en size exclusion chromatography (SEC) sur colonne Superdex GL 10/300

Date de Dialyse contre PBS 1X (5 litres) : le 15 Avril 2011

Date de Filtration Stérilisante (0,22 µm) : le 18 Avril 2011

CONDITIONNEMENT

Type de conditionnement :	Tube Falcon* en polypropylène à fond conique de 50ml Becton Dickinson Labware, Franklin lakes, NJ, USA Ref : 0420705 Lot : 0339899
Volume de produit purifié hors conditionnement :	0 ml

ETIQUETTE DU PRODUIT FINI**Nom** : Anticorps monoclonal de souris spécifique du OAcGD2 (IgG₃, κ)**Composition** :Anticorps 8B6 (IgG₁, κ) anti-OAcGD2
Solution tampon de phosphate salin 1X, pH 7,4 (PBS)**Date de fabrication** : 13 Avril 2011**Date d'expiration** : 12 Avril 2012**Référence** : 8B6**Lot N°** : (C.110322 – P.110415 – F.110418)**Fabricant** :**INSERM U892**

IRT-UN_ 8 quai Moncousu

B.P. 70721

44007 NANTES Cedex 1

Opérateurs : Stéphane Birklé / Nicolas Gautier

FICHE DE CONTROLE DU PRODUIT FINI

CONTROLE	OPERATIONS	RESULTATS
Pureté	SDS-PAGE avec coloration au bleu de Coomassie	CONFORME
Pureté	HPLC (injection de 20 µg)	CONFORME
Spécificité	ELISA sur plaque avec cellules IMR32 dessiquées	
Fixation de l'Anticorps sur son Antigène	FACS (10 µg/ml)	
Conclusion		

Fiche de refus du lot (si non conforme)

Commentaire et Justificatif de non-conformité :

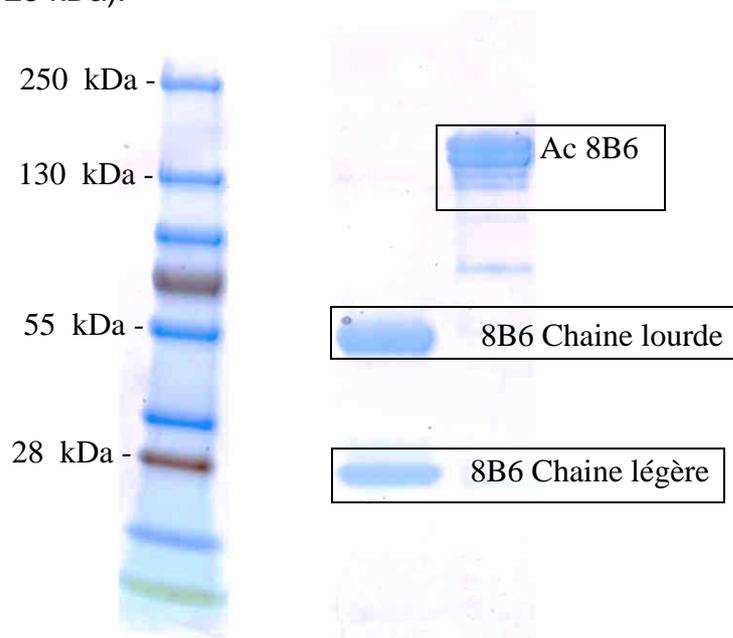
Devenir du lot :

Plan Correctif (si existant) :

CONTROLE DU LOT**PURETE :**

1. Vérification de la pureté de l'échantillon par SDS-page le 02/02/2011. Coloration au bleu de Coomassie.

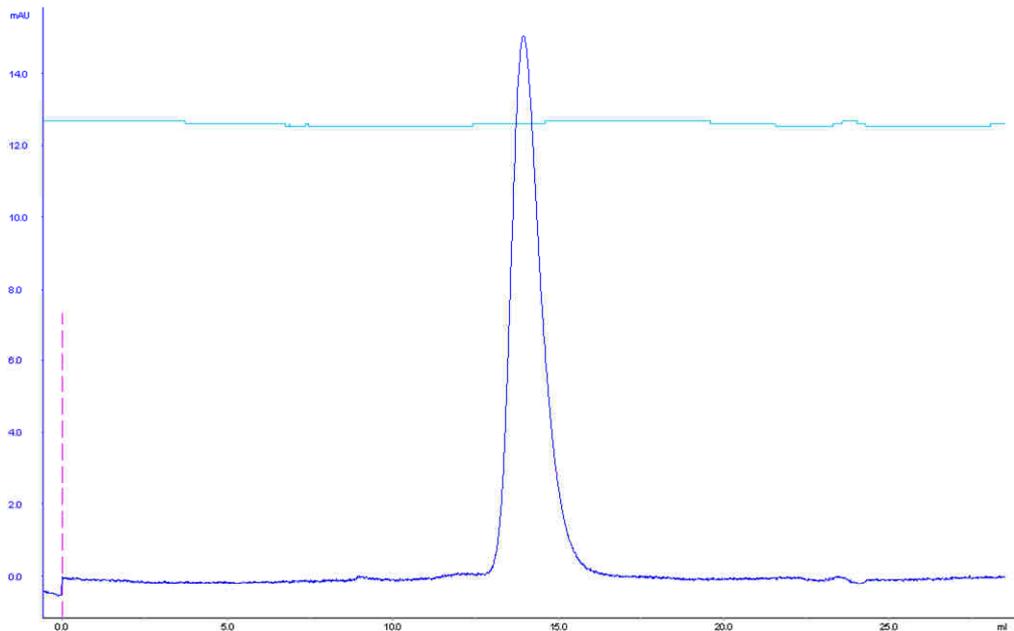
Gel gradient à 4% - 15% de polyacrylamide en conditions non réductrices : 1 bande à environ 150 kDa (IgG) et en conditions réductrices : 1 bande à environ 50 kDa et 1 bande à environ 25 kDa (2 chaînes lourdes à 50 kDa et 2 chaînes légères à 25 kDa).



Dépôt de 6 μ g d'Ac

Marqueur Page Ruler* Plus, Fermentas Bio-Rad (Dépôt de 10 μ l)

Vérification de la qualité de la purification par chromatographie liquide haute performance (HPLC) sur colonne Superdex 200 GL 10/300



SPECIFICITE :

1. Vérification de la spécificité de l'anticorps par ELISA indirect sur cellules **X** (OAcGD2+)

(Courbe de titration de l'anticorps purifié)

2. Vérification de la spécificité de l'anticorps par FACS sur cellules **X** (GD2+)
02/2011 : FACSCalibur**X** (Becton dickinson)

DEVENIR DU LOT

Utilisation en recherche uniquement

1. EXPERIMENTATION *IN VIVO*

Rédigé par : Nicolas Gautier
Date : 6 Mai 2011

Nom – Prénom : Gautier Nicolas

Titre de la thèse :

Le marqueur gangliosidique tumoral GD2 : intérêt pour le ciblage du neuroblastome

Résumé de la thèse

Le neuroblastome est une tumeur neuroectodermique touchant en premier lieu le jeune enfant. Cette pathologie se caractérise par une grande hétérogénéité : les formes les moins sévères régressent spontanément alors que les neuroblastomes de haut grade ont un pronostic très défavorable.

Une prise en charge agressive pouvant inclure chirurgie, chimiothérapie, radiothérapie et greffe de cellules souches hématopoïétiques permet d'atteindre un état de rémission. Néanmoins, les rechutes sont fréquentes et les nouvelles tumeurs sont souvent réfractaires aux traitements.

Le GD2 est un disialoganglioside présent à la surface des neuroblastomes. Sa faible distribution au niveau des tissus sains et son expression homogène au niveau des tumeurs en fait une cible thérapeutique de choix. Grâce à leur grande spécificité, les anticorps monoclonaux anti-GD2 ont été sélectionnés pour des essais cliniques chez des patients atteints de neuroblastome. Actuellement, un de ces anticorps, le ch14.18, a atteint la phase III en objectivant une amélioration de la survie des patients.

Une des principales limites de ces anticorps réside dans leur capacité à se fixer au niveau des fibres nerveuses périphériques, exprimant faiblement le GD2, induisant alors des douleurs nécessitant parfois l'utilisation d'analgésiques opiacés.

Le 8B6 est un anticorps monoclonal qui cible uniquement le GD2 O-acétylé, un dérivé structural du GD2 qui n'est pas exprimé par les tissus sains. L'investigation clinique de cet anticorps pourrait donc améliorer de manière significative le pronostic de la maladie au cours des prochaines années.

MOTS CLÉS

NEUROBLASTOME, DISIALOGANGLIOSIDE GD2, ANTICORPS THÉRAPEUTIQUES

Président : Mr. Alain PINEAU, Professeur de Toxicologie, Doyen de la faculté de pharmacie de Nantes

Membres du jury : Mr. Stéphane BIRKLE, Maître de conférence d'Immunologie -Nantes
Mme Estelle THEBAUD, Médecin du service d'hématologie et oncologie pédiatrique du CHU Nantes
