



THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par *l'Université Toulouse III - Paul Sabatier*
Discipline ou spécialité : *Immunologie*

Présentée et soutenue par *Nicolas Dauguet*
Le 20 septembre 2010

Titre : *Rôle immunomodulateur du lenalidomide sur les cellules Natural Killer humaines. Etude des effecteurs lymphoïdes cytotoxiques chez les patients atteints de leucémies aiguës myéloïdes en 1ère rémission complète.*

JURY

Pr Eric Delabesse Président
Dr Anne Caignard, Rapporteur
Pr Bruno Quesnel, Rapporteur
Dr Nathalie Rouas-Freiss, Examineur
Pr Rémy Poupot, Directeur de thèse
Dr Mary Poupot, Co-Directeur de thèse
Pr Christian Recher, invité

Ecole doctorale : *Biologie-Santé-Biotechnologies*
Unité de recherche : *Centre de Physiopathologie Toulouse Purpan, Inserm U563*
Directeur(s) de Thèse : *Rémy Poupot, Co-Directeur : Mary Poupot*
Rapporteurs : *Dr Anne Caignard, Pr Bruno Quesnel*

**Donner c'est recevoir...
essaye un peu pour voir !**

Remerciements :

Dans un premier temps je remercie les membres du jury qui ont accepté de juger ma thèse. Ainsi, je remercie le président de ce jury, le Pr Eric Delabesse. Je remercie également le Dr Anne Caignard et le Pr Bruno Quesnel d'avoir accepté d'être les rapporteurs de mon manuscrit de thèse. Vous avez eu la lourde tâche de lire mon manuscrit pendant l'été ! Je vous remercie également d'avoir participé au jury de ma soutenance. Je remercie le Dr Nathalie Rouas-Freiss qui avait également accepté d'être rapporteur de mon manuscrit mais qui n'a pas été retenue par l'école doctorale, ainsi je vous remercie vivement de bien avoir voulu participer au jury de ma soutenance. Je remercie très chaleureusement une première fois le Dr Christian Récher pour avoir accepté de participer au jury de ma soutenance.

Je remercie le Dr Jean-Jacques Fournié, le directeur de cette grande équipe « Innate Immunity , Malignant Hemopathies & Cancer Therapies » rebaptisée « Therapeutic Immunotargeting of B-cell Tumours » pour le CRCT de m'avoir accueilli au sein de son équipe. Je remercie mes directeurs de thèse Rémy et Mary Poupot pour m'avoir également accueilli au sein de cette équipe et pour les conseils prodigués pendant ces années.

Je remercie très chaleureusement une seconde fois le Docteur Christian Récher, pour avoir initié les projets LAM-Revlimid® et ainsi de m'avoir permis de rencontrer le service hématologie de l'hôpital Purpan. Merci aux infirmières du service pour votre bonne humeur et toute votre sympathie à chaque fois que je venais récupérer les prélèvements sanguins. J'aurai parfois aimé être prévenu un peu plus tôt que 17h car débiter un Ficoll à cette heure c'est inévitablement le signe d'une longue soirée au labo ! Mais à force de passer dans le service, j'ai pu me rendre compte du lourd travail que vous effectuez, c'est toujours l'effervescence et je vous souhaite bien du courage dans ce service difficile. Je remercie les patients de m'avoir donné leur sang.

Je remercie l'EFS et tous les donneurs sains pour toutes les poches de sang utilisées. Va falloir quand même un jour que vous appreniez à ne pas mettre les buffy coat au frigo !!! Je remercie l'entreprise Celgene pour avoir donné son approbation, faute d'avoir répondu, pour mon projet sur le Revlimid.

Je remercie Ludo (maintenant Dr Ludovic Martinet), pour m'avoir coaché sur pas mal de choses au début de ma thèse, notamment pour m'avoir fait découvrir et aimer les IMIT du 4^{ème} étage même si je n'ai pas perduré dans cette voie, de m'avoir fait partagé ta passion de l'immunologie qui est également la mienne et pour m'avoir mis sur les rails du projet LAM-Revlimid®. Garde ton enthousiasme communicatif.

Je remercie le Dr Claire Racaud Sultan de l'équipe Bernard Payrastre avec qui j'ai toujours eu plaisir à discuter, bien qu'il ne soit pas toujours facile de vous suivre ! Les réunions « Club Leucémies » étaient un véritable plaisir. Merci aussi pour ton soutien au cours de ces années. Je remercie également Nathalie Gallay qui m'a bien aidé à mener le projet LAM, on était à chaque fois très impatients de savoir s'il y avait des blastes congelés ! Merci à François qui a pris le relais et essayé de percer ce mystère des blastes fantômes ! Merci au reste de l'équipe Bernard Payrastre pour avoir répondu à toutes mes questions sur les LAM et à Damien Ramel pour m'avoir appris toutes les ficelles du Western Blot.

Je remercie l'équipe George Delsol, nous avons eu moins d'interaction mais c'était un plaisir de s'entraider dès que besoin. Merci à Etienne Coyaux pour les discussions du WE et l'aide

de dernière minute sur les problèmes de FlowJo version windows ! De bons souvenirs au Vasco le Gamma, fier d'avoir été le joker indispensable à notre victoire même si ça m'a coûté ma réputation !

Je remercie l'équipe Philippe LeBouteiller pour l'aide apportée pendant cette thèse, notamment Maryse Aguerre et Nabila Jabrane-Ferrat pour les cellules et les anticorps bien gentiment fournis ainsi que. Je vous remercie aussi pour votre soutien.

Je remercie aussi l'équipe Abdel Saoudi / Roland Liblaud pour les échanges d'anticorps bien que vous n'avez pas grand chose en anti-humain ! Merci aussi pour le reste.

Je remercie l'équipe Salvatore Valitutti / Loïc Dupré pour les échanges de buffy coat et quelques anticorps.

Je remercie toute l'équipe Jean-Jacques Fournié présente et passée :

Bon courage au Emilie Gross, Samar Kheirallah dont la soutenance arrive bien vite, Bon courage à Emilie Laprévotte et Emilie-Fleur Gautier, votre tour va vite venir ! Merci Emilie-Fleur d'être là tous les WE au labo, on sait au moins qui on va trouver le dimanche et qu'il y aura presque à chaque fois de quoi taper la discute en attendant que les tubes passent au FACS ou pendant les lavages ;-). Je te souhaite de réussir, tu le mérites amplement avec tout le travail que tu fournis ! Un grand merci à Anne Quillet-Mary et Christine Bezombes pour tous vos conseils avisés pendant cette thèse et votre précieux soutien. Merci Anne pour les daudi-beta2m !!! Merci à Guy Laurent, c'est un tel plaisir de vous écouter parler science. Merci à Loïc Ysebaert pour son énergie et la relecture de la partie revlimid de mon manuscrit. Bon courage à toi Charlotte. Merci à Jean-Philippe Guégan d'avoir apporté un peu de Bretagne et de masculinité dans cette équipe. Bon courage pour ta thèse rennaise, fais-nous de belles choses !

Mes chères collègues et amies, Aude-hélène Capietto, Christine Jean et Emilie Decaup, ça a été un tel plaisir de vous connaître qu'il me faudrait encore une thèse pour y décrire tous les bons moments passés ensemble ! Les barbecues, les soirées crêpes et galettes, les ballades...et votre bonne humeur. Un grand merci pour votre soutien infaillible. Emilie, bravo pour ton M2R et éclate toi pendant ta thèse, je suivrai ça de près ! Chris, courage pour la fin de l'écriture, t'inquiète pas tu va nous faire un truc du tonnerre, comme d'hab ! Un grand merci à toi pour tous tes bons conseils et on ira te voir à San Diego ! Aude-Hélène, ça y est tu commences à en voir sacrément le bout, bon courage pour préparer l'oral, ta thèse de pharma, les démarches pour le post-doc...je croise les doigts pour toi. Merci d'avoir toujours été là.

Je remercie mes anciens collègues de M2R : Yannick Poquet, Pascale Peyron-salek, Florence Levillain, ma chère Cathy Botanch et Guillaume Lay, pour votre soutien. D'ailleurs vous avez répondu présent à ma soutenance et ce n'est pas un hasard ! C'est toujours un plaisir de revenir vous voir et prendre le café ! De plus, les pique-niques de l'IPBS restent une institution !

Merci aussi Fanny Lemee et Oriane Bombarde pour votre soutien.

Merci à monsieur Jean-Pierre Van der Driessche d'avoir été compréhensif !

Cette thèse finie est aussi la fin d'une magnifique aventure toulousaine. Je remercie mes très très chers colloqs, Delphine, Cécile, Alex et Seb pour tout ce qu'on a vécu, mais vous le savez très bien ! Il faudrait là encore au moins une dizaine de thèse pour raconter tout ce qu'on a

vécu. Donc mes amis, bon courage pour finir votre thèse et Cécile bonne continuation à Bordeaux. Sophie, Julien je vous souhaite également que du bonheur. John et Constance, merci aussi pour votre soutien, et belle vie à N-Y. Merci Antoine pour ton soutien et belle vie à Boston. Maëva et Baptiste, merci aussi à vous, bon courage Maëva pour ta thèse et Baptiste on attend toujours le tee-shirt de la rider-family. Réré peut-être à un de ces jours ! Vraiment que de bons moments et c'est loin d'être fini !

Merci à mes amis Julien, Martin, à Luc et Elodie + Timéo et Anouk, à Xavier et Valérie + Gustave, à mon ami d'enfance François, à Seb (on retourne quand à N-Y ?!), à PED, à Denise, à Leïla, à Sab. Vraiment, un grand merci pour votre soutien.

Merci à mes parents et à mes sœurs Gaëlle et Anaïs, je vous aime ! Merci à toi Paul et toi aussi Catherine pour vos encouragements ainsi que ceux de votre famille et du reste de la bande (Racineux, Guérin, Salomon). Enfin, un remerciement tout spécial à mes grands-parents, vous m'apportez beaucoup de bonheur, et je vous dédie cette thèse.

RÉSUMÉ

Le lenalidomide est une drogue anti-cancéreuse utilisée avec succès dans des cancers hématologiques notamment le myélome multiple et les syndromes myéodysplasiques. Son activité anti-tumorale directe est faible, en revanche, il est capable de moduler le microenvironnement de diverses manières. Parmi celles-ci, il a été montré que le lenalidomide avait une action directe sur les lymphocytes T en augmentant leur production d'IFN- γ et d'IL-2 permettant ainsi, indirectement, d'activer les cellules Natural Killer (NK). Nos résultats montrent pour la première fois une action directe du lenalidomide sur les cellules NK. Contrairement aux lymphocytes T, il diminue leur capacité à produire de l'IFN- γ , et il diminue aussi l'expression de récepteurs inhibiteurs et activateurs (KIR et NKp46). Ces modifications phénotypiques n'ont cependant pas de conséquence sur l'activité cytolytique des cellules NK.

Une meilleure compréhension des mécanismes régissant les propriétés immunomodulatrices du Lenalidomide permettrait de mieux cibler son utilisation dans les cancers hématologiques.

50 à 70% des patients atteints de leucémies aiguës myéloïdes (LAM) atteignent la rémission complète (RC) après la chimiothérapie d'induction (1^{ère} RC). Malheureusement, le taux de rechute reste élevé. Des études ont montré que le nombre absolu de lymphocytes après la chimiothérapie est un facteur pronostic de meilleure survie sans rechute. Cependant, la nature et les capacités fonctionnelles des lymphocytes impliqués ne sont pas connues. Nous avons donc entrepris de caractériser l'expression des (co)-récepteurs activateurs et inhibiteurs de lyse présents à la surface des cellules NK ainsi que des lymphocytes T CD8⁺ et V γ 9V δ 2. Nos travaux mettent en évidence une proportion importante de cellules NK immatures (CD56^{bright}). En suivant quatre patients après la 1^{ère} RC, nous montrons que l'immaturité des cellules NK semble maintenue au cours du traitement de consolidation. Nous montrons également que les trois effecteurs cytotoxiques sur-expriment le récepteur activateur NKG2D se qui pourrait être, là encore, une conséquence du processus de reconstitution immunitaire. Il existe également une corrélation positive entre le pourcentage de cellules NK CD16⁺, le récepteur responsable de l'activité cytotoxique induite par l'anticorps, et le pronostic cytogénétique et moléculaire établi au diagnostic.

La confirmation fonctionnelle des phénotypes observés ainsi que le suivi longitudinal des patients sont des éléments cruciaux qui permettraient de préciser le rôle des effecteurs lymphoïdes cytotoxiques dans la survenue de la rechute et de proposer des immunothérapies ciblées efficaces. Les cellules stromales du microenvironnement tumoral ont un impact majeur sur la persistance des cellules cancéreuses qui sont à l'origine des rechutes et sur les cellules du système immunitaire. Au vu des multiples actions du lenalidomide son efficacité devrait être évaluée dans les LAM.

ABSTRACT

The lenalidomide is an anticancer drug that has been successfully used in hematological cancers such as multiple myeloma and myelodysplastic syndromes. Its direct anti-tumor activity is weak, nonetheless, it is able to modulate the microenvironment by different ways. Among these, it has been shown that lenalidomide has a direct effect on T cells increasing their production of IFN- γ and IL-2, allowing the indirect activation of Natural Killer (NK) cells. Our results show, for the first time, a direct action of lenalidomide on NK cells. First, contrary to T cells, it decreases their ability to produce IFN- γ and secondly it reduces the expression of inhibitory and activating receptors (KIR and NKp46). However, these phenotypic changes have not effect on the cytolytic activity of NK cells.

A better understanding of the mechanisms governing the immunomodulatory properties of lenalidomide would optimise its use in hematologic cancers.

50-70% of patients with acute myeloid leukemia (AML) reach complete remission (CR) after induction chemotherapy (1st CR). Unfortunately, the relapse rate remains high. Studies have shown that the absolute number of lymphocytes after chemotherapy is a prognostic factor of improved relapse-free survival. However, the type and functional abilities of lymphocytes involved are not known. We have therefore undertaken to characterise the expression of activatory and inhibiting (co)-receptors of lyses on the surface of NK cells and also CD8⁺ and V γ 9V δ 2 T cells. Our work shows a high proportion of immature NK cells (CD56^{bright}). Monitoring four patients after the 1st CR, we show that immaturity of NK cells is seems to be maintained during the treatment of consolidation. We also show that the three cytotoxic effectors over-express the activating receptor NKG2D, which could be again a consequence of immune reconstitution process. It also exists positive correlation between the percentage of CD16⁺ NK cells, the receptor responsible for antibody dependant cell cytotoxicity, and cytogenetic and molecular prognostic determined at diagnosis.

The functional confirmation of these phenotypes and longitudinal monitoring of patients are crucial elements that would clarify the role of cytotoxic lymphoid effectors in the occurrence of relapse and would offer the development effective targeted immunotherapies. Stromal cells of the tumor microenvironment have a major impact on the persistence of cancer cells and are decisive for relapse in the disease progression. Due to multiple properties, lenalidomide should be evaluated for AML patients.

SOMMAIRE

RÉSUMÉ.....	1
ABSTRACT.....	6
SOMMAIRE.....	7
TABLE DES ILLUSTRATIONS.....	10
ABRÉVIATIONS ET DÉFINITIONS.....	11
INTRODUCTION.....	15
Immuno-surveillance anti-tumorale et « immunoediting » des tumeurs.....	15
Élargissement du concept d'immuno-surveillance.....	18
I) Rôle des effecteurs lymphoïdes cytotoxiques dans la lutte anti-cancéreuse et immunothérapies.....	20
1. Génération des effecteurs lymphoïdes cytotoxiques.....	20
1.1. Les lymphocytes T CD8+ effecteurs cytotoxiques.....	20
1.2. Les lymphocytes T V γ 9V δ 2 effecteurs mémoires.....	22
1.3. Les cellules Natural Killer.....	24
2. Reconnaissance de la cible tumorale.....	26
2.1. Les cellules Natural Killer : intégration d'une multitude de signaux.....	26
2.1.1. L'hypothèse du « missing-self ».....	26
2.1.2. Acquisition d'un permis de tuer ou « licensing » des cellules NK.....	28
2.1.3. Les principaux récepteurs inhibiteurs.....	30
2.1.3.1. Les KIR inhibiteurs.....	30
2.1.3.2. Le récepteur CD94/NKG2A.....	32
2.1.3.3. Le récepteur ILT2.....	32
2.1.4. Les principaux récepteurs activateurs.....	32
2.1.4.1. Les NCR : NKp30, NKp44 et NKp46.....	33
2.1.4.2. Le CD16 (Fc γ RIIIA).....	34
2.1.4.3. Les KIR activateurs.....	35
2.1.4.4. Le récepteur NKG2D.....	36
2.1.5. Récepteurs additionnels.....	37
2.2. Les CTL et les lymphocytes T V γ 9V δ 2 : une activation forte par un couple récepteur-ligand.....	38
2.2.1. Les CTL et l'interaction CMH-peptide-TCR.....	38
Expression de récepteurs NK par les lymphocytes T CD8 ⁺	38
2.2.2. Les lymphocytes T V γ 9V δ 2 : rôle des phosphoantigènes.....	40
Expression de récepteurs NK par les lymphocytes T V γ 9V δ 2.....	43
3. Induction de la mort des cellules tumorales par les effecteurs lymphoïdes cytotoxiques.....	44
3.1. Mort induite par exocytose des granules cytotoxiques.....	44
3.1.1. Les granzymes.....	45
3.1.2. La granulysine.....	47
3.1.3. La perforine.....	48
3.2. Mort induite par engagement des récepteurs de mort.....	49

4. Principales cytokines produites par les effecteurs lymphoïdes cytotoxiques	50
5. Evidences d'un contrôle immunitaire des cancers hématologiques et immunothérapies	51
5.1. Mise en évidence par les thérapies	51
5.2. Mise en évidence directe	53
II) Le lenalidomide : efficacité clinique et propriétés	55
1. Efficacité clinique du lenalidomide dans les cancers hématologiques	58
1.1. Les hémopathies lymphoïdes B (Figure 25)	58
1.1.1. Le myélome multiple	58
1.1.2. La leucémie lymphoïde chronique B	59
1.1.3. Les lymphomes non-hodgkiniens.....	60
1.1.4. La macroglobulinémie de Waldenström et amylose à chaîne légère des immunoglobulines	61
1.2. Les syndromes myélodysplasiques	61
1.3. Les leucémies aiguës myéloïdes	64
2. Propriétés du lenalidomide.....	65
2.1. Propriétés anti-tumorales directes	65
2.2. Interférences avec le microenvironnement tumoral	67
2.2.1. Propriété anti-inflammatoire	67
2.2.2. Propriété anti-angiogénique	68
2.2.3. Modulation de l'expression des molécules d'adhésion.....	69
2.2.4. Propriété anti-ostéoclastogénique	69
2.3. Propriétés immuno-régulatrices	70
2.3.1. Action sur les cellules NKT	70
2.3.2. Propriété de costimulation des lymphocytes T	70
2.3.3. Propriété d'activation des cellules NK.....	71
III) Les effecteurs lymphoïdes cytotoxiques et traitements des leucémies aiguës myéloïdes : rôle prépondérant des cellules Natural Killer.....	74
1. Classification	74
2. Apparition des LAM et cellules « initiatrice de la leucémie »	77
3. Traitements conventionnels.....	79
4. Rôle de l'immuno-surveillance dans les LAM	80
4.1. Les lymphocytes T CD8+ cytotoxiques et les lymphocytes T V γ 9V δ 2	81
4.1.1. Les lymphocytes T CD8+ cytotoxiques	81
4.1.1.1. Les antigènes tumoraux associés aux LAM et la vaccination peptidique.....	82
4.1.1.2. Le transfert adoptif de lymphocytes T cytotoxiques spécifiques.....	85
4.1.1.3. Utilisation des cellules dendritiques et activation endogène de LT CD8+ spécifiques.....	85
4.1.2. Les lymphocytes T $\gamma\delta$; une sous-population lymphocytaire cytotoxique peu étudiée dans les LAM.....	86
4.2. Les cellules Natural Killer : un effecteur cytotoxique de choix pour les LAM.....	86
4.2.1. Utilisation dans un contexte allogénique	86
4.2.1.1. Rôle des cellules NK allogéniques dans la transplantation.....	86
4.2.1.2. Reconstitution altérée des cellules NK allogéniques après transplantation ...	90
4.2.1.3. Le transfert adoptif de cellules NK alloréactives	91

4.2.2. Alternative aux cellules NK allogéniques par masquage des KIR.....	91
4.2.3. Utilisation dans un contexte autologue	92
4.2.3.1. Déficiences des cellules NK chez les patients LAM.....	92
4.2.3.2. Utilisation d'anticorps monoclonaux et ADCC	92
4.2.3.3. Régulation des ligands de NKG2D par des inhibiteurs de la régulation épigénétique et du protéasome	94
4.2.3.4. Activation endogène des cellules NK par les cytokines : rôle de l'IL-2 et de l'IFN- α	95
OBJECTIFS DES TRAVAUX	97
RÉSULTATS	99
1) Propriétés immunomodulatrices du Lenalidomide sur les cellules Natural Killer de donneurs sains	99
2) Caractérisation phénotypique des effecteurs lymphoïdes cytotoxiques de patients atteints de leucémies aiguës myéloïdes en rémission complète après chimiothérapie d'induction	123
SYNTHÈSE ET PERSPECTIVES	145
BIBLIOGRAPHIE.....	149

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1 Développement de tumeurs spontanées ou induites par des carcinogènes chez des souris immunodéficientes (Dunn et al., 2006).	17
Figure 2 Les trois phases de l'immunoediting (Dunn et al., 2004b).	18
Figure 3 Schéma du développement des effecteurs T CD8+. Adapté de (Kennedy and Celis, 2008).	21
Figure 4 Schéma du développement des effecteurs T V γ 9V δ 2.	23
Figure 5 Sous-populations des cellules NK du sang périphérique (Cooper et al., 2001).	24
Figure 6 Phénotype des cellules NK CD56 ^{dim} et CD56 ^{bright} (Cooper et al., 2001).	25
Figure 7 Intégration des signaux inhibiteurs et activateurs des cellules NK (Raulet and Vance, 2006).	27
Figure 8 Diversité combinatoire de l'expression des KIR (Gardiner, 2008).	28
Figure 9 Modèles du licensing des cellules NK, (Jonsson and Yokoyama, 2009).	30
Figure 10 Les KIR inhibiteurs. Adapté de (Parham and McQueen, 2003).	31
Figure 11 Principe de la lyse redirigée (Yokoyama and Plougastel, 2003).	33
Figure 12 Structure des NCR (NKp30, 44 et 46) (Moretta and Moretta, 2004).	34
Figure 13 Les KIR activateurs. Adapté de (Parham and McQueen, 2003).	35
Figure 14 Les ligands humains du récepteur NKG2D. Adapté de (Champsaur et al., 2010).	36
Figure 15 Les phosphoantigènes et leurs bioactivités sur les LT $\gamma\delta$. Adapté de (Belmant, 2006).	41
Figure 16 Voies de biosynthèse des phosphoantigènes, (Bonneville and Fournie, 2005).	42
Figure 17 Polarisation des granules cytotoxiques à la synapse immunologique. Adapté de (Orange, 2008).	45
Figure 18 Spécificité de clivage des différentes granzymes (Barry and Bleackley, 2002).	45
Figure 19 Modes d'action du granzyme B (Lieberman, 2003).	46
Figure 20 Comparaison de la susceptibilité aux infections et au développement tumoral des souris perforine et granzyme KO. Adapté de (Voskoboinik et al., 2006).	47
Figure 21 Voies d'entrée du granzyme B (Barry and Bleackley, 2002).	49
Figure 22 Chronologie du développement du thalidomide et des IMiD® (Bartlett et al., 2004).	55
Figure 23 Structures énantiomères du thalidomide (Bartlett et al., 2004).	56
Figure 24 Structure du thalidomide et des IMiD®. Adapté de (Bartlett et al., 2004).	57
Figure 25 Schéma représentatif de l'origine des cellules B composant les hémopathies lymphoïdes B. Adapté de (Lenz and Staudt, 2010).	58
Figure 26 Signature moléculaire du lenalidomide, (Ebert et al., 2008a).	63
Figure 27 Sommaire des principales propriétés des IMiD® (Quach et al., 2010).	73
Figure 28 Classification FAB (Krause and Van Etten, 2007).	75
Figure 29 Prise en compte des anomalies moléculaires pour l'ajustement de la classification cytogénétique (Renneville et al., 2008).	76
Figure 30 Classification cytogénétique et moléculaire des LAM (Dohner et al., 2010).	77
Figure 31 Modèle de la leucémogénèse initiée par MLL-ENL à partir de cellules souches hématopoïétiques mais aussi de progéniteurs myéloïdes (Cozzio et al., 2003).	79
Figure 32 Tableau récapitulatif et comparatif des paramètres pouvant influencer l'alloréactivité des cellules NK (Gill et al., 2009).	89
Figure 33 Les KIR : haplotypes les plus fréquents de la population caucasienne. Adapté de (Parham, 2005).	120
Figure 34 Test de lyse restrictif avec une association unique KIR inhibiteur/CMH-I.	121

ABRÉVIATIONS ET DÉFINITIONS

ABC-DLBCL : activated B cell-like subtype of Diffuse Large B-Cell Lymphoma

ADCC : Antibody-Dependent Cell Cytotoxicity

ADNc : Acide DésoxyriboNucléique complémentaire

AICL : Activation-Induced C-type Lectin

Amylose AL : Amylose Light chain

Ara-C : Aracytin® ou cytosine arabinosine

ARNm : Acide RiboNucléique messenger

ATG : AntiThymocyte Globuline

BCR : B-Cell Receptor

Bcr-Abl : Breakpoint cluster region–Abelson

bFGF : basic Fibroblast Growth Factor

BrHPP : Bromo- Hydrin PyroPhosphate

CDC25C : Cell Division Cycle 25 C

CDK : Cyclin-Dependent Kinase

CFU : Colony Forming Unit

CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité

CMP : Common Myeloid Progenitors

COX-2 : CycloOXygenase-2

DLBCL : Diffuse Large B-cell Lymphoma

DLI : Donor Lymphocyte Infusion

DMAPP : DiMethylAllyl PyroPhosphate

FAB : French-American-British

FADD : Fas Associated protein with Death Domain

FasL : Fas-Ligand

FLT3-ITD, -TKD : FMS-Like Tyrosine kinase 3-Internal Tandem Repeat, -Tyrosine Kinase Domain

GCB-DLBCL : Germinal Center B cell-like subtype of Diffuse Large B-Cell Lymphoma

G-CSF : Granulocyte-Colony Stimulating Factor

GMP : Good Manufacturing Production

GMP : Granulocytic/Monocytic-restricted Progenitor

GvHD : Graft versus Host Disease

GvL : Graft versus Leukemia
HDMAPP : Hydroxy-2-methyl-2-buten-4-yl 4-diphosphate
HLA : Human Leukocyte Antigen
HSC : Hematopoietic Stem Cell
HUVEC : Human Umbilical Vein Endothelial Cells
ICAM-1 : Inter-Cellular Adhesion Molecule 1
IFN- γ : Interféron-gamma
ILT-2 : Immuno Lectin Type-2
IPP : Isopentenyl PyroPhosphate
IPSS : International Prognostic Scoring System
ITAM : Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif
ITIM : Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibitory Motif
KIR : Killer Immunoglobulin like Receptor
KO : Knock Out
LAL : Leucémie Aiguë Lymphoïde
LAM : Leucémies Aiguës Myéloïdes
LFA-1 : Leukocyte Function-associated Antigen 1
LIR : Leukocyte Ig-like Receptor
LMC : Leucémie Myéloïde Chronique
LNH : Lymphome Non Hodgkinien
MA : MyeloAblative conditioning
MCA : MéthylCholAnthrène
MGW : MacroGlobulinémie de Waldenström
MICA et B : MHC class I Chain-related protein A et B
MLL-ENL : Mixed-Lineage Leukemia-Eleven Nineteen Leukemia.
NCR : Natural Cytotoxicity Receptor
NF- κ B : Nuclear Factor-kappa B
NK : Natural Killer
NKT : Natural Killer T
OS : Overall Survival
PBMC : Peripheral Blood Mononuclear Cells
PG-E2 : ProstaGlandine-E2
PP2A-C α : Protein Phosphatase type 2A-Calpha

PRAME : PReferentially expressed Antigen in MELanoma
RC : Rémission Complète
RFS : Relapse Free Survival
RIC : Reduced-Intensity Conditioning
RP : Rémission Partielle
RPS14 : 40S Ribosomal Protein S14
SAPLIP : SAPosin Like Protein
SMD : Syndrome MyeloDysplasique
SSX2IP : Synovial Sarcoma, X breakpoint 2 Interacting Protein
TCR : T-cell receptor
TGF- β : Tumor Growth Factor-beta
TNFR : Tumor Necrosis Factor Receptor
TNF- α : Tumor Necrosis Factor-alpha
TRADD : Tumor necrosis factor Receptor -Associated Death Domain
TRAIL : Tumor necrosis factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand
ULBP : UL-16 Binding Protein
VCAM-1 : Vascular-Cell Adhesion Molecule-1
VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor
VLA-4 : Very Late Antigen-4
WHO : World Health Organisation
WT-1 : Wilms Tumor-1
 α -Galcer : alpha-Galactoceramide

Survie globale ou overall survival (OS) : définie pour tous les patients d'une étude; mesurée de la date d'entrée dans l'étude et la date de mort quelle qu'en soit la cause; les patients dont on ne sait pas s'ils étaient décédés à la date du dernier suivi, sont censurés à la dernière date où l'on sait qu'ils étaient vivants.

Survie sans rechute ou relapse-free survival (RFS) : définie seulement pour les patients qui ont atteint la rémission complète (RC) ou la rémission complète sans un recouvrement sanguin (RCi); mesurée de la date de la rémission complète jusqu'à la date de rechute ou de mort quelle qu'en soit la cause; les patients dont on ne sait pas s'ils ont rechuté ou s'ils sont morts à la date du dernier suivi, sont censurés à la dernière date du dernier examen.

INTRODUCTION

Immuno-surveillance anti-tumorale et « immunoediting » des tumeurs

En 1909, Paul Ehrlich avance l'hypothèse que le système immunitaire puisse réprimer le développement de carcinomes dont la fréquence d'apparition serait, sans ce contrôle immunitaire, beaucoup plus élevée que celle observée cliniquement. Cette hypothèse sous-entendait l'existence de structures propres aux tumeurs, reconnaissables par le système immunitaire c'est-à-dire l'expression d'antigènes spécifiques des tumeurs (Ehrlich, 1909).

Dans un premier temps, cette prédiction fut peu suivie et faillit même être oubliée car les travaux de Peter Medawar et collaborateurs jetèrent un doute profond sur l'existence des antigènes spécifiques de la tumeur (Medawar, 1944). En effet, la reconnaissance et l'élimination par le système immunitaire d'une tumeur transplantée à une souris de fond génétique différent était admis cependant, le mécanisme du rejet apparaissait plutôt comme celui d'une allogreffe d'un tissu comme la peau à cause de l'incompatibilité des molécules du HLA, plutôt qu'à celui d'un rejet spécifique par la présence d'antigènes tumoraux.

Quelques années plus tard, Franck Macfarlane Burnet et Lewis Thomas redonnèrent un regain d'intérêt à cette prédiction en formulant le concept « d'immuno-surveillance des cancers » (Burnet, 1957; Thomas, 1959). Ils réaffirmèrent la nécessité de la présence de structures antigéniques propres aux tumeurs pour qu'un contrôle du système immunitaire puisse exister. Lewis Thomas s'appuyait sur une vision évolutive où les organismes à longue durée de vie, plus enclins aux modifications génétiques, se doivent de posséder des mécanismes d'élimination des cellules mutantes potentiellement dangereuses. Là encore, ils se heurtèrent à un problème de taille : si le développement d'une tumeur chez un hôte immunocompétent est stoppé par la surveillance exercée par son système immunitaire, comment démontrer expérimentalement ce phénomène, par définition invisible ? (Dunn et al., 2004a; Thomas, 1982).

Afin de confronter les prédictions de l'immuno-surveillance antitumorale à l'observation, les premières expériences eurent pour objectif de démontrer que chez des hôtes ayant un système immunitaire détérioré le développement tumoral devait être plus important. Pour cela, le modèle des souris Nude, naturellement dépourvues de thymus, a été utilisé. Les résultats obtenus ne révélèrent cependant aucune différence dans le développement de tumeurs

spontanées (Rygaard and Povlsen, 1974), ou induites par le méthylcholanthrène (MCA) (Stutman, 1974), chez ces souris en comparaison de souris sauvages syngéniques, même après une longue période d'observation. Tout au plus, ces résultats mirent en avant la susceptibilité de ces souris immuno-déficientes au développement de tumeurs viro-induites. A cette époque, ces résultats décevants mais convaincants portèrent un autre coup dur à l'hypothèse de l'immuno-surveillance antitumorale (Dunn et al., 2002).

Nous savons aujourd'hui que malgré l'absence de thymus, ces souris possèdent quand même une petite population fonctionnelle de lymphocytes T $\alpha\beta$ ne permettant pas d'exclure un rôle de ces lymphocytes conventionnels dans l'immuno-surveillance antitumorale (Ikehara et al., 1984). De plus, ces études ont été menées avant la caractérisation des cellules Natural Killer (NK) et des lymphocytes T non conventionnels $\gamma\delta$ (LT $\gamma\delta$) dont le développement peut se faire en absence de thymus (Di Santo, 2008; Hayday, 2000).

Grâce au développement constant de la génétique et l'utilisation des souris syngéniques, le concept de l'immuno-surveillance antitumorale a pu reprendre un peu d'essor. En 1964, Old et Boyse démontrèrent qu'une tumeur induite par des carcinogènes, transplantée dans une souris syngénique puis excisée chirurgicalement après quelques jours, conduit à une immunisation de cette souris contre une seconde greffe de la même tumeur (Old and Boyse, 1964). Ainsi, ces expériences démontrent qu'une tumeur donnée et les greffons qui en sont dérivés expriment des antigènes qui leurs sont propres.

Par la suite, le développement de souris spécifiquement déficientes pour les différentes populations immunitaires ou le développement d'anticorps monoclonaux permettant la déplétion de ces populations immunitaires, permirent de valider le concept d'immuno-surveillance antitumorale ainsi que son élargissement (voir ci-après). Les souris Knock-Out (KO) pour l'enzyme de recombinaison RAG-2, essentielle pour le réarrangement du TCR ou du BCR, ne produisent ni lymphocytes T ou lymphocytes B matures ni LT $\gamma\delta$ ni cellules NKT (Natural Killer T). Suite à l'injection d'un agent carcinogène (MCA), les souris RAG-2^{-/-} développent des sarcomes au site d'injection plus rapidement et à une plus grande fréquence que les souris syngéniques contrôles (Shankaran et al., 2001). Afin d'étudier le rôle des différentes populations immunitaires dans le développement tumoral, une série de souris KO a été générée (Crowe et al., 2002; Gao et al., 2003; Girardi et al., 2003). Individuellement, l'inactivation de chacune de ces populations induit une susceptibilité accrue des souris KO au développement de tumeurs induites par le MCA (**Figure 1**). Seule l'inactivation spécifique des cellules NK n'a pu être complètement réalisée. En effet, l'utilisation de l'anticorps anti-

NK1.1 permet d'éliminer les cellules NK mais aussi NKT (Smyth et al., 2000a). De même, l'utilisation de l'anticorps anti-asialo GM1 permet l'élimination des cellules NK mais également celle des monocytes/macrophages activés (Smyth et al., 2001).

Mouse immunodeficiency	Immune status	Tumour susceptibility relative to wild-type mice
<i>Rag1</i> ^{-/-} or <i>Rag2</i> ^{-/-}	Lacks T cells, B cells and NKT cells	↑ MCA-induced sarcomas ↑ Spontaneous intestinal neoplasias
<i>Rag2</i> ^{-/-} <i>Stat1</i> ^{-/-}	Lacks T cells, B cells and NKT cells; insensitive to IFN α , IFN β and IFN γ	↑ MCA-induced sarcomas ↑ Spontaneous intestinal and mammary neoplasias
SCID BALB/c	Lacks T cells, B cells and NKT cells	↑ MCA-induced sarcomas
<i>Tcrb</i> ^{-/-}	Lacks $\alpha\beta$ T cells	↑ MCA-induced sarcomas
<i>Tcrd</i> ^{-/-}	Lacks $\gamma\delta$ T cells	↑ MCA-induced sarcomas ↑ DMBA- plus TPA-induced skin tumours
<i>Tcrb</i> ^{-/-} <i>Tcrd</i> ^{-/-}	Lacks $\alpha\beta$ T cells and $\gamma\delta$ T cells	↑ DMBA- plus TPA-induced skin tumours
J α 281 TCR gene-segment deficiency	Lacks NKT-cell subset	↑ MCA-induced sarcomas
<i>Lmp2</i> ^{-/-}	Lacks LMP2 subunit	↑ Spontaneous uterine neoplasms
Asialo-GM1-specific antibody treatment	Lacks NK cells, monocytes and macrophages	↑ MCA-induced sarcomas
NK1.1-specific antibody treatment	Lacks NK cells and NKT cells	↑ MCA-induced sarcomas
Thy1-specific antibody treatment	Lacks T cells	↑ MCA-induced sarcomas
Immunization with self antigen	Increased regulatory T-cell activity	↓ Latency of MCA-induced sarcomas
<i>Stat1</i> ^{-/-}	Insensitive to IFN α , IFN β and IFN γ	↑ MCA-induced sarcomas Wider tumour range in <i>Stat1</i> ^{-/-} <i>Tp53</i> ^{-/-} mice
<i>Ifngr1</i> ^{-/-}	Insensitive to IFN γ	↑ MCA-induced sarcomas Wider tumour range in <i>Ifngr1</i> ^{-/-} <i>Tp53</i> ^{-/-} mice
<i>Ifnar1</i> ^{-/-}	Insensitive to IFN α and IFN β	↑ MCA-induced sarcomas
<i>Ifng</i> ^{-/-}	Lacks IFN γ	↑ MCA-induced sarcomas C57BL/6 mice: ↑ Spontaneous disseminated lymphomas; ↓ latency of <i>tax</i> -transgene-induced leukaemia BALB/c: ↑ Spontaneous lung adenocarcinomas
<i>Gmcsf</i> ^{-/-} <i>Ifng</i> ^{-/-}	Lacks GM-CSF and IFN γ	↑ Spontaneous lymphomas ↑ Non-lymphoid solid cancers
<i>Pfp</i> ^{-/-} <i>Ifng</i> ^{-/-}	Lacks perforin and IFN γ	↑ MCA-induced sarcomas ↑ Spontaneous disseminated lymphomas
<i>Pfp</i> ^{-/-} <i>b2m</i> ^{-/-}	Lacks perforin, MHC class I molecules and CD8 ⁺ T cells	↑ Spontaneous disseminated lymphomas
<i>Pfp</i> ^{-/-}	Lacks perforin	↑ MCA-induced sarcomas ↑ Spontaneous lymphomas ↑ Spontaneous lymphomas and sarcomas in <i>Pfp</i> ^{-/-} <i>Tp53</i> ^{-/-} mice
<i>Trail</i> ^{-/-}	Lacks TRAIL	↑ MCA-induced sarcomas ↑ Spontaneous lymphomas ↑ Spontaneous lymphomas and sarcomas in <i>Trail</i> ^{-/-} <i>Tp53</i> ^{-/-} mice
TRAIL-specific antibody treatment	Blockade of TRAIL	↑ MCA-induced sarcomas ↑ Spontaneous lymphomas and sarcomas

Figure 1 Développement de tumeurs spontanées ou induites par des carcinogènes chez des souris immunodéficientes (Dunn et al., 2006).

Le développement de cancers hématologiques spontanés est particulièrement visible dans les modèles de souris KO pour la perforine et la beta-2-microglobuline (*pfp*^{-/-} *b2m*^{-/-}). Ces souris ne produisent pas de perforine, n'expriment pas de molécules du CMH-I et ne possèdent donc pas de lymphocytes T CD8⁺. Elles ont des cellules NK et des lymphocytes T $\gamma\delta$ mais qui sont

très peu cytotoxiques. Les lymphomes observés chez ces souris ne résultent pas d'infections opportunistes car les souris sont dans un environnement sans pathogènes.

Chez l'Homme, les patients immuno-déprimés ou immuno-déficients sont plus sensibles à l'apparition de cancer (Boshoff and Weiss, 2002). Cependant, ces cancers sont particuliers car ils résultent le plus souvent d'infections opportunistes virales. Ainsi, pour les maladies lymphoprolifératives observées suite à une transplantation hématopoïétique, le génome du virus Epstein-Barr est retrouvé dans une grande majorité des lymphocytes B (Dolcetti, 2007). Cette résurgence peut être inversée suite à l'arrêt du traitement immuno-suppresseur ou le transfert adoptif de lymphocytes T spécifiques de l'EBV (Savoldo et al., 2006).

Élargissement du concept d'immuno-surveillance

Les expériences précédentes décrivent le rôle du système immunitaire dans le contrôle de l'émergence de tumeurs primaires. Cette surveillance n'est cependant que la première partie d'un concept plus large appelé « immunoediting ». Le système immunitaire effectue un contrôle permanent du développement tumoral et exerce donc une pression de sélection pouvant conduire au développement de tumeurs secondaires par l'émergence de clones tumoraux échappant à la surveillance immune.

L'immunoediting se déroule en trois phases : l'élimination, l'équilibre et l'échappement (Figure 2).

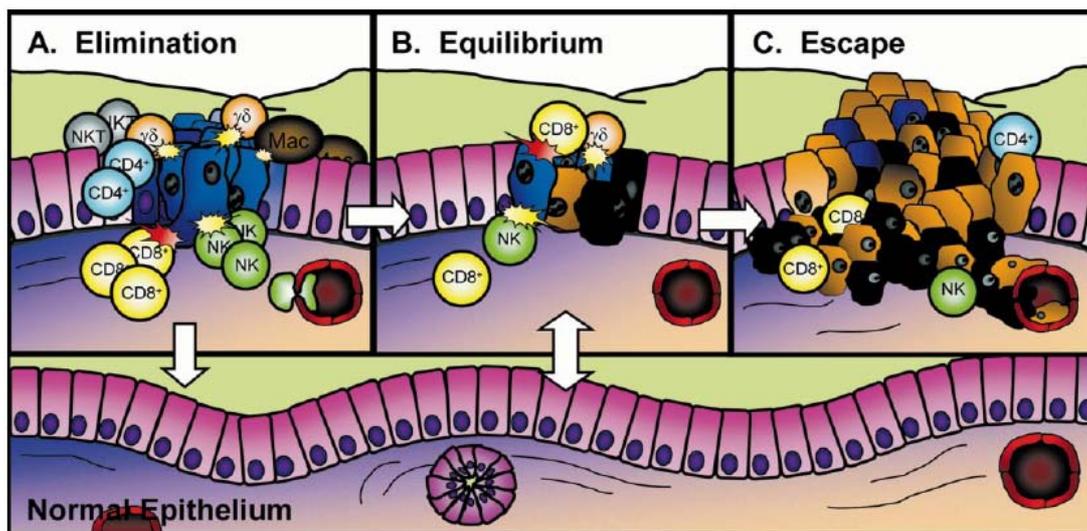


Figure 2 Les trois phases de l'immunoediting (Dunn et al., 2004b).

L'élimination correspond à une phase active où le système immunitaire reconnaît et détruit les cellules tumorales. Si ces cibles ne sont pas totalement éliminées alors une phase d'équilibre dynamique s'installe entre l'action du système immunitaire et le développement tumoral. La pression de sélection exercée par le système immunitaire est forte et les cellules tumorales grâce à leur grande instabilité génétique peuvent acquérir des micro- (mutations génétiques et épigénétiques) ou macro-réarrangements (translocation, délétion, inversion, duplication) leur permettant de se soustraire à cette sélection : c'est la phase d'échappement.

L'échappement correspond à l'émergence de variants tumoraux qui ont réussi à perdre suffisamment d'immunogénicité pour s'échapper de la pression immune. Leur croissance est donc sans retenue et c'est généralement lors de cette phase que la tumeur devient cliniquement détectable.

Chez la souris, la phase d'équilibre est démontrée par des expériences de transplantation de tumeurs entre souris syngéniques. Des tumeurs issues de souris immunodéficientes ($RAG2^{-/-}$) ou immunocompétentes se développent de façon identiques lorsqu'elles sont transplantées dans un hôte syngénique immunodéficient. Lors d'une transplantation dans un hôte syngénique immunocompétent, les tumeurs issues des souris $RAG2^{-/-}$ sont éliminées du fait de leur forte immunogénicité au contraire des tumeurs issues de souris immunocompétentes (Koebel et al., 2007). Ces expériences démontrent la capacité du système immunitaire à interagir avec les cellules tumorales et à moduler leur développement.

Chez l'Homme, l'existence d'une phase d'équilibre est visible dans des cas cliniques très particuliers. Ainsi, MacKie et collaborateurs ont pu observer chez deux receveurs, l'apparition d'un mélanome métastatique secondaire 1 à 2 ans après une transplantation de reins provenant du même donneur. Ce donneur avait subi une intervention chirurgicale en 1982 pour un mélanome primaire de 2-3 mm d'épaisseur mais a été suivi pendant 15 ans sans un quelconque déclassement de tumeur résiduelle. Ainsi, des cellules tumorales étaient toujours présentes chez le donneur mais indétectables pour son système immunitaire (MacKie et al., 2003).

I) Rôle des effecteurs lymphoïdes cytotoxiques dans la lutte anticancéreuse et immunothérapies

1. Génération des effecteurs lymphoïdes cytotoxiques

1.1. Les lymphocytes T CD8⁺ effecteurs cytotoxiques

Les capacités migratoires des lymphocytes T $\alpha\beta$ naïfs ne leur permettent pas de rejoindre les sites d'infections ou de développement tumoral. A leur sortie du thymus, ces lymphocytes T naïfs se localisent dans les organes lymphoïdes secondaires (ganglions lymphatiques, rate et plaques de Peyer de l'intestin) et recirculent d'un organe lymphoïde à l'autre par l'intermédiaire des réseaux lymphatiques et sanguins grâce à l'expression du récepteur aux chimiokines CCR7 (Miyasaka and Tanaka, 2004). Ainsi, l'apport des antigènes, produits par le foyer infectieux ou la tumeur, vers les zones T des organes lymphoïdes secondaires est indispensable au déclenchement de la réponse T primaire. Les cellules dendritiques sont les principales cellules effectuant ce transport. Elles sont présentes à l'état immature dans les tissus périphériques où elles jouent le rôle de sentinelles vis-à-vis de toutes intrusions étrangères (Guermonprez et al., 2002).

La pleine activation des cellules T CD8⁺ naïfs (CD27⁺CD45RA⁺) dépend de plusieurs signaux dont le premier fournit la spécificité de la réponse : c'est l'interaction entre le TCR et le complexe CMH-peptide. Le corécepteur CD8 présent sur les lymphocytes T est essentiel à ce premier signal car il participe, par son interaction au CMH-I, à la stabilisation du complexe TCR-peptide-CMH et ainsi à la délivrance d'un signal prolongé. Ce premier signal conduit notamment à l'expression du CD25 permettant la formation du récepteur de haute affinité à l'IL-2, indispensable pour l'expansion clonale du lymphocyte (Williams and Bevan, 2007) (**Figure 3**).

Le second signal, ou signal de costimulation, est délivré par de nombreuses molécules et détermine le devenir de la réponse enclenchée. Ainsi, l'engagement du CD28 avec les molécules CD80 et CD86, surexprimées par les cellules dendritiques lors de leur maturation, est primordial pour la génération de lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques (CTL) (Sharpe and Freeman, 2002) (**Figure 3**). En effet, la délivrance du signal TCR sans signaux de costimulation suffisants mène à l'anergie du lymphocyte qui ne peut alors plus être réactivé

par une seconde stimulation antigénique et qui est incapable de produire de l'IL-2 (Schwartz, 2003).

Enfin, la pleine activation des lymphocytes T conduit à un remaniement de l'expression des récepteurs aux chimiokines comme la perte de CCR7 (**Figure 3**) et la capacité des effecteurs cytotoxiques à migrer vers le site d'infection ou de danger (Miyasaka and Tanaka, 2004). Sur le site d'action le CTL exerce son activité cytotoxique qui est cette fois-ci uniquement dirigée par la reconnaissance de l'antigène, le signal de costimulation par CD28 étant dispensable.

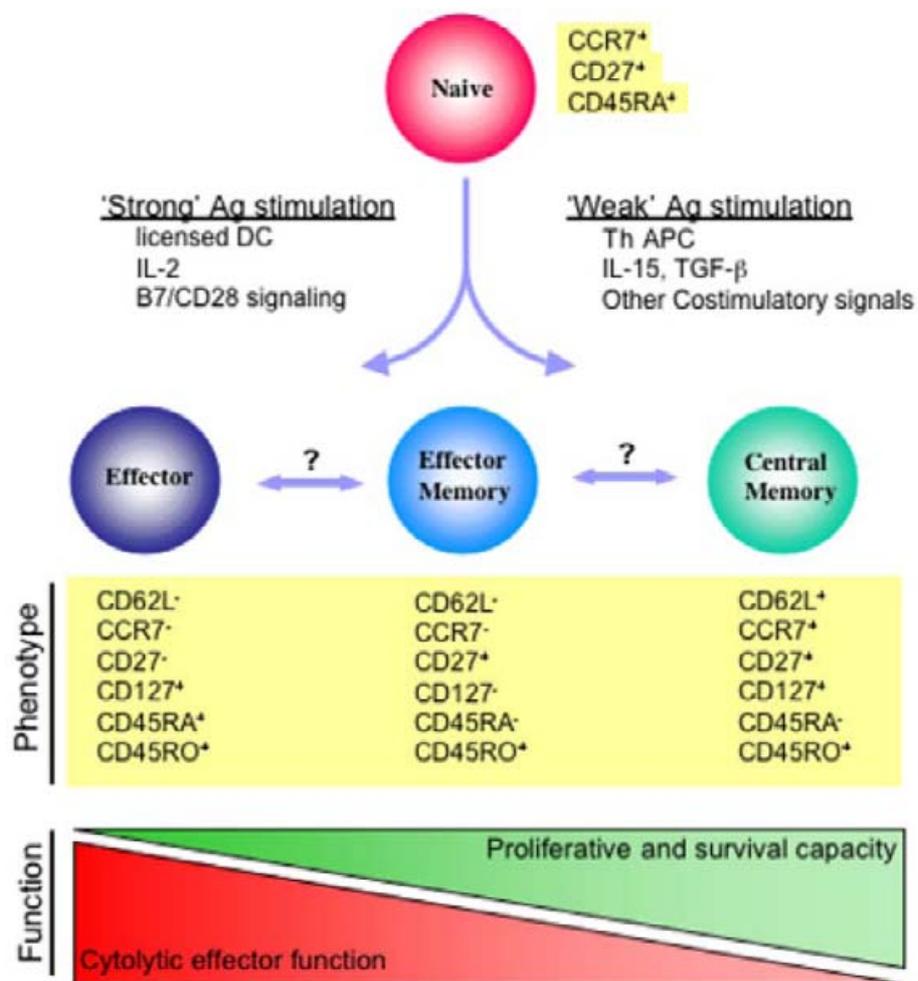


Figure 3 Schéma du développement des effecteurs T CD8⁺. Adapté de (Kennedy and Celis, 2008).

Les lymphocytes T CD4⁺ sont essentiels dans la mise en place des réponses T cytotoxiques mémoires par l'interaction entre CD40L et le récepteur CD40 exprimé par les lymphocytes T CD8⁺ suite à leur activation (Bourgeois et al., 2002). Leur capacité à produire de forte

quantité d'IL-2 mais aussi d'IFN- γ est un paramètre non négligeable de l'action des lymphocytes T CD4⁺ (Kennedy and Celis, 2008).

1.2. Les lymphocytes T V γ 9V δ 2 effecteurs mémoires

Les lymphocytes T $\gamma\delta$ sont une population de lymphocytes T non conventionnels qui représentent de moins 1 à 10% des lymphocytes circulants et jusqu'à 50% des lymphocytes T des tissus épithéliaux ou des organes lymphoïdes. Ils sont caractérisés par un TCR formé par l'association d'une chaîne γ et d'une chaîne δ . L'association des chaînes V γ 9V δ 2 représente 70 à 90% de la population des lymphocytes T $\gamma\delta$ circulants. Les lymphocytes T $\gamma\delta$ possédant le segment V δ 1 et diverses associations avec les segments V γ 2, 3, 5 ou 8 représentent très majoritairement les lymphocytes T $\gamma\delta$ des tissus épithéliaux comme les muqueuses intestinales et la peau (Deusch et al., 1991). Les lymphocytes V δ 2 reconnaissent des phosphoantigènes environnementaux et sont donc activés très tôt dans le développement, conduisant à l'expansion préférentielle de cette population. De façon remarquable, il est estimé que la plupart des lymphocytes V δ 2 sont activés au cours de la première année de vie et évoluent ainsi rapidement en lymphocytes mémoires (De Rosa et al., 2004).

Les lymphocytes T $\gamma\delta$ sont considérés comme une population immunitaire appartenant à l'immunité adaptative à cause de l'expression d'un TCR réarrangé mais aussi à l'immunité innée par la faible variabilité combinatoire du TCR rappelant les récepteurs non réarrangés présents à la surface des cellules NK.

Dans ce manuscrit nous nous intéresserons uniquement à la population présente dans le sang circulant, c'est-à-dire les lymphocytes T V γ 9V δ 2.

De façon similaire aux LT CD8⁺ l'expression des marqueurs CD27, CD45RA mais aussi CD16 permet de définir plusieurs sous-populations de lymphocytes T V γ 9V δ 2 correspondant à différents stades de maturation (Angelini et al., 2004; Caccamo et al., 2006; Dieli et al., 2003) (**Figure 4**).

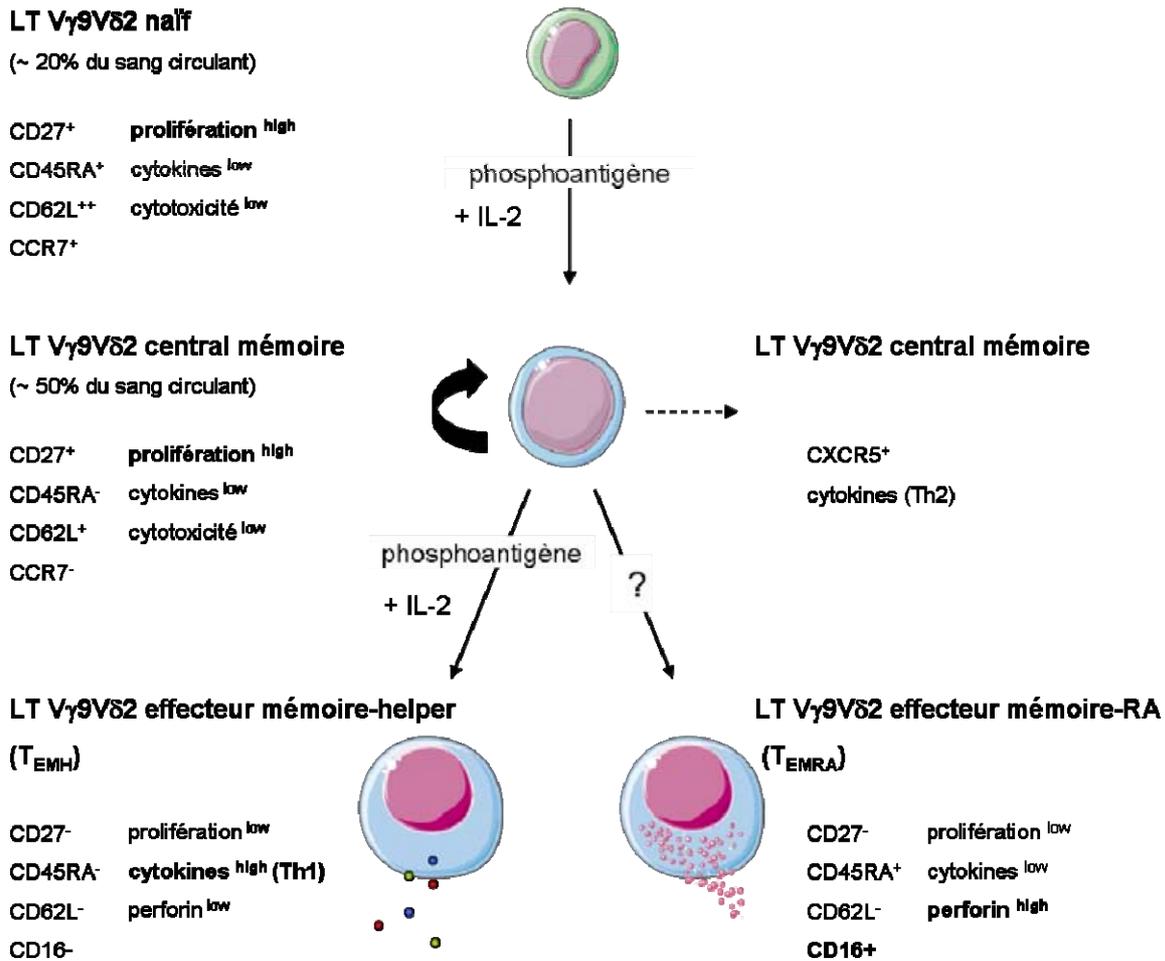


Figure 4 Schéma du développement des effecteurs T V γ 9V δ 2.

Les lymphocytes T naïfs (CD27⁺CD45RA⁺CD16⁻) et les lymphocytes central mémoire (CD27⁺CD45RA⁻CD16⁻) sont essentiellement capables de proliférer en réponse aux phosphoantigènes en présence d'IL-2 ou d'IL-15 conduisant au dernier stade de maturation : l'effecteur mémoire ou T_{EMH}.

Les T_{EMH} (CD27⁻CD45RA⁻) expriment un fort niveau de récepteurs aux chimiokines pro-inflammatoires CXCR3, CCR5 et CCR6 qui leur permettent de migrer au site d'inflammation. Ces cellules expriment peu de perforine mais produisent de nombreuses cytokines comme l'IFN- γ et le TNF- α en réponse aux phosphoantigènes.

D'autres effecteurs mémoires, les T_{EMRA} (CD27⁻CD45RA⁺), ont des propriétés cytotoxiques beaucoup plus prononcées, notamment parce qu'ils contiennent des taux élevés de perforine et qu'ils expriment de façon constitutive le CD16 suggérant leur implication dans les mécanismes d'ADCC (Antibody-Dependent Cell Cytotoxicity). Ils expriment aussi d'autres récepteurs inhibiteurs comme les KIR (Killer Immunoglobulin like Receptor), CD94/NKG2A

et ILT2 mais ils ne produisent pas d'IFN- γ ou de TNF- α en réponse aux phosphoantigènes. A la différence des T_{EMH} qui peuvent être générés *in vitro* en grande quantité grâce aux phosphoantigènes et l'IL-2, la génération de T_{EMRA} serait indépendante des phosphoantigènes (Angelini et al., 2004).

1.3. Les cellules Natural Killer

Le schéma de maturation des lymphocytes T ne peut pas être transposé aux cellules NK. Les cellules NK du sang périphérique existent sous la forme de deux sous-populations principales que l'on distingue phénotypiquement sur la base des marqueurs CD56 et CD16. Ce sont les cellules NK CD56^{bright} CD16^{dim/-} et CD56^{dim} CD16⁺ (**Figure 5**)

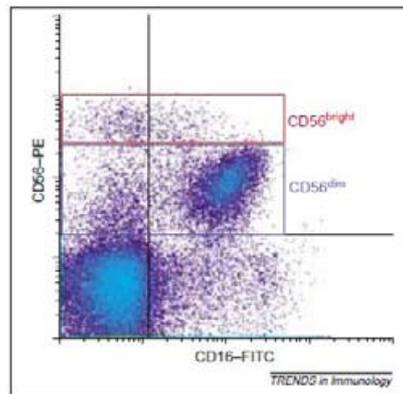


Figure 5 Sous-populations des cellules NK du sang périphérique (Cooper et al., 2001).

Environ 90% des cellules NK du sang périphérique sont de phénotype CD56^{dim} CD16⁺ Ces deux populations se distinguent aussi par l'expression opposée des différents récepteurs activateurs et inhibiteurs (**Figure 6**).

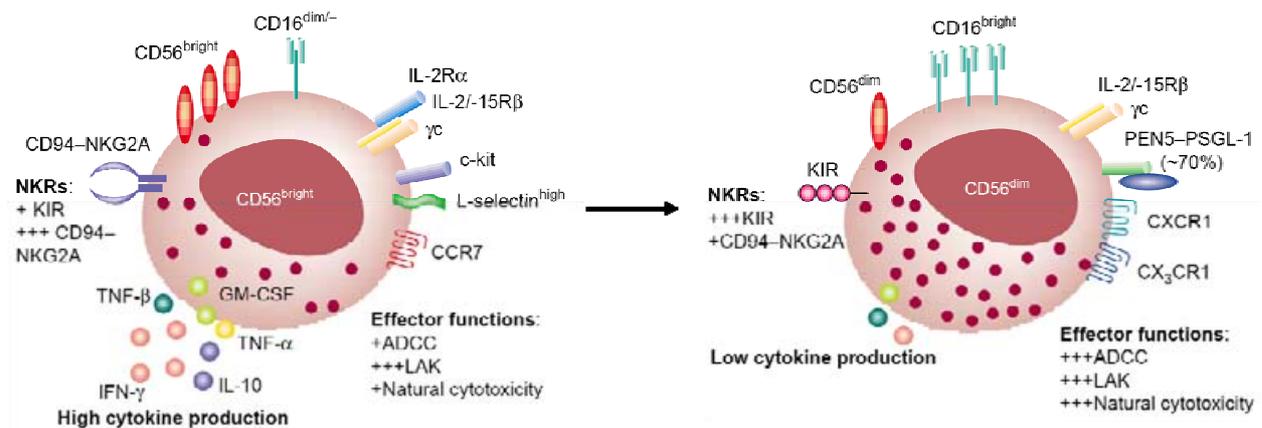


Figure 6 Phénotype des cellules NK CD56^{dim} et CD56^{bright} (Cooper et al., 2001).

Les cellules NK CD56^{dim} expriment fortement le CD16, les KIR mais faiblement le CD94/NKG2A. Elles possèdent donc une forte activité d'ADCC mais produisent de faibles quantités de cytokines. A l'inverse, les cellules NK CD56^{bright} expriment faiblement le CD16 et les KIR mais fortement l'hétérodimère inhibiteur CD94/NKG2A. *In vitro*, ces cellules correspondent à la population qui prolifère le plus en réponse à de faibles concentrations d'IL-2 car elles expriment le récepteur de forte affinité à l'IL-2 (CD25). Elles possèdent une plus faible activité cytolytique que les NK CD56^{dim} mais produisent beaucoup plus de cytokines comme l'IFN-γ en réponse à un stimulus cytokinique combinant l'IL-12 et IL-18 (Fehniger et al., 1999).

En accord avec le groupe de Caligiuri, les précurseurs des cellules NK quittent la moelle osseuse, transitent par le sang périphérique et rejoignent les ganglions lymphatiques où ils se différencient en CD56^{bright} sous l'influence de cytokines, telles l'IL-2 ou l'IL-15, produites par les cellules stromales et les cellules dendritiques (Freud et al., 2005).

La nature précise des relations entre les cellules NK CD56^{bright} et CD56^{dim} fait encore débat. Les cellules NK CD56^{bright} sont-elles des précurseurs des cellules NK CD56^{dim} ou ces deux populations n'ont-elles aucune relation directe entre-elles ? En faveur de la première hypothèse, il a été proposé que les propriétés phénotypiques et fonctionnelles des deux sous-populations définissent plutôt les cellules NK CD56^{bright} comme des précurseurs immatures et les CD56^{dim} des cellules en maturation terminale. La maturation serait caractérisée par la diminution de l'expression du CD56, l'acquisition du CD16 et des KIR. Cependant, comme les cellules NK CD56^{bright} possèdent un répertoire très différent de molécules d'adhésions et de récepteurs aux chimiokines menant à des propriétés de migration différentes, le concept de deux populations en différenciation terminale est concevable. Plusieurs études récentes ont

finalement montré de façon convaincante que les cellules NK CD56^{bright} seraient vraisemblablement des précurseurs des CD56^{dim}. En effet, les cellules NK CD56^{dim} possèdent des télomères plus courts que les cellules CD56^{bright} du sang périphérique. Ces dernières seraient donc moins matures que les premières (Chan et al., 2007; Poli et al., 2009; Romagnani et al., 2007).

2. Reconnaissance de la cible tumorale

2.1. Les cellules Natural Killer : intégration d'une multitude de signaux

L'activation des cellules NK, résulte de l'intégration d'un grand nombre de signaux délivrés par la multitude de récepteurs activateurs et inhibiteurs qu'elles possèdent (**Figure 7**).

2.1.1. L'hypothèse du « missing-self »

Les cellules NK comme les autres membres du système de l'immunité innée ont été dans un premier temps considérées comme reconnaissant de façon non spécifique les tumeurs ou les cellules infectées par des virus. Or, en 1985, Ljunggren et Kärre se rendirent compte que les cibles sensibles à la lyse des cellules NK étaient résistantes à celle des lymphocytes T et vice versa (Karre et al., 1986). Le dénominateur commun de ces cibles était l'expression des molécules du CMH-I : les cellules tuées par les cellules NK n'exprimaient pas les molécules du CMH-I. Avec ces résultats ils écrivirent un « brief report » puis une étude de suivi avec plus de détails mécanistiques démontrant le rôle des cellules NK dans le rejet de variants tumoraux déficients dans l'expression du CMH-I, *in vivo* (Ljunggren and Karre, 1985). Cependant, pour la petite histoire, le jeu des processus éditoriaux fit que cette étude de suivi fut publiée avant le « brief report » (Karre, 2008).

Les molécules du CMH-I constituent ainsi un signal inhibiteur pour les cellules NK. C'est l'hypothèse du « missing-self ».

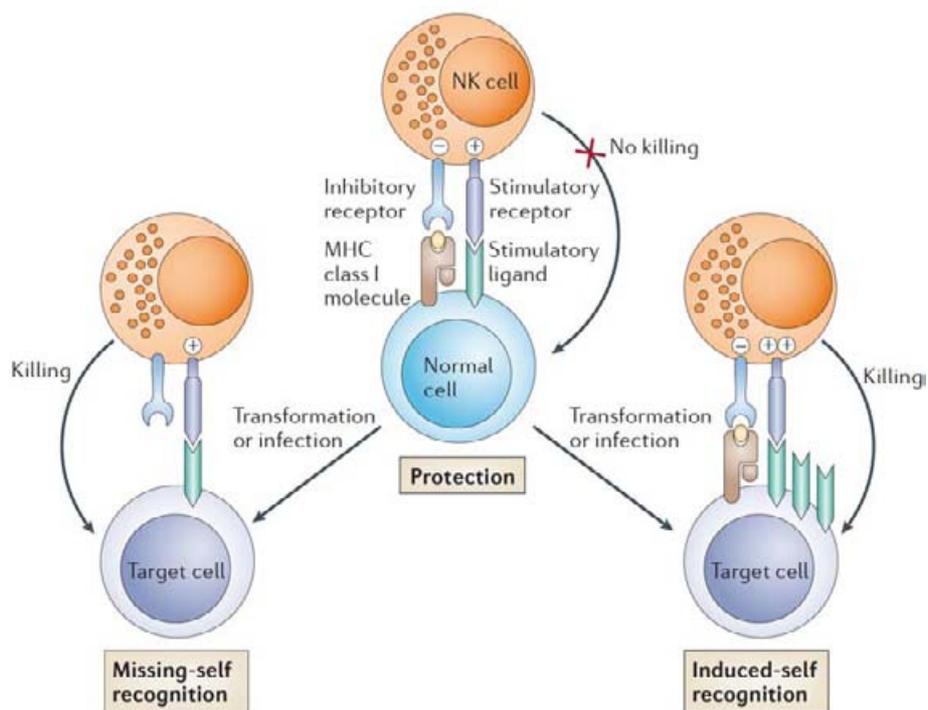


Figure 7 Intégration des signaux inhibiteurs et activateurs des cellules NK (Raulet and Vance, 2006).

Les principaux récepteurs inhibiteurs impliqués dans le mécanisme du « missing-self » appartiennent à la famille des KIR (Killer Immunoglobulin like Receptors). Les KIR sont codés par une famille de gènes très diversifiée qui rivalise avec celle des molécules du HLA. De plus, la diversité d'expression phénotypique des KIR est plus importante que celle du HLA (**Figure 8**). Chaque cellule NK mature et fonctionnelle exprime au moins un KIR inhibiteur ayant pour ligand une molécule du CMH-I du soi ou à défaut exprime l'hétérodimère inhibiteur CD94/NG2A qui sera détaillé ci-après.

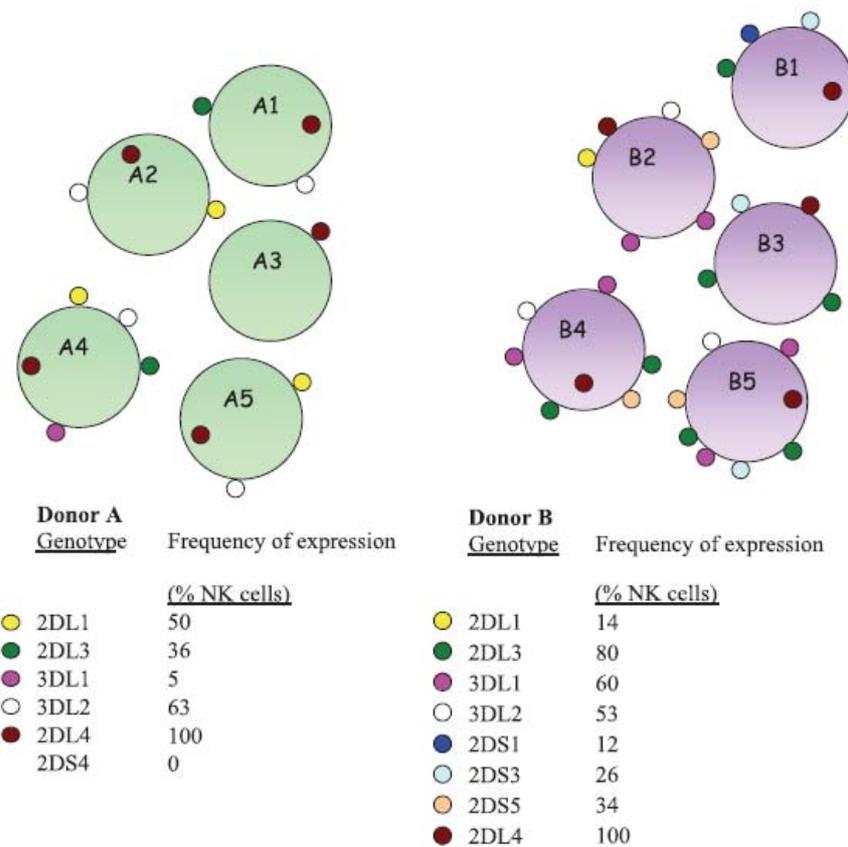


Figure 8 Diversité combinatoire de l'expression des KIR (Gardiner, 2008).

Le génotype des KIR d'un donneur à l'autre est variable. Pour un même donneur chaque cellule NK peut exprimer des combinaisons différentes de KIR et le niveau d'expression de chaque KIR est également variable d'une cellule à l'autre mais aussi sur la même cellule.

2.1.2. Acquisition d'un permis de tuer ou « licensing » des cellules NK

D'après l'hypothèse du « missing-self », il devrait y avoir une grande auto-réactivité des cellules NK chez des souris déficientes pour l'expression du CMH-I. Or, les cellules NK de ces souris, bien que présentes en nombre normal avec une distribution tissulaire normale et un niveau normal d'expression de récepteurs activateurs, ne lysent que très faiblement des cibles CMH-I négatives (Kim et al., 2005). De façon similaire, les cellules NK ne sont pas non plus spontanément auto-réactives chez des patients ayant une déficience de la beta-2-microglobuline ou des transporteurs associés à l'apprêtement des antigènes (TAP) requis pour l'expression normale des molécules du CMH-I. Les hypothèses pour expliquer la tolérance des cellules NK vis-à-vis des cellules du soi, se sont focalisées sur le rôle des récepteurs inhibiteurs en termes de réponses effectrices. Cependant, elles étaient incapables d'expliquer

le fait que les cellules NK ne soient pas auto-réactives chez les hôtes déficient pour le CMH-I. Ces cellules particulières n'expriment ni les récepteurs KIR inhibiteurs, ni le récepteur inhibiteur CD94/NKG2A qui ont pour ligands les molécules du CMH-I classique (Anfossi et al., 2006). Il existe donc une nécessité d'une reconnaissance du CMH-I du soi pour permettre de sélectionner les cellules NK ayant au moins un KIR inhibiteur pour une molécule de CMH-I et qui obtiendront leur permis de tuer sans craindre une auto-réactivité (Joncker et al., 2009; Yokoyama and Kim, 2006). Actuellement le débat porte sur la manière dont cette sélection s'opère, c'est-à-dire : est-ce une sélection positive (reconnaissance = armement) ou négative (reconnaissance = désarmement) ? **(Figure 9)**

La sélection positive implique que les cellules NK interagissent avec une cellule exprimant le CMH-I pour obtenir leur licence et ainsi qu'un signal inhibiteur des KIR constitue un signal positif pour obtenir la licence. Le modèle inverse propose que le signal inhibiteur envoyé par les KIR doive s'opposer aux signaux activateurs reçus afin que la cellule NK obtienne sa licence. En absence de signal inhibiteur, le récepteur activateur forcerait la cellule NK à devenir (ou à rester) sans permis de tuer.

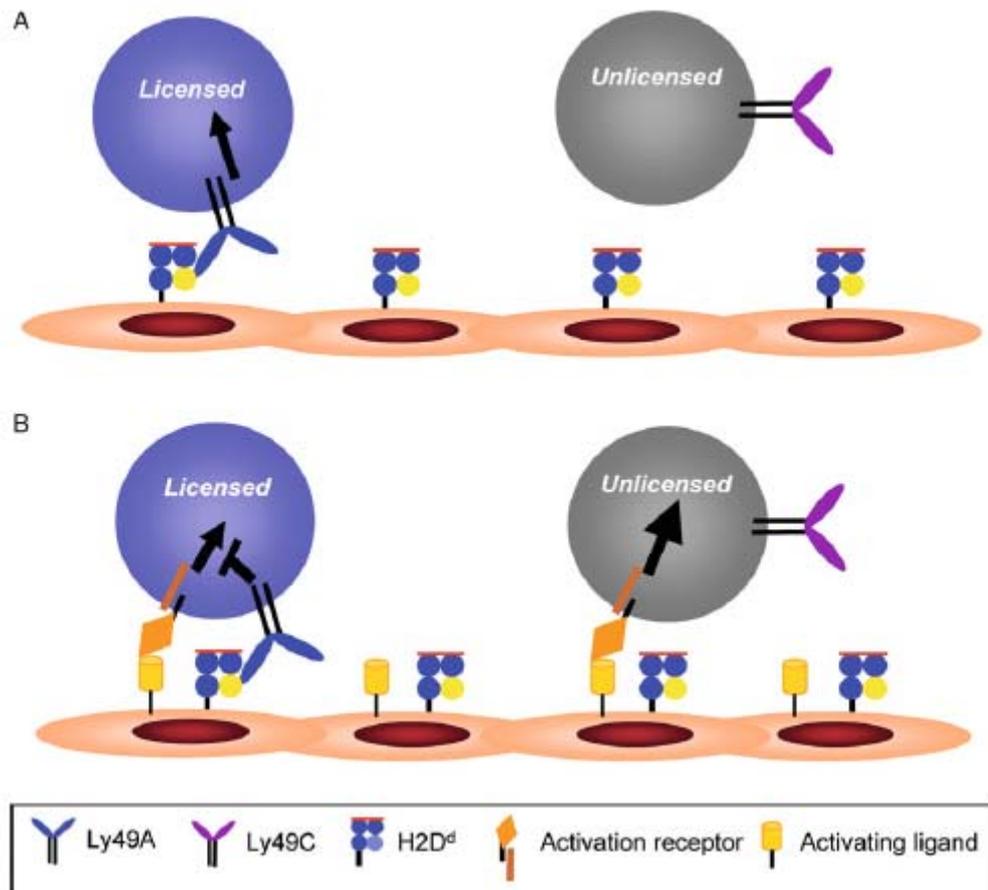


Figure 9 Modèles du licensing des cellules NK, (Jonsson and Yokoyama, 2009).
 A) sélection positive B) sélection négative

2.1.3. Les principaux récepteurs inhibiteurs

2.1.3.1. Les KIR inhibiteurs

La nomenclature de ces récepteurs est basée sur le nombre de domaines (D) extracellulaires de type immunoglobuline (2D ou 3D) suivi de la lettre L (Long) signifiant qu'ils possèdent une longue queue cytoplasmique. Cette queue cytoplasmique contient de un à deux domaines ITIM (Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibitory Motif) recrutant les phosphatases SHP1, SHP2 (**Figure 10**)

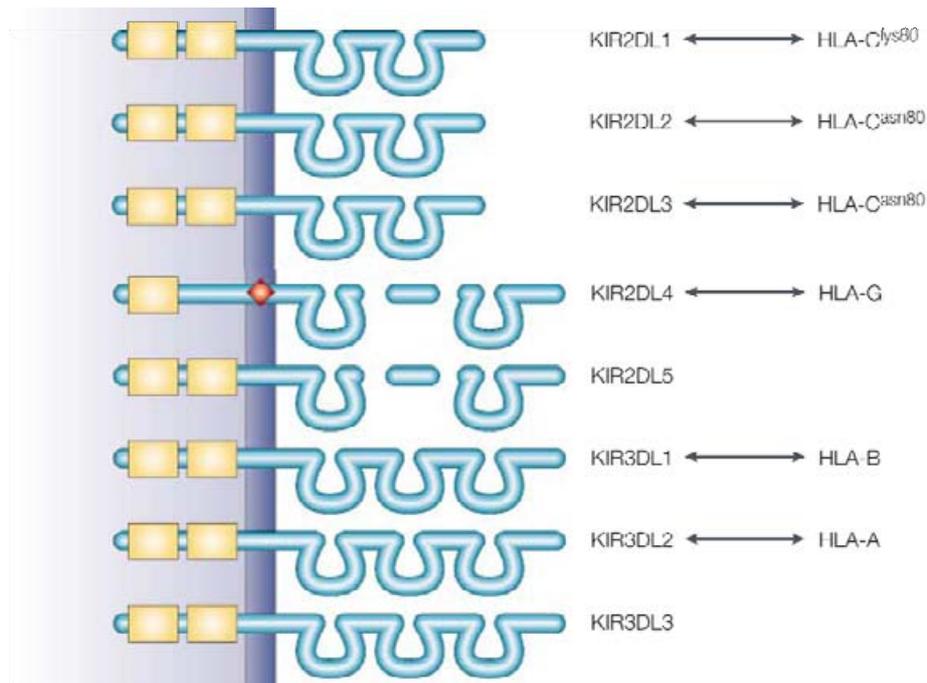


Figure 10 Les KIR inhibiteurs. Adapté de (Parham and McQueen, 2003).

La reconnaissance des molécules du CMH-I par les KIR inhibiteurs est dégénérée et permet ainsi de regrouper les molécules du CMH-I en fonction de motifs reconnus par un type de KIR.

Trois des cinq KIR inhibiteurs contenant deux domaines de type immunoglobuline (KIR2D) distinguent un polymorphisme présent sur les molécules HLA-C. Le groupe HLA-C1 qui possède une sérine en position 77 et une asparagine en position 80 regroupe les allèles HLA-Cw1, -Cw3, -Cw7 et -Cw8 et le groupe HLA-C2 qui possède une asparagine en position 77 et une lysine en position 80 et regroupe les allèles HLA-Cw2, -Cw4, -Cw5 et -Cw6. Le KIR2DL1 reconnaît les allèles du groupe HLA-C2 alors que les KIR2DL2 et KIR2DL3 reconnaissent les allèles du groupe HLA-C1. Le KIR3DL1, reconnaît un groupe d'allèles de type -Bw4 possédant un épitope présent sur une même région de certaines molécules HLA-B et HLA-A.

La diversité d'expression des KIR est mise en place au cours du développement des cellules NK et cette expression apparaît ensuite fixée chez l'individu. Le pourcentage et le niveau d'expression d'un récepteur donné reste stable chez l'individu au fil du temps (Shilling et al., 2002).

2.1.3.2. Le récepteur CD94/NKG2A

CD94 est une lectine de type-C qui constitue la sous-unité invariante de plusieurs récepteurs hétérodimériques. Elle peut ainsi s'associer à NKG2A qui possède un long domaine cytoplasmique avec des domaines ITIM, faisant de CD94/NKG2A un récepteur inhibiteur. Le ligand de cet hétérodimère est la molécule du CMH-I non classique HLA-E. HLA-E est le reflet de l'expression des molécules du CMH-I classique car elle n'est exprimée à la surface des cellules que si elle présente le peptide signal des molécules HLA-A, B ou C. Ainsi, si l'expression du CMH-I est diminuée celle d'HLA-E le sera aussi (Braud et al., 1998).

L'expression du récepteur CD94/NKG2A peut être régulée par des cytokines comme l'IL-15 qui favorise son expression (Mingari et al., 1997).

2.1.3.3. Le récepteur ILT2

HLA-G est une molécule du CMH-I non classique qui tire sa différence d'un faible polymorphisme allélique, de l'existence de sept isoformes provenant d'épissages alternatifs (quatre formes membranaires et trois formes solubles) et d'une expression tissulaire restreinte aux cellules du trophoblaste. HLA-G peut aussi être exprimée de façon anormale par divers types de cancers comme les carcinomes ovariens, les mélanomes et des cancers hématologiques (Menier et al., 2010). HLA-G est notamment reconnue par le récepteur ILT-2 qui fait partie de la famille des LIR (Leukocyte Immunoglobulin-like receptor) et est exprimé à la surface de certaines cellules NK. ILT-2 possède des domaines ITIM qui une fois phosphorylés recrutent là encore les phosphatases SHP. L'expression d'HLA-G par les cellules du trophoblaste comme de diverses tumeurs leur confère une protection vis-à-vis de la lyse NK (Favier et al., 2010).

2.1.4. Les principaux récepteurs activateurs

Les cellules NK ne s'activent pas uniquement par l'absence de signaux inhibiteurs, elles ont aussi besoin de signaux activateurs. Les cellules NK possèdent une grande variété de récepteurs activateurs qui, mis à part le récepteur CD16, ne peuvent pas individuellement entraîner l'activation de cellules NK fraîchement isolées (Bryceson et al., 2006). L'étude individuelle du rôle des différents récepteurs présents à la surface des cellules NK est réalisée

par le test de « lyse redirigée » (**Figure 11**). Ce test est en quelque sorte un mécanisme d'ADCC inversé. Pour cela on utilise les cellules d'un mastocytome murin, appelées P815, comme cible. Elles expriment de nombreux récepteurs aux fragments Fc des IgG murines, ce qui permet de les recouvrir d'anticorps dirigés contre un seul des récepteurs présents à la surface des cellules NK et ainsi de créer une agrégation de ce récepteur ainsi qu'un pont entre la cible et l'effecteur.

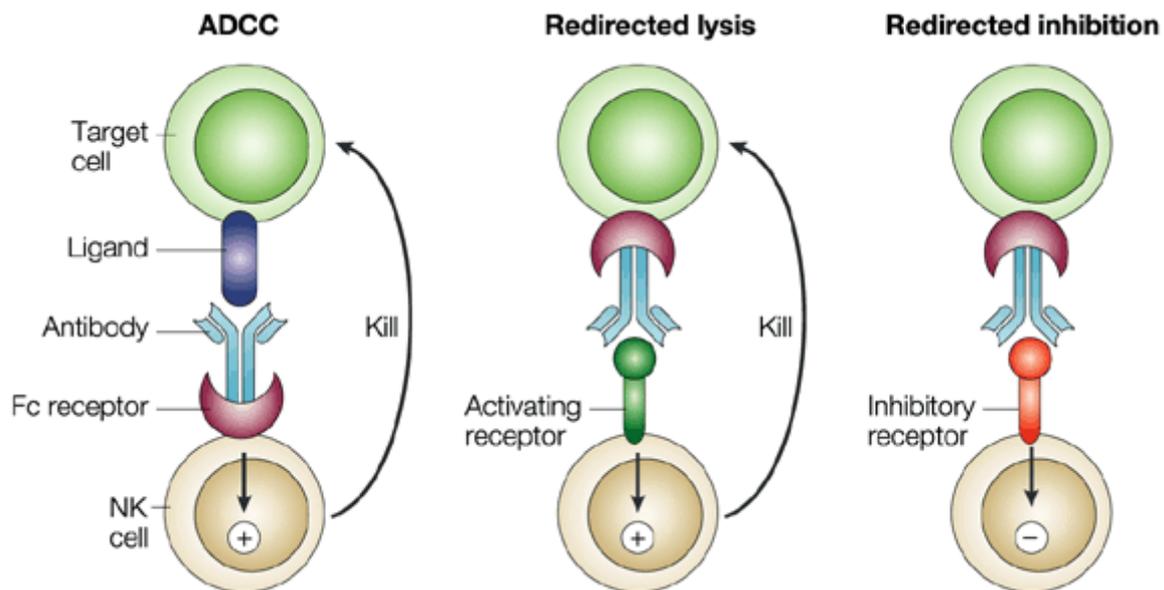


Figure 11 Principe de la lyse redirigée (Yokoyama and Plougastel, 2003).

2.1.4.1. Les NCR : NKp30, NKp44 et NKp46

Les NCR (Natural Cytotoxicity Receptor) sont des récepteurs importants impliqués dans la lyse de différentes cibles. NKp30 (Pende et al., 1999) et NKp46 (Sivori et al., 1997) sont exprimés sur la plupart des cellules NK au repos. Leurs structures sont différentes mais ils s'associent tous deux aux protéines adaptatrices CD3- ζ et Fc ϵ RI- γ qui transmettent le signal (**Figure 12**). Leur densité à la surface des cellules NK corrèle avec l'intensité de leur activité cytolytique (Sivori et al., 1999). L'expression des NCR est restreinte aux cellules NK. NKp46 est le seul NCR qui soit exprimé par les cellules NK murines. Ainsi, NKp46 serait un marqueur plus précis des cellules NK que le CD56 puisque ce dernier n'est pas exprimé chez la souris (Walzer et al., 2007).

NKp44 n'est exprimé qu'à la surface des cellules NK activées par l'IL-2 (Vitale et al., 1998). Bien que structurellement proche de NKp30, ce récepteur s'associe à une autre molécule adaptatrice KARAP/DAP12.

Ligands

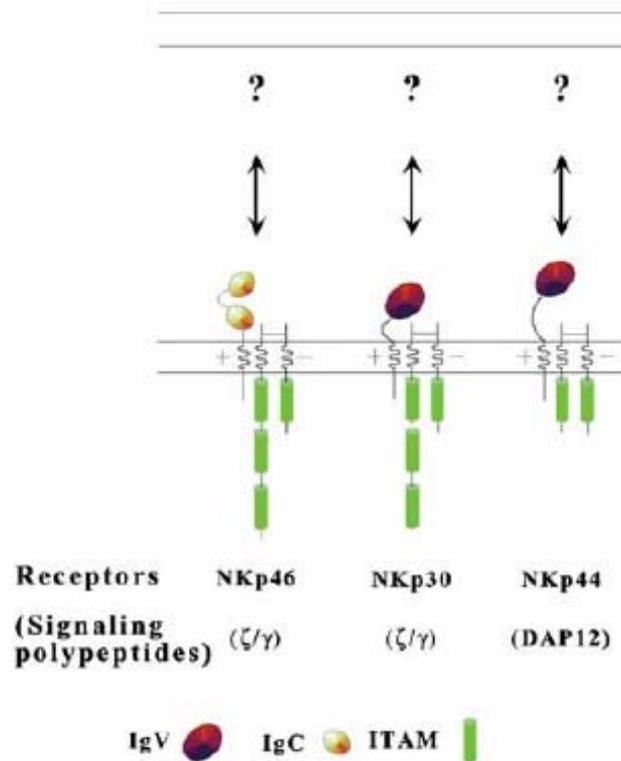


Figure 12 Structure des NCR (NKp30, 44 et 46) (Moretta and Moretta, 2004).

En dépit de l'importance de ces récepteurs, leurs ligands à la surface de cellules transformées ou infectées sont encore inconnus. Il a cependant été démontré que NKp44 et NKp46 pouvait interagir avec des hémagglutinines virales induisant l'activation cytolytique des cellules NK humaines (Arnon et al., 2004; Mandelboim et al., 2001).

2.1.4.2. Le CD16 (FcγRIIIA)

Il fait partie de la famille des récepteurs au fragment Fc des immunoglobulines d'isotype G (IgG). Il est celui qui possède le moins d'affinité pour le fragment Fc des IgG. Le CD16 fait le lien entre la spécificité de reconnaissance des anticorps généré par l'immunité

adaptative et les puissantes fonctions effectrices de l'immunité innée. C'est le mécanisme d'ADCC (Nimmerjahn and Ravetch, 2008).

2.1.4.3. Les KIR activateurs

Les KIR activateurs se différencient des KIR inhibiteurs par une courte queue cytoplasmique (nomenclature S = Short) ne possédant pas de motifs de signalisation et par une partie transmembranaire contenant un acide aminé chargé positivement impliqué dans l'association avec les protéines adaptatrices portant des motifs ITAM (Immunoreceptor Tyrosine-based Activatory Motif) (Biassoni et al., 1996) (**Figure 13**). Comme les KIR inhibiteurs, ils reconnaissent aussi des molécules du CMH-I classique mais avec une affinité dix fois inférieure (Biassoni et al., 1997; Stewart et al., 2005).

Il faut noter l'exception du KIR2DL4 qui peut délivrer un signal inhibiteur grâce à sa longue queue intracellulaire possédant un ITIM et un signal activateur par le recrutement de KARAP/DAP12 possédant des ITAM (Faure and Long, 2002). Son ligand est HLA-G (Rajagopalan et al., 2006).

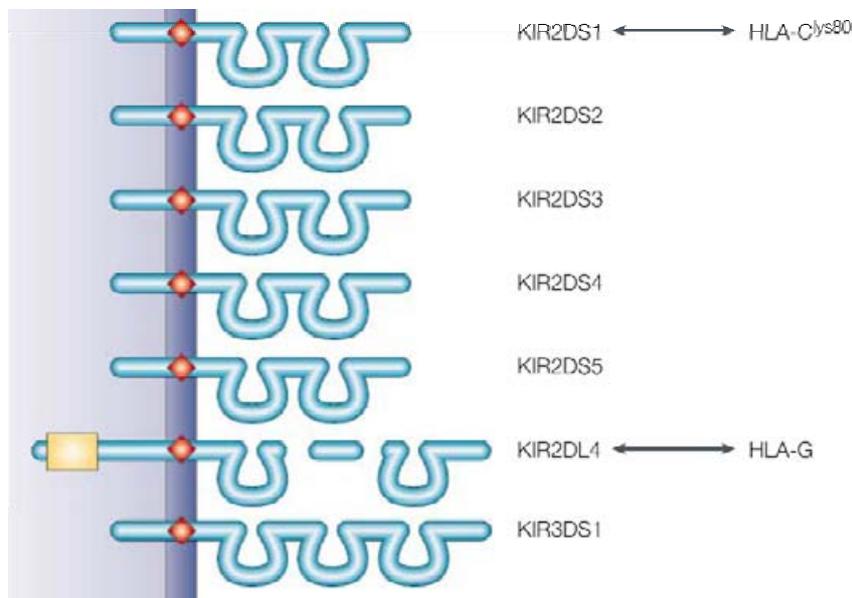


Figure 13 Les KIR activateurs. Adapté de (Parham and McQueen, 2003).

La transduction des signaux activateurs envoyés par ces différents récepteurs est réalisée par la phosphorylation de domaines ITAM des protéines adaptatrices DAP12, CD3- ζ et Fc ϵ RI- γ catalysée par les kinases de la famille des Src (Lck, Fyn, Src, Yes, Lyn et Frg) (Lanier,

2008). Après phosphorylation, les ITAM recrutent les tyrosines kinases Syk et Zap-70 par leur domaine SH2. Ensuite de nombreuses protéines adaptatrices seront recrutées et déclencheront la réorganisation de l'actine nécessaire à la polarisation cellulaire et la libération des granules cytotoxiques ainsi que la transcription de nombreux gènes codant pour des cytokines et des chimiokines.

2.1.4.4. Le récepteur NKG2D

NKG2D contrairement aux autres membres de la même famille ne se complexe pas avec CD94 mais forme un homodimère. Il est associé aux protéines adaptatrices DAP10 chargées de véhiculer un signal activateur. DAP10 possède un domaine YINM qui une fois phosphorylé recrute soit la sous-unité p85 de la PI3K soit l'adaptateur Grb2 (Raulet, 2003). L'utilisation d'un inhibiteur des Src abroge complètement le signal induit par le récepteur NKG2D suggérant un rôle des kinases de la famille Src dans la phosphorylation de DAP10 (Billadeau et al., 2003).

Les ligands de NKG2D sont bien connus, il s'agit des protéines MICA et MICB (MHC class I chain related protein-A, -B) et des ULBP-1, 2, -3 et -4 (UL16-binding protein). MICA et B ont une structure proche des molécules du CMH-I mais ne sont pas associés à la beta-2-microglobuline et ils ne présentent pas non-plus de peptides (**Figure 14**). Les ULBP sont nommés ainsi en référence à la glycoprotéine UL-16 du HCMV qui s'y lie.

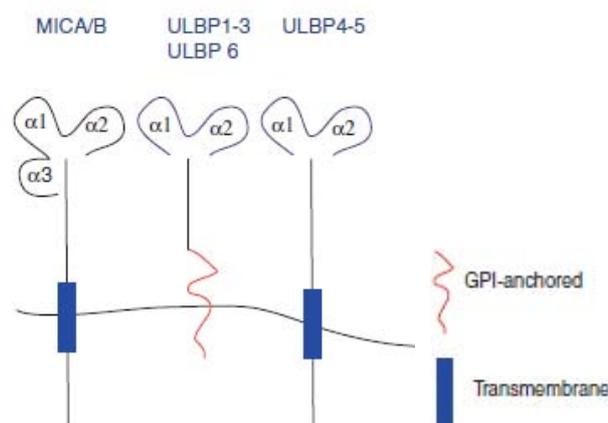


Figure 14 Les ligands humains du récepteur NKG2D. Adapté de (Champsaur et al., 2010).

Ces ligands sont faiblement exprimés à la surface des cellules normales mais leur expression apparaît dans des conditions de stress comme lors d'une infection ou d'un processus de transformation tumorale et sont des signaux importants pour le système de défense anti-tumoral (Bauer et al., 1999). Cependant, l'expression soutenue de ligands de NKG2D peut conduire à la perte d'expression de NKG2D sur les cellules immunitaires engagées et ainsi réduire leur cytotoxicité naturelle (Oppenheim et al., 2005; Raulet and Guerra, 2009). Ces ligands peuvent aussi, suite à un clivage protéolytique (Salih et al., 2002), être libérés dans le milieu extracellulaire et participer à l'échappement tumoral en diminuant l'expression de NKG2D à la surface des cellules NK et des LT CD8⁺ (Clayton et al., 2008; Groh et al., 2002). L'expression de NKG2D est aussi régulée par diverses cytokines. Une étude démontre que le TGF- β retrouvé à un taux élevé dans le plasma de patients atteints de cancer du poumon et colorectaux est à l'origine de la diminution d'expression de NKG2D à la surface des cellules NK et de la faible capacité cytolytique de ces cellules (Lee et al., 2004a). Au contraire, l'IL-15 induit la surexpression de NKG2D sur les cellules NK et est associé à une augmentation de leur activité cytolytique anti-tumorale (Boyiadzis et al., 2008).

2.1.5. Récepteurs additionnels

Les cellules NK possèdent de nombreux autres récepteurs (Moretta et al., 2001) comme :

- le récepteur CD160 (BY55) dont l'interaction avec HLA-C permettrait de déclencher une activité cytotoxique des cellules NK (Le Bouteiller et al., 2002).
- l'hétérodimère CD94/NKG2C qui interagit avec HLA-E (Braud et al., 1998) et s'associe aux protéines adaptatrices KARAP/DAP12 pour fournir un signal activateur (Cantoni et al., 1998).
- le récepteur NKp80 dont l'engagement par son ligand AICL (Activation-Induced C-type Lectin) peut induire une mobilisation du Ca²⁺ intracellulaire, une cytotoxicité et la synthèse de médiateurs pro-inflammatoires (Vitale et al., 2001; Welte et al., 2006).
- le récepteur 2B4, dont le principal ligand décrit chez l'Homme est le CD48, possède un domaine ITSM (Immunoreceptor Tyrosine-based Switch Motif) qui est capable de recruter SAP pour envoyer un signal activateur ou bien EAT2 pour envoyer un signal inhibiteur (Lanier, 2008).

- le récepteur DNAM-1 dont les ligands sont le CD155 (PVR ou PolioVirus Receptor) et le CD112 (Nectin-2, une molécule d'adhésion intercellulaire) et est impliqué dans l'activation de la cytotoxicité des cellules NK contre des cibles tumorales (Pende et al., 2005a)
- le récepteur NTB-A, forme des interactions homophiliques, et peut stimuler l'activité cytotoxique (Cao et al., 2006). Il possède lui aussi un domaine ITSM.

2.2. Les CTL et les lymphocytes T V γ 9V δ 2 : une activation forte par un couple récepteur-ligand

Contrairement aux cellules NK de l'immunité innée, les lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques et les lymphocytes T V γ 9V δ 2 sont principalement activés par l'engagement spécifique d'un récepteur et de son ligand.

2.2.1. Les CTL et l'interaction CMH-peptide-TCR

La reconnaissance d'une cible tumorale par les CTL est dépendante d'une reconnaissance antigénique qui est le cœur de la réponse spécifique. Cette reconnaissance est rendue possible par l'interaction spécifique du TCR avec un complexe CMH-peptide exprimé par une cellule présentatrice d'antigène (Rudolph et al., 2006). Lors de la réponse secondaire, ce signal est le principal stimulus activateur délivré aux CTL car l'engagement du CD28 n'est pas nécessaire dans ce contexte pour réactiver le lymphocyte T CD8⁺ et enclencher la réponse cytolytique. Ce signal TCR s'intègre cependant dans un schéma plus général correspondant à la formation d'une synapse immunologique qui intègre de nombreux signaux, comme l'expression de molécules d'adhésion, capables de moduler de façon positive ou négative cette activation. Le détail de la formation de cette synapse ne sera pas détaillé dans ce manuscrit (Fooksman et al., 2010).

Expression de récepteurs NK par les lymphocytes T CD8⁺

D'autres récepteurs sont aussi exprimés par les CTL et peuvent moduler leur activité. Chez la souris, l'expression du récepteur NKG2D est restreinte aux LT CD8⁺ activés et aux LT CD8⁺ présentant un phénotype mémoire (Raulet, 2003). En revanche, chez l'Homme, ce récepteur est présent sur quasiment la totalité des LT CD8⁺ indépendamment de leur état d'activation ou de maturation. L'infection par le cytomégalovirus (CMV) de cellules

épithéliales humaines qui induit l'expression des ligands de NKG2D, les MIC, augmente la réponse cytotoxique de LT CD8⁺CD28⁻ spécifiques d'antigènes du CMV. Ainsi, l'activation induite par l'engagement de NKG2D agit en synergie avec celle induite par le signal TCR et favorise d'une part la réponse cytolytique des LT CD8⁺CD28⁻ et d'autre part leur capacité de production de cytokines comme l'IFN- γ , le TNF- α ou l'IL-2. NKG2D fonctionne donc comme un corécepteur des LT CD8⁺ effecteurs (Groh et al., 2001). L'expression de ce récepteur peut être régulée par des cytokines. En effet, des tissus stressés ou inflammés, comme l'épithélium intestinal dans la maladie de coeliaque, sécrètent de manière incontrôlé de l'IL-15 augmentant l'expression de NKG2D sur les lymphocytes T CD8⁺ intra-épithéliaux et contribuant ainsi au développement de cette maladie autoimmune en activant les lymphocytes autoréactifs (Roberts et al., 2001).

Les LT CD8⁺ KIR⁺ ont un phénotype similaire à celui d'un phénotype mémoire avec un TCR réarrangé. L'expression des KIR sur les cellules T a lieu après que les segments de gène codant les deux chaînes du TCR aient été réarrangés (Vely et al., 2001). Ces cellules ont une activité cytotoxique contre des cellules cibles exprimant peu de CMH-I, comme la lignée K562 (Ferrini et al., 1994).

Les LT CD8⁺ILT2⁺ représente une petite fraction des LT CD8⁺. Elles possèdent un phénotype effecteur et/ou mémoire. L'engagement d'ILT2 à la surface de clones T CD8⁺ entraîne une inhibition de leur cytotoxicité contre des lignées tumorales transfectées par un super-antigène (Colonna et al., 1997).

Les LT CD8⁺CD94/NKG2A⁺ possèdent un phénotype activé ou mémoire (Braud et al., 2003; Mingari et al., 1995). De même que pour les KIR, l'induction de l'expression de CD94/NKG2A sur les cellules T est un événement postérieur à la sélection thymique de ces cellules et nécessite une stimulation par le TCR (Jabri et al., 2002). L'expression de CD94/NKG2A sur des cellules T en culture est facilement inductible par l'IL-15 (Mingari et al., 1998), l'IL-12 (Derre et al., 2002) ou le TGF- β (Bertone et al., 1999).

Les LT CD8⁺CD16⁺ sont présents en très faible proportion parmi les LT CD8⁺, ils ont un phénotype d'effecteurs mémoire, expriment de la perforine et sont capables de faire de l'ADCC *ex-vivo* et apparaissent *in vitro* dans les cultures de CTL spécifiques de l'EBV (Clemenceau et al., 2008).

2.2.2. Les lymphocytes T V γ 9V δ 2 : rôle des phosphoantigènes

Les lymphocytes T V γ 9V δ 2 ont la particularité de reconnaître des antigènes non-peptidiques qui ne sont ni apprêtés ni présentés sur les molécules du CMH par les cellules présentatrices d'antigènes (Poupot and Fournie, 2004). En 1994, Constant et collaborateurs (Constant et al., 1994) découvrent que des composés (TUBag 1-4) issus d'extraits mycobactériens sont capables d'activer les lymphocytes T V γ 9V δ 2. Les structures biochimiques de certains de ces antigènes ont été caractérisées (Belmant et al., 1999; Constant et al., 1994; Poquet et al., 1996). Ces composés possèdent en commun une partie pyrophosphate. D'autres études ont ensuite pu démontrer que des composés comme l'IPP (Isopentenyl PyroPhosphate), le DMAPP (Diméthyl Allyl PyroPhosphate) (Tanaka et al., 1995) et le HDMAPP (pyrophosphate de 4 hydroxy-3-diméthylallyl) (Hintz et al., 2001) produits par des bactéries stimulent aussi sélectivement les lymphocytes T V γ 9V δ 2. Ces antigènes non-peptidiques, pyrophosphatés sont appelés phosphoantigènes (**Figure 15**).

Phosphoantigen		Concentrations activating 50% of maximal $\gamma\delta$ cellresponse (μM)
Ribose-1PP		3000
Ethyl-PP		50
Isopentenyl PP		3
Dimethylallyl PP		1
Epoxide PP		0.05
Bromohydrin PP (Phosphostim™)		0.015
Iodohydrin PP		0.001
(E)-Hydroxydimethylallyl PP		0.0002

Figure 15 Les phosphoantigènes et leurs bioactivités sur les LT $\gamma\delta$. Adapté de (Belmant, 2006).

Des phosphoantigènes de synthèse ont été par la suite développés dont le BrHPP (Bromo-Hydrin PyroPhosphate) qui est, jusqu'à aujourd'hui, le plus puissant publié. (Espinosa et al., 2001).

Plusieurs évidences suggèrent l'implication du TCR $V\gamma9V\delta2$ dans la reconnaissance des phosphoantigènes mais l'interaction directe n'a pas encore été clairement établie par cristallographie aux rayons X (Allison et al., 2001).

Les lymphocytes T $V\gamma9V\delta2$ sont capables de tuer différentes cellules tumorales humaines comme la lignée Daudi, un lymphome de Burkitt (Fisch et al., 1990). Les composés stimulants les lymphocytes T $V\gamma9V\delta2$ et isolés à partir des cellules tumorales humaines sont

l'IPP et le DMAPP. Ces composés proviennent de la voie de biosynthèse du cholestérol chez les mammifères appelée voie du mévalonate (Gober et al., 2003). Ces phosphoantigènes naturels sont ceux qui possèdent la bio activité la plus forte et qui permettent de faire le lien entre la reconnaissance d'agents infectieux et de cellules tumorales par les lymphocytes T $V\gamma 9V\delta 2$. La voie de synthèse de ces composés est détaillée dans la (**Figure 16**). Les archaebactéries et la majeure partie des eucaryotes synthétisent l'IPP à partir d'acéto-acétyl-CoA par la voie du mévalonate alors que les cyanobactéries et la plupart des eubactéries, des algues et des plastides le synthétisent à partir d'hydrates de carbone par la voie de Rohmer.

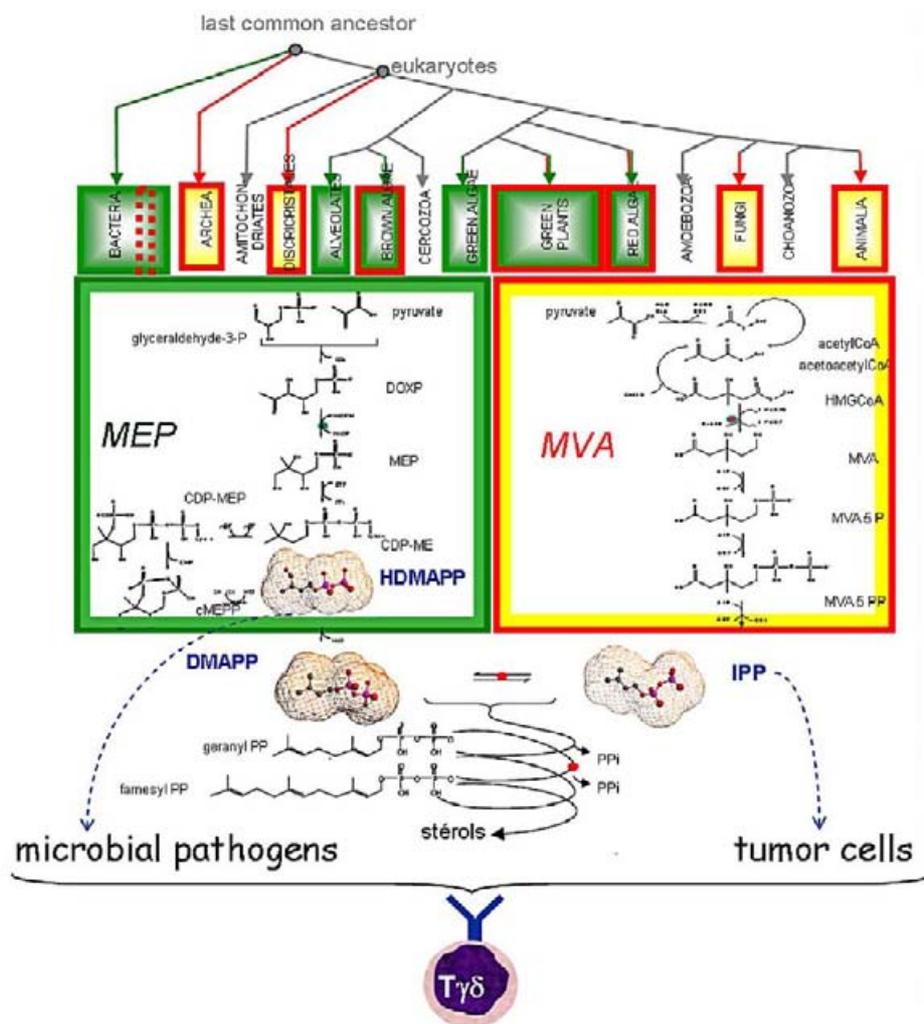


Figure 16 Voies de biosynthèse des phosphoantigènes, (Bonneville and Fournie, 2005).

Les organismes utilisant la voie de Rohmer (cadrant gauche) sont représentés dans des boites vertes. Les organismes utilisant la voie du mévalonate (cadrant de droite) sont représentés dans des boites jaunes.

Les aminobisphosphonates thérapeutiques comme le pamidronate ou le zolédronate qui bloquent la voie du MVA après la biosynthèse de l'IPP ou du DMAPP, induisent une accumulation de ces composés dans les cellules traitées et ont donc la capacité d'activer les lymphocytes T V γ 9V δ 2 aussi bien *in vitro* que *in vivo* (Gober et al., 2003; Kunzmann et al., 1999). A l'inverse, les inhibiteurs en amont de la voie du mévalonate tels que les statines empêchent l'activation et la prolifération des lymphocytes T V γ 9V δ 2 *in vitro* induite par les bisphosphonates (Thompson and Rogers, 2004).

Au vu de la forte fréquence des lymphocytes T V γ 9V δ 2 parmi les lymphocytes T $\gamma\delta$, de leur grande réactivité vis-à-vis de petits composés non-peptidiques conservés dans l'évolution et disponibles aux conditions de grade GMP (Good Manufacturing Production), des essais cliniques sont en cours de réalisation ou ont déjà été développés (Viey et al., 2005; Wilhelm et al., 2003).

Expression de récepteurs NK par les lymphocytes T V γ 9V δ 2

Le récepteur NKG2D est exprimé par la grande majorité des cellules T V γ 9V δ 2, le NKG2D, potentialise l'activation des fonctions cytotoxiques de ces lymphocytes contre des cibles tumorales (Rincon-Orozco et al., 2005) ou infectées, notamment par l'engagement de MICA, un ligand de stress (Das et al., 2001).

Parmi les autres récepteurs activateurs, le CD16 peut aussi être exprimé par lymphocytes T V γ 9V δ 2 (Angelini et al., 2004). La cytotoxicité des lymphocytes T V γ 9V δ 2 CD16⁺ en présence de Rituximab contre des cellules de lymphome CD20⁺ ou en présence de Trastuzumab contre des cellules de cancer du sein HER2⁺, est plus élevée qu'en absence de ces anticorps monoclonaux thérapeutiques. De plus, cet effet est restreint aux cellules T V γ 9V δ 2 CD16⁺ (Tokuyama et al., 2008). Le phosphoantigène de synthèse BrHPP augmente la bioactivité de l'anticorps thérapeutique Rituximab et favorise l'activité ADCC des lymphocytes T V γ 9V δ 2 contre des cellules de lymphomes CD20⁺ ciblées par cet anticorps (Gertner-Dardenne et al., 2009).

Les récepteurs inhibiteurs ILT2, CD94/NKG2A et KIR, reconnaissant les molécules du CMH-I, peuvent être exprimés à la surface des lymphocytes T V γ 9V δ 2. L'absence de CMH-I ou leur masquage par des anticorps monoclonaux rétablit une forte activité cytotoxique des T V γ 9V δ 2 envers des cibles tumorales, suggérant que ces récepteurs inhibiteurs participent

efficacement à la discrimination entre les cellules normales et les cellules cancéreuses (Halary et al., 1997; Thedrez et al., 2007; Trichet et al., 2006)

La plupart des récepteurs activateurs et inhibiteurs sont exprimés par des lymphocytes T V γ 9V δ 2 ayant été activés par des phosphoantigènes et qui se sont différenciés en cellules effectrices mémoires de type RA (T_{EMRA}, CD27⁻, CD62L⁻, CD45RA⁺) (Angelini et al., 2004; Lafont et al., 2001)

Les lymphocytes T $\gamma\delta$ et notamment les lymphocytes V γ 9V δ 2 T_{EMRA}, par l'expression de différents récepteurs activateurs et inhibiteurs, sont capables d'intégrer de nombreux signaux en plus du puissant signal délivré par les phosphoantigènes.

3. Induction de la mort des cellules tumorales par les effecteurs lymphoïdes cytotoxiques

Les effecteurs lymphoïdes cytotoxiques peuvent détruire leurs cibles soit en libérant le contenu de leurs granules cytolytiques soit en engageant des récepteurs de mort.

3.1. Mort induite par exocytose des granules cytotoxiques

Les CTL, les cellules NK, notamment les CD56^{dim}, et les lymphocytes T V γ 9V δ 2, notamment T_{EMRA}, sont les populations qui produisent le plus de granules cytotoxiques. Ces granules renferment principalement deux protéines perturbatrices de membranes, la perforine et la granulysine ainsi qu'une famille des protéases appelées granzymes (Lieberman, 2003). Suite à la reconnaissance de leurs cibles, les effecteurs réorganisent leurs cytosquelettes et leurs protéines membranaires conduisant à la formation d'une synapse immunologique permettant l'exocytose dirigée des granules cytotoxiques (**Figure 17**)

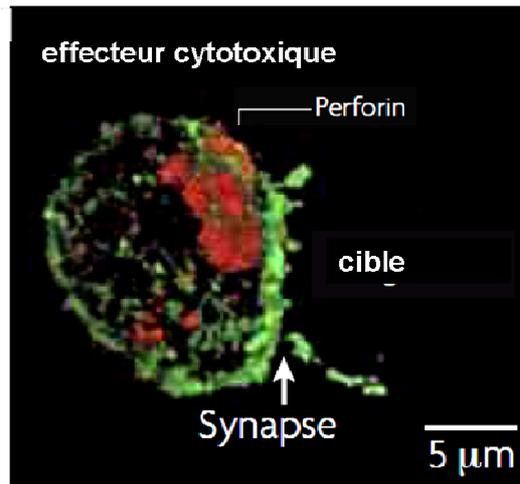


Figure 17 Polarisation des granules cytotoxiques à la synapse immunologique. Adapté de (Orange, 2008).

L'induction de la mort par les granules cytotoxiques est un processus très rapide, quelques minutes, car les effecteurs cytotoxiques possèdent des granules préformés prêts à être libérés dès qu'une cellule est prise pour cible.

3.1.1. Les granzymes

L'Homme possède cinq types de **granzymes** (A, B, H, K et M) qui ont des spécificités de clivage peptidique différentes (**Figure 18**).

Table 1 Granzymes		
Protease	Peptide cleavage-site specificity	Species
Granzyme A	Arg/Lys	Mouse, rat, human
Granzyme B	Asp/Glu	Mouse, rat, human
Granzyme C	Asn/Ser	Mouse, rat
Granzyme D	Phe/Leu	Mouse
Granzyme E	Phe/Leu	Mouse
Granzyme F	Phe/Leu	Mouse, rat
Granzyme G	Phe/Leu	Mouse
Granzyme H	Phe	Human
Granzyme J	Unknown	Rat
Granzyme K	Arg/Lys	Mouse, rat, human
Granzyme M	Met/Leu	Mouse, rat, human

Figure 18 Spécificité de clivage des différentes granzymes (Barry and Bleackley, 2002).

Les granzymes A et B sont les plus abondants chez la souris et l'humain et ont été largement étudiés, en particulier le granzyme B car il active l'apoptose dépendante des caspases et de manière similaire aux caspases il clive après un résidu acide aspartique. Il peut ainsi activer directement la voie des caspases en clivant la pro-caspase3 en caspase 3 (Darmon et al., 1995), mais aussi activer indirectement cette voie en participant à la désorganisation de la membrane mitochondriale en clivant Bid (Barry et al., 2000) (**Figure 19**).

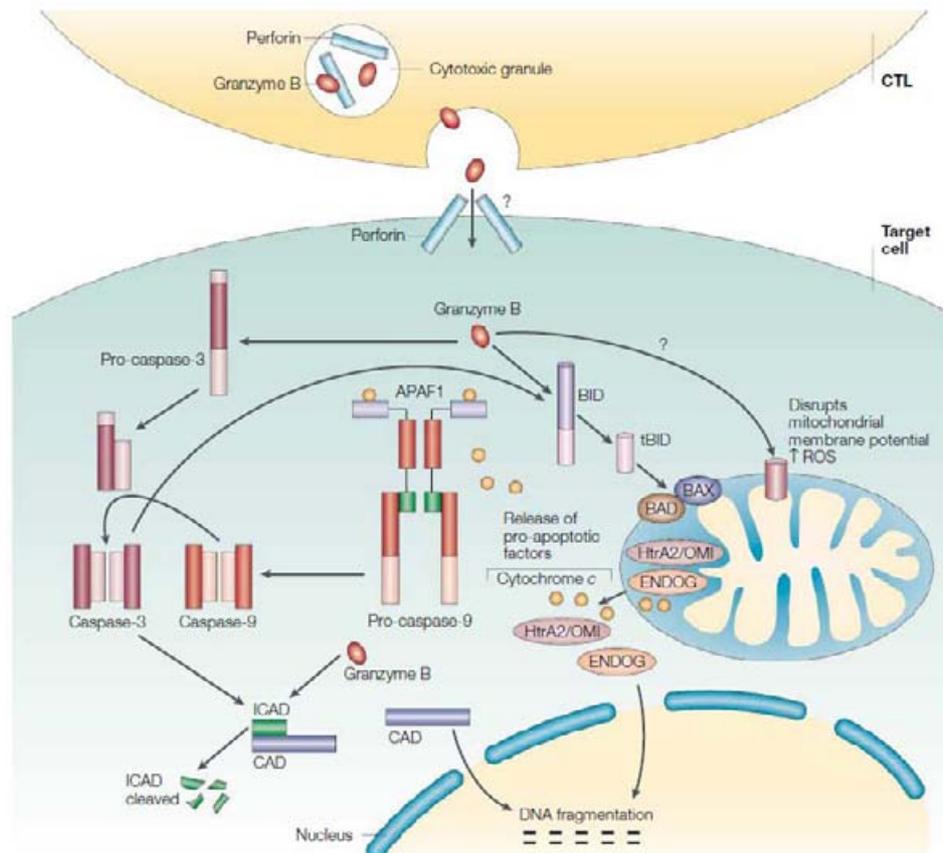


Figure 19 Modes d'action du granzyme B (Lieberman, 2003).

Le mécanisme d'action du granzyme A contrairement à celui du granzyme B est complètement indépendant des caspases (Beresford et al., 1999). Le granzyme A cible un complexe associé au réticulum endoplasmique : le complexe SET. Ce complexe est normalement impliqué dans la réparation des dommages à l'ADN créés par le stress oxydatif, comme lors de la désorganisation de la membrane mitochondriale. Le granzyme A désorganise ce complexe et ne permet donc pas la réparation de l'ADN (Fan et al., 2003).

Chez l'humain, une étude comparative de l'expression des granzymes par cytométrie en flux et western Blot, démontre que le granzyme M est principalement retrouvée dans les granules

cytotoxiques des cellules NK et des lymphocytes T V γ 9V δ 2 (Sayers et al., 2001). De façon surprenante, le granzyme M induit une nouvelle forme de mort cellulaire de lignées tumorales dépendante de la perforine mais indépendante des caspases et d'une désorganisation de la membrane mitochondriale ainsi qu'une absence visible de fragmentation de l'ADN (Kelly et al., 2004).

Comme le démontrent les expériences réalisées sur des souris déficientes pour les différents granzymes, leur rôle n'apparaît pas primordial dans la défense anti-tumorale contrairement aux souris déficientes pour la perforine. De plus, individuellement, ils n'engendrent pas de défaut majeur lors d'infections comme celle par le cytomégalovirus murin (**Figure 20**).

Genotype	Phenotype	Effect on apoptosis	Gene function
Perforin deficient	Susceptibility to, and failed clearance of many viruses and other intracellular pathogens; develop spontaneous B-cell lymphoma with age; high susceptibility to carcinogen-induced neoplasia	Lack all granule-mediated cell death	Tumour surveillance and viral defence
Granzyme A deficient	Susceptibility to ectromelia; minor susceptibility to HSV and MCMV	None	Defence against poxviruses and some herpesviruses
Granzyme B deficient*	Susceptibility to ectromelia; reduced GVHD when T cells used as donor; minor susceptibility to HSV and MCMV	Delayed DNA fragmentation	Defence against poxviruses and some herpesviruses
Granzyme A and granzyme B deficient*	Severe susceptibility to ectromelia; susceptibility to MCMV	Delayed DNA fragmentation	Both granzymes are essential for defence against ectromelia and some herpesviruses
Granzyme M deficient	Minor susceptibility to MCMV	None	Not defined

Figure 20 Comparaison de la susceptibilité aux infections et au développement tumoral des souris perforine et granzyme KO. Adapté de (Voskoboinik et al., 2006).

3.1.2. La granulysine

La granulysine est présente dans les granules cytotoxiques des CTL, des cellules NK et des lymphocytes T V γ 9V δ 2. La granulysine possède des homologies avec i) les amoebapores contenus dans les granules de *Entamoeba histolytica* qui sont capables de former des pores dans les membranes lipidiques bactériennes et ii) les SAPLIP (SAPosin-Like Protein), impliquées dans l'hydrolyse des lipides (Anderson et al., 2003). Ainsi, la granulysine est capable de se fixer directement à la membrane lipidique des bactéries et d'y induire de très nombreuses lésions (Stenger et al., 1998). La granulysine contenue dans les granules des CTL et des lymphocytes T V γ 9V δ 2 est également impliquée dans la défense

contre les bactéries intracellulaires, telles que les mycobactéries (Dieli et al., 2001; Stenger et al., 1998). En revanche, pour tuer ces bactéries intracellulaires, la granulysine a besoin de la présence de perforine.

Bien que la granulysine puisse aussi induire l'apoptose de cellules cibles (Gamen et al., 1998) son action anti-infectieuse directe reste la plus importante.

3.1.3. La perforine

Les souris KO pour la perforine ont un compartiment lymphoïde normal si elles sont gardées dans un environnement sans aucun pathogène. En revanche, en conditions d'infection, l'absence de perforine conduit à une dérégulation de la prolifération clonale des lymphocytes T CD8⁺ et ainsi à une susceptibilité accrue à l'infection. L'absence de perforine conduit aussi à l'augmentation du développement de lymphomes induits ou spontanés (Smyth et al., 2000b).

La perforine était vue, au départ, comme une simple molécule induisant la mort en désorganisant ou en créant des pores dans la membrane plasmique des cellules cibles. Cependant, la perforine seule ne rend pas compte de toutes les caractéristiques associées à la lyse induite par les effecteurs lymphoïdes cytotoxiques et les pores créés dans la membrane faciliteraient l'entrée des granzymes dans la cellule cible. Dans les granules cytotoxiques, les granzymes sont séquestrés par des protéoglycanes comme la serglycine et forment ainsi des complexes multimériques qui une fois sécrétés seraient trop grands pour passer au travers des pores de perforine. Il a ainsi été mis en évidence que les granzymes pouvaient entrer dans les cellules en absence de perforine (Metkar et al., 2002). En revanche, la perforine jouerait un rôle important pour libérer les granzymes, contenus dans des vésicules d'endocytose, dans le cytoplasme de la cellule cible (Pinkoski et al., 1998). Enfin, il a été montré plus récemment que le récepteur au mannose-6-phosphate permet la fixation et l'internalisation du granzyme B mais qu'un second agent comme la perforine ou un adénovirus est nécessaire pour libérer cette granzyme dans le cytoplasme (Motyka et al., 2000) (**Figure 21**).

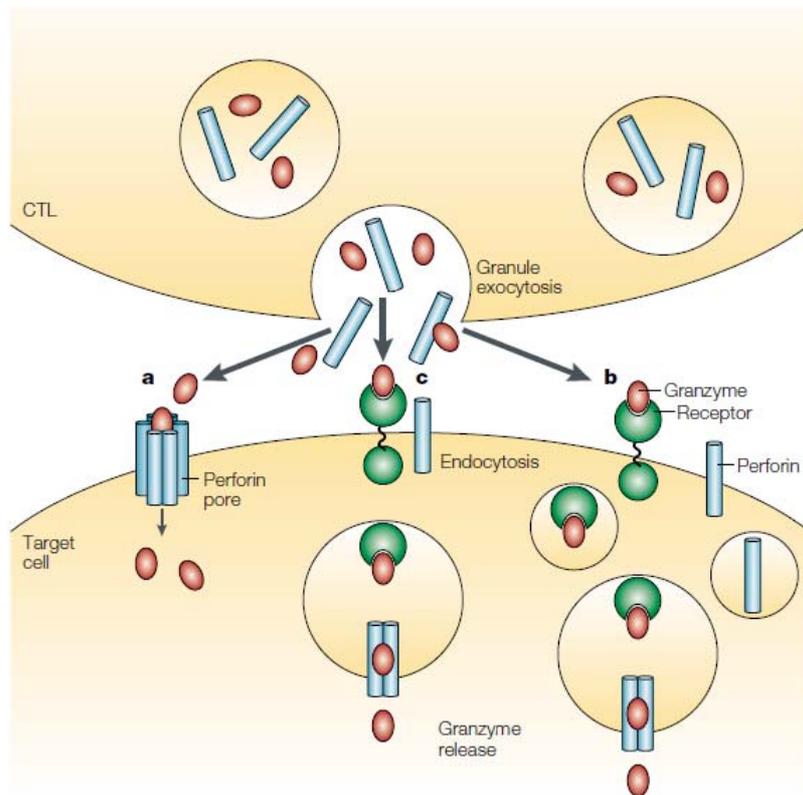


Figure 21 Voies d'entrée du granzyme B (Barry and Bleackley, 2002).

a) Voie d'entrée par des pores de perforine, b) Voie d'entrée par fixation sur un récepteur, puis endocytose et libération par la perforine dans le milieu intracellulaire c) voie d'entrée par fixation directe du granzyme à la membrane et endocytose facilitée par les dommages créés par la perforine.

3.2. Mort induite par engagement des récepteurs de mort

Plusieurs couples ligand-récepteur de la superfamille du TNF sont impliqués dans l'apoptose : Fas/FasL (CD95/CD95L), Apo2L/TRAIL et TNFRI/TNF.

La signalisation classique induite par les couples Fas/FasL et TRAIL/TRAIL ligand est similaire car ils utilisent la même protéine adaptatrice de départ FADD (Fas Associated protein with Death Domain) conduisant à l'assemblage du complexe DISC et à l'activation de la voie des caspases.

La signalisation classique induite par le couple TNFRI/TNF utilise la protéine adaptatrice TRADD qui conduit à l'activation de NF- κ B et à la transcription de nombreux gènes dont ceux correspondant à des cytokines pro-inflammatoires et des facteurs anti-apoptotiques.

Cependant une voie alternative par l'intermédiaire de laquelle TRADD peut s'associer à FADD conduit alors à l'activation des caspases et à l'apoptose (Krammer, 2000; Wilson et al., 2009).

Ces différents récepteurs de mort ne sont pas exprimés de façon constitutive par les cellules. Ainsi, dans un premier temps, l'engagement du TCR induit la dégranulation rapide des molécules cytotoxiques. Puis, dans un second temps, c'est-à-dire une à deux heures plus tard, l'expression de FasL est induite à la surface de la cellule effectrice. Sa liaison avec le récepteur Fas, exprimé par les cellules tumorales ou infectées, va activer la voie des caspases dans ces dernières puis leur mort. De façon analogue l'expression d'Apo2L est induite, à la surface des cellules NK activées, par différentes cytokines telles que l'IL-2, l'IL-7, l'IL-15 ou les IFN de type I et II (Smyth et al., 2005). Dans un modèle de fibrosarcome murin induit par le méthylcholanthrène, l'administration d'anticorps monoclonaux neutralisants dirigés contre le récepteur TRAIL favorise le développement tumoral. L'effet protecteur de TRAIL est dans ce modèle en partie dépendant des cellules NK et totalement dépendant de l'IFN- γ . En effet, les souris sauvages traitées avec de l'anti-TRAIL développent autant de tumeurs que les souris IFN- $\gamma^{-/-}$ et le traitement des souris IFN- $\gamma^{-/-}$ par l'anti-TRAIL ne potentialise pas le développement tumoral. De plus, l'ajout d'IFN- γ à des souris sauvages traitées avec de l'anti-TRAIL favorise le développement tumoral (Takeda et al., 2002).

4. Principales cytokines produites par les effecteurs lymphoïdes cytotoxiques

Suite à leur activation, les CTL, les lymphocytes T V γ 9V δ 2 et les cellules NK produisent de nombreuses cytokines dont l'IFN- γ et le TNF- α . L'IFN- γ est connu pour favoriser la maturation des cellules dendritiques immatures (Walzer et al., 2005) et la mise en place d'une réponse adaptative de type Th1 (Mocikat et al., 2003). L'IFN- γ produit par les CTL et lymphocytes T V γ 9V δ 2 est également essentiel pour prévenir le développement tumoral (Shankaran et al., 2001) et la maturation des cellules dendritiques (Devilder et al., 2006). Les cellules dendritiques activées par l'IFN- γ vont produire de l'IL-12 qui en retour va favoriser la production d'IFN- γ par les effecteurs cytotoxiques créant ainsi une boucle d'amplification. (Casanova and Abel, 2004).

Le TNF- α participe lui aussi à la maturation des cellules dendritiques (Vitale et al., 2005) et à l'induction de l'apoptose en engageant le récepteur de mort (TNFR) décrite dans la partie précédente.

5. Evidences d'un contrôle immunitaire des cancers hématologiques et immunothérapies

5.1. Mise en évidence par les thérapies

L'expérience clinique des greffes allogéniques de cellules souches hématopoïétiques met en évidence l'existence de fortes réponses immunitaires exercées par les lymphocytes T et les cellules NK alloréactives contre les leucémies et les lymphomes : c'est la réaction du greffon contre la leucémie (GvL). Bien que l'effet GvL soit principalement attribuable à une allo-réponse contre des antigènes du soi du receveur, cela fournit un modèle réaliste de la manière dont les cellules T et les cellules NK reconnaissent et détruisent les cellules cancéreuses hématopoïétiques.

L'effet GvL peut être masqué par l'effet délétère de la réaction du greffon contre l'hôte (GvHD) qui est principalement due aux lymphocytes T allogéniques reconnaissant les molécules du HLA du receveur. Pour limiter cet effet, de nombreuses transplantations de moelle osseuse allogéniques sont appauvries en lymphocytes T mais la contrepartie est un risque accru de rejet de greffe et donc de rechute (Horowitz et al., 1990).

Le rôle des cellules NK dans la transplantation allogénique a été montré dans les études de Ruggeri et collaborateurs chez des patients atteints de leucémies aiguës myéloïdes. Ils démontrent que seuls les patients dont les cellules n'expriment pas de molécules du CMH-I capables d'inhiber l'action cytotoxique des cellules NK du donneur ont un avantage de survie (Ruggeri et al., 2002; Ruggeri et al., 2007).

Plusieurs études ont également pu mettre en évidence le rôle de la reconstitution des lymphocytes chez des patients atteints de divers cancers hématologiques. Ainsi, dans les leucémies aiguës myéloïdes, le nombre absolu de lymphocytes est un facteur de meilleure survie sans rechute que se soit après une transplantation autologue (Porrata et al., 2002b) ou allogénique (Powles et al., 1998) de cellules souches hématopoïétiques ou que se soit après la

chimiothérapie d'induction (Behl et al., 2006; De Angulo et al., 2008). De façon similaire, le nombre absolu de lymphocytes est un facteur de meilleure survie :

- après une transplantation autologue chez les patients atteints de myélome multiple (Porrata et al., 2001), de lymphome de Hodgkin (Porrata et al., 2002a) ou de lymphome non-hodgkinien (Porrata et al., 2008).
- après une transplantation allogénique chez les patients atteints de leucémie myéloïde chronique (Savani et al., 2006) ou de leucémie aiguë lymphoïde (Savani et al., 2007b).
- après une chimiothérapie d'induction chez les patients atteints de leucémie aiguë lymphoïde (De Angulo et al., 2008).

Après une transplantation allogénique, la reconstitution rapide du nombre de cellules NK est ainsi associée à un plus faible taux de rechute et une meilleure survie (Savani et al., 2007a). Les mécanismes sous-jacents à ces corrélations et la ou les sous-populations lymphoïdes spécifiquement responsables de cet effet restent à déterminer. Ces études sont d'une grande importance car elles pourraient ouvrir la voie à des stratégies thérapeutiques améliorant la fonctionnalité des effecteurs lymphoïdes cytotoxiques pour permettre de minimiser les dommages induits par la chimiothérapie sur le système immunitaire.

Le traitement de cancers hématologiques en rechute après une transplantation allogénique de cellules souches hématopoïétiques reste un défi. La déplétion des lymphocytes T de la greffe, afin de diminuer les risques d'avoir une GvHD sévère, est contrebalancée par un rejet de greffe plus important et des complications infectieuses dues à des agents opportunistes. Ainsi, l'infusion de lymphocytes (DLI) après la transplantation pour faciliter un effet GvL (Bleakley and Riddell, 2004) était une option thérapeutique attractive. Les résultats les plus intéressants avaient été obtenus chez les patients atteints de leucémie myéloïde chronique. Toutefois, la DLI n'a plus d'avenir dans le traitement des Leucémies Myéloïdes Chroniques (LMC) en raison de l'utilisation de l'inhibiteur de tyrosine kinase ciblant Bcr-Abl (Gleevec®) qui est le traitement de référence dans cette pathologie (Deol and Lum, 2010).

Les cellules leucémiques portent une diversité d'antigènes qui peuvent induire une réponse lymphocytaire T spécifique de la leucémie comme WT1 et PR1. Ces antigènes ont pu faire l'objet d'essais cliniques sous forme de vaccination peptidique et démontrer que suite à la vaccination, la fréquence de CTL spécifiques du peptide injecté était augmentée et que cette réponse immunologique pouvait être corrélée à une réponse clinique (Barrett and Rezvani,

2007; Oka et al., 2004; Rezvani et al., 2003). Ces essais de vaccination sont encore préliminaires (phase I ou I/II) et la caractérisation de nouveaux antigènes spécifiques des cancers hématologiques reste un axe de recherche important.

La caractérisation de marqueurs spécifiques des tumeurs est aussi un enjeu très important pour la mise en place de thérapies à base d'anticorps monoclonaux. En effet, le développement d'anticorps monoclonaux a révolutionné le traitement des cancers depuis ces dix dernières années (Capietto et al.). Le meilleur exemple de leur efficacité thérapeutique a été obtenu avec le Rituximab pour le traitement des cellules B CD20⁺ de lymphomes non-hodgkinien (Maloney et al., 1997a; Maloney et al., 1997b; McLaughlin et al., 1998). L'anti-CD52, alemtuzumab (Campath-1H), a aussi prouvé son efficacité dans la leucémie lymphoïde chronique et l'anti-CD33, gemtuzumab-ozogamicin (Ravandi and O'Brien, 2006), pour le traitement de la leucémie aiguë promyélocytaire (Stasi et al., 2008).

Les anticorps monoclonaux ont été dans un premier temps utilisés pour cibler spécifiquement la cellule tumorale et induire directement l'apoptose de la cellule en empêchant le récepteur reconnu de fonctionner correctement. Ils sont également utilisés comme vecteurs pour délivrer des molécules toxiques à la cellule ciblée. Cependant, les anticorps monoclonaux font aussi intervenir d'autres mécanismes pour permettre la destruction de la cellule ciblée : la cytotoxicité dépendante du complément, la phagocytose et la cytotoxicité dépendante des anticorps (ADCC). Ainsi, les stratégies visant à amplifier et/ou à améliorer les fonctions cytotoxiques des cellules NK, principale population exprimant le CD16, mais aussi les LT V γ 9V δ 2 et les LT CD8⁺ sont donc d'une grande importance au regard des résultats obtenus avec les anticorps thérapeutiques (Cartron et al., 2004).

Après une transplantation allogénique de cellules souches chez des patients atteints de leucémies myéloïdes, des lymphocytes T CD8⁺ spécifiques d'antigènes de la leucémie peuvent être détectés mais d'après Beatty et collaborateurs, la plupart ne prolifèrent pas et ne produisent pas d'IFN- γ suite à leur stimulation par leur antigène spécifique (Beatty et al., 2009).

5.2. Mise en évidence directe

Très peu d'études ont caractérisé phénotypiquement et fonctionnellement les effecteurs lymphoïdes cytotoxiques chez les patients atteints de cancers hématologiques. Ainsi, dans les leucémies aiguës myéloïdes, une diminution de l'expression des récepteurs activateurs NKp30 et NKp46 à la surface des cellules NK est observée au diagnostic d'une

partie des patients (16 sur 18 (Costello et al., 2002), 47 sur 71 (Fauriat et al., 2007)). Cette faible expression entraîne une perte d'activité cytolytique envers des cibles autologues et corrèle avec une plus faible survie. Ce phénotype est réversible au cours du traitement car les patients atteignant la rémission complète retrouvent une expression normale de NKp46 et partielle de NKp30. Nguyen et collaborateurs ont mis en évidence qu'après une transplantation hématopoïétique, les cellules NK avaient un phénotype immature avec là encore une perte d'activité cytolytique (Nguyen et al., 2005). Dans les syndromes myélodysplasiques, l'expression des NCR n'est pas modifiée mais les cellules NK ont une fonction cytolytique, une survie et une production cytokinique sévèrement altérées même après stimulation par l'IL-2 (Kiladjian et al., 2006).

II) Le lenalidomide : efficacité clinique et propriétés

Le thalidomide a été synthétisé et commercialisé pour la première fois au milieu des années 1950 par l'entreprise Chemie Grunenthal. Il était utilisé comme sédatif par les femmes enceintes afin de réduire les nausées et les vomissements matinaux. Il est rapidement devenu populaire en Europe, en Australie, en Asie et en Amérique du sud bien qu'il n'ait pas reçu le sésame de la FDA aux Etats-Unis en raison d'inquiétudes sur l'apparition de neuropathies suite à son utilisation sur le long terme. Il a fini par être retiré du marché, dans les années 1960, après la démonstration de ses graves effets secondaires dont des neuropathies et une action tératogène entraînant des malformations congénitales (**Figure 22**).

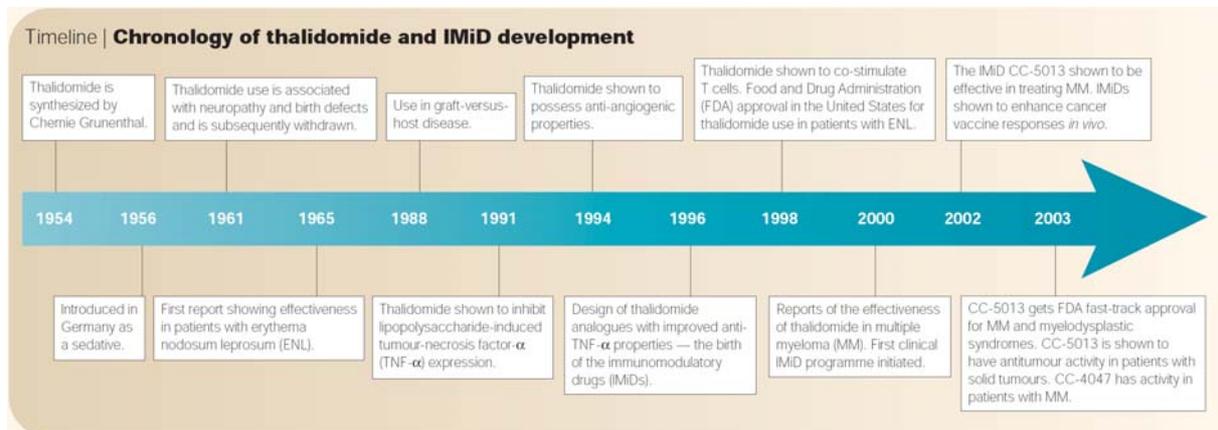


Figure 22 Chronologie du développement du thalidomide et des IMiD® (Bartlett et al., 2004).

Le thalidomide est un dérivé de l'acide glutamique (α -(N-phtalimido)glutarimide) et est composé d'un mélange racémique des énantiomères *R*(-) et *S*(+). Les énantiomères sont des entités chimiques de même formule brute qui se différencient par la configuration absolue opposée du carbone asymétrique. Les composés chimiques existent souvent sous forme d'énantiomères avec généralement une seule forme physiologiquement utile. Le thalidomide n'échappe pas à cette règle : la forme *R*(+) est responsable de l'effet sédatif désiré alors que la forme *S*(-) est responsable des effets tératogènes (**Figure 23**).

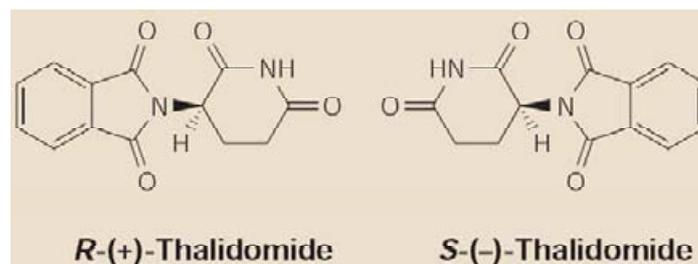


Figure 23 Structures énantiomères du thalidomide (Bartlett et al., 2004).

Malgré ses effets néfastes, le thalidomide continue cependant à être utilisé mais dans un cadre strict et des pathologies précises. Ainsi en 1965, il permet la réduction importante des complications inflammatoires (Erythema Nodosum Leprosy ou ENL) que peuvent développer des patients lépreux. Il ne reçoit l'approbation de la FDA qu'en 1998 après que des études aient trouvé une base immunologique à son effet, c'est-à-dire l'inhibition de la production de TNF- α (Sampaio et al., 1991). Par la suite, le thalidomide est aussi devenu un agent important pour le traitement du myélome multiple après la découverte en 1994 de ses propriétés anti-angiogéniques (D'Amato et al., 1994).

Malgré son efficacité chez les patients ayant un cancer avancé, l'utilisation du thalidomide reste soumise à une surveillance intense. C'est pourquoi, à partir du squelette du thalidomide de nouveaux composés ont été synthétisés afin d'améliorer ses propriétés et surtout d'abolir ses graves effets toxiques. Ces composés, développés il y a une dizaine d'année, sont le lenalidomide, encore appelé CC-5013 ou Revlimid®, ainsi que le pomalidomide (CC-4047 ou Actimid®). Ils sont souvent appelés IMiD® (Immunomodulatory drugs) en référence aux composés de la classe des immunomodulateurs de l'entreprise Celgene qui les a développés (**Figure 24**).

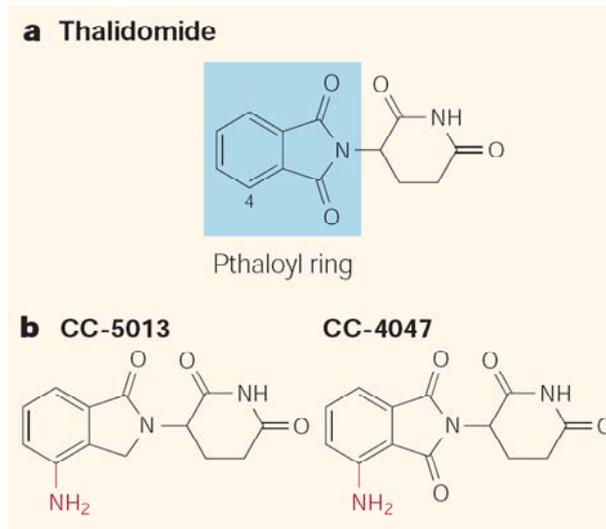


Figure 24 Structure du thalidomide et des IMiD®. Adapté de (Bartlett et al., 2004).

Le développement de ces IMiD® de seconde génération a ainsi permis de renforcer les propriétés du thalidomide mais aussi de mettre en avant de nouvelles propriétés immuno-régulatrices.

Le thalidomide et maintenant le lenalidomide ont aussi été testés, de façon ponctuelle, dans des études où une surproduction de TNF- α est associée à la maladie comme le sarcome de Kaposi lié au SIDA, les maladies rhumatologiques, la maladie de Crohn, la malaria cérébrale, la sclérose en plaque, le psoriasis, la septicémie et la tuberculose. Ils ont aussi été utilisés dans certains cancers solides comme le cancer métastatique du rein, le cancer métastatique de la prostate, le gliome de haut-grade et le mélanome métastatique. Cependant, la plus grande application de ces drogues reste les cancers hématologiques comme le myélome multiple. De ce fait, le lenalidomide continue d'être évalué dans d'autres hémopathies lymphoïdes B mais aussi dans les syndromes myélodysplasiques et les leucémies aiguës myéloïdes (Bartlett et al., 2004).

Les deux premières études de phases I/II, ont déterminé que 25mg/jour de lenalidomide était la dose maximale tolérée par les patients atteints de myélome multiple avancé (Richardson et al., 2002; Zangari M, 2001). Puis, en 2007, deux études de phase III menées chez des patients en rechute ou réfractaires aux précédents traitements, ont établi la supériorité du lenalidomide combiné à de fortes doses de dexaméthasone par rapport au dexaméthasone utilisé seul. Les taux de réponse complète et partielle obtenus étaient de 60,2 et 61% pour le groupe traité au lenalidomide plus dexaméthasone contre 19,9 et 24% pour le groupe traité avec le dexaméthasone seul (Dimopoulos et al., 2007; Meijer and Sonneveld, 2009; Weber et al., 2007)). Ces deux essais de phase III ont permis d'obtenir l'approbation des agences américaines et européennes pour l'utilisation du lenalidomide, en combinaison avec le dexaméthasone, chez les patients atteints de myélome multiple ayant reçu au préalable au moins un traitement différent. Un suivi sur le long terme a été réalisé chez ces patients et confirme la supériorité du lenalidomide combiné au dexaméthasone (Dimopoulos et al., 2009). Plus récemment, l'utilisation du lenalidomide, non combiné à d'autres agents, a été testé chez des patients en rechute ou réfractaires. Parmi les 222 patients étudiés, seulement 26% ont atteints une rémission partielle ou complète (Richardson et al., 2009). Cette étude montre une efficacité très modérée de l'utilisation du lenalidomide seul.

Ainsi, la combinaison du lenalidomide avec le dexaméthasone semble meilleure quel que soit le schéma de traitement, même chez des patients atteints de myélome multiple nouvellement diagnostiqué (Rajkumar et al., 2010).

1.1.2. La leucémie lymphoïde chronique B

La leucémie Lymphoïde Chronique B (LLC) se caractérise par l'accumulation dans les organes lymphoïdes secondaires, le sang et la moelle osseuse, de petits lymphocytes B monoclonaux matures mais immuno-incompétents (Ghia et al., 2007).

Le lenalidomide a été testé dans des essais de phase II, chez des patients atteints de LLC soit en tant que traitement initial soit en tant que traitement suite à une rechute ou à un rejet de la fludarabine et/ou du Rituximab (Chanan-Khan et al., 2006; Ferrajoli et al., 2008). Ces deux études obtiennent un taux de réponse globale de 47% et 32% et des taux de rémission complète de 7 et 9%. Cependant, l'utilisation du lenalidomide même à des doses médianes (10 à 25 mg/jour) entraîne des effets indésirables importants, tel le syndrome de lyse tumorale qui reflète une action très importante de cette drogue dans cette pathologie

(Moutouh-de Parseval et al., 2007). Ferrajoli et collaborateurs suggèrent un effet immunostimulateur du lenalidomide cependant, son mécanisme d'action reste incertain (Ferrajoli et al., 2008). La toxicité du lenalidomide obtenue dans ces études reflète la nécessité de conduire des études supplémentaires afin de déterminer le schéma d'administration optimal (Lin, 2008).

1.1.3. Les lymphomes non-hodgkiniens

Parmi les lymphomes non-hodgkiniens (LNH) on distingue des formes indolentes et des formes agressives. Le lymphome folliculaire est une forme indolente et représente la deuxième entité la plus importante des LNH avec 20 à 25% des nouveaux cas diagnostiqués. Cependant, les stades disséminés de la maladie sont habituellement considérés comme incurables avec les traitements conventionnels (Vitolo et al., 2008). Le lymphome du manteau représentant 6 % de l'ensemble des LNH est une forme « modérément agressive » de lymphome (Brody and Advani, 2006). Enfin, le LNH diffus à grande cellules B est le lymphome le plus fréquent des LNH (30 à 40%) et aussi le plus agressif (Lenz and Staudt, 2010).

Un essai de phase II a utilisé le lenalidomide en monothérapie chez 43 patients atteints de lymphomes non-hodgkiniens indolents (lymphome folliculaire, lymphome lymphocytaire à petits lymphocytes et lymphome à cellules B de la zone marginale) en rechute ou réfractaire aux traitements précédents. Le taux de réponse globale était de 23% dont 7% de rémission complète. Les effets indésirables survenus au cours du traitement comme les neutropénies et les thrombocytopénies, étaient attendus et ont été supprimés (Witzig et al., 2009).

Deux études de phase II ont testé de la même manière le lenalidomide chez des patients atteints de lymphomes non-hodgkiniens agressifs (lymphome diffus à grandes cellules B, lymphome du manteau, lymphome transformé de bas grade et le lymphome folliculaire de grade 3). Les patients étaient également en rechute ou réfractaires aux précédents traitements. La première étude obtient un taux de réponse globale de 53 % (8 sur 15 patients) dont 20% de rémission complète (Habermann et al., 2009). La seconde étude obtient un taux de réponse globale de 35 % (17 sur 49 patients) dont 12% de rémission complète (Wiernik, 2008). Dans ces deux études les effets indésirables de grade 3 et 4 (neutropénie, thrombocytopénie et leucopénie) étaient attendus et ont pu être gérés en réduisant la dose de lenalidomide donnée ou par un traitement discontinu.

Le lenalidomide semble donc avoir une efficacité intéressante dans les lymphomes non-hodgkinien aussi bien agressifs qu'indolents.

1.1.4. La macroglobulinémie de Waldenström et amylose à chaîne légère des immunoglobulines

Ces deux maladies hématologiques représentent une minorité des hémopathies lymphoïdes B, les cellules touchées ressemblent à celles du myélome multiple (plasmocytes). La macroglobulinémie de Waldenström (MGW) est une hémopathie lymphoïde B caractérisée par la présence d'une immunoglobuline M monoclonale (macroglobuline) à un taux élevé et associée à une infiltration lymphoplasmocytaire de la moelle osseuse et éventuellement d'autres organes. L'amylose AL est caractérisée par l'agrégation d'une partie des immunoglobulines, la chaîne légère, sous forme de fibrilles qui se déposent dans les tissus. Au contraire des autres hémopathies, les cellules atteintes dans l'amylose AL n'ont pas tendance à proliférer.

Les traitements utilisés dans le myélome multiple peuvent-être utilisés dans l'amylose AL, mais ces patients les tolèrent généralement moins à cause de nombreux dysfonctionnements de leurs organes dus à la maladie. Deux études de phase II ont évalué l'impact du lenalidomide éventuellement combiné au dexaméthasone chez des patients (Dispenzieri et al., 2007; Santhorawala et al., 2007). Les taux de réponse étaient faibles et la toxicité restait importante conduisant à la réduction des doses administrées (25 à 5 mg/jour). Dans le cas de la macroglobulinémie de Waldenström, une seule étude a utilisé le lenalidomide en combinaison avec le Rituximab. Cette étude clinique chez 16 patients met cependant en évidence l'apparition d'une anémie aiguë chez 13 d'entre eux, attribuable au lenalidomide (Treon et al., 2009). L'efficacité du lenalidomide dans ces deux pathologies apparaît donc limitée notamment par l'apparition d'effets secondaires importants.

1.2. Les syndromes myélodysplasiques

Les syndromes myélodysplasiques (SMD) forment un groupe de maladies clonales touchant principalement les sujets âgés. Les SMD sont caractérisés par une hématopoïèse inefficace qui se manifeste par des anémies, neutropénies et/ou thrombocytopenies contrastant

avec une moelle osseuse riche ou normale. L'évolution naturelle de ces maladies est marquée par la survenue à plus ou moins long terme d'une insuffisance médullaire et/ou d'une transformation en leucémies aiguës myéloïdes (Catenacci and Schiller, 2005).

Les effets du lenalidomide chez les patients atteints de syndromes myélodysplasiques (List, 2009) ont été pour la première fois évalués dans une étude impliquant 43 patients ayant une anémie et nécessitant des transfusions régulières. Tous les patients de cet essai étaient en échec thérapeutique vis-à-vis de traitements stimulant l'érythropoïèse. Après seize semaines de traitement, 56% patients ont eu une réponse érythroïde durable avec une majorité de patients n'ayant plus besoin de transfusions. Cependant, le résultat le plus intéressant est la corrélation positive entre le taux de réponse érythroïde et le caryotype des patients. Ainsi, le meilleur taux de réponse érythroïde a été obtenu chez les patients portant une délétion d'une partie du bras long du chromosome 5 (del(5q)) en comparaison des patients de caryotype normal ou possédant d'autres anomalies chromosomiques (List et al., 2005).

Avec ces études cliniques, le lenalidomide a pu recevoir une approbation de la FDA, en décembre 2005, pour le traitement des patients SMD del(5q) dépendant de transfusions.

A partir des résultats cliniques précédents, de nouveaux essais ont été réalisés. Un essai s'est focalisé chez les patients SMD portant la del(5q) associée ou non à d'autres anomalies cytogénétiques. Le taux de réponse érythroïde était également élevé (76% de 148 patients) et 67% ont eu une indépendance complète aux transfusions. De plus, dans cet essai clinique, il apparaît que les autres anomalies en plus de la del(5q) n'ont pas d'influence sur les résultats obtenus (List et al., 2006a).

Afin de déterminer si l'action du lenalidomide pouvait être étendue, une étude conduite dans des conditions similaires de traitements mais chez des patients SMD ne portant pas la del(5q) a été menée (Raza et al., 2008). Les résultats, prenant en compte 214 patients, montrent que 43% des patients ont eut une réponse érythroïde et 26% une indépendance complète aux transfusions. Ces résultats sont une indication forte quand à la spécificité d'action du lenalidomide chez les patients SMD del(5q).

Les patients del(5q) représentent une faible proportion des patients SMD et environ 25% des patients sans del(5q) bénéficient aussi d'une thérapie par le lenalidomide. Cependant, chez ces patients la réponse hématologique ne peut pas être prédéterminée par les outils de diagnostic actuels. Ainsi, une étude comparative de Ebert et collaborateurs (Ebert et al., 2008a) a analysé, par puce à ADN, l'expression des gènes des cellules obtenues par ponction de moelle osseuse de 16 patients non del(5q) avant leur traitement par le

lenalidomide. Les auteurs ont cherché à déterminer si une corrélation pouvait être faite avec la réponse au traitement. La réponse au traitement de ces patients avait déjà été déterminée dans une étude précédente : les patients répondeurs correspondent aux patients qui suite au traitement par le lenalidomide ne nécessitent plus de transfusions ou ont au moins une diminution de 50% du nombre de transfusions sur une période de huit semaines consécutives (réponse hématologique complète ou mineure) (Raza et al., 2008). Les auteurs ont d'abord défini une signature moléculaire de la réponse au lenalidomide, à savoir qu'un ensemble de 47 gènes était surexprimé chez les patients non-répondeurs. Ils ont ensuite établi que cet ensemble de gènes appartenait spécifiquement à la voie de différenciation érythroïde et qu'il était exprimé de façon coordonnée lors de cette différenciation : leur expression augmente avec la différenciation (**Figure 26**).

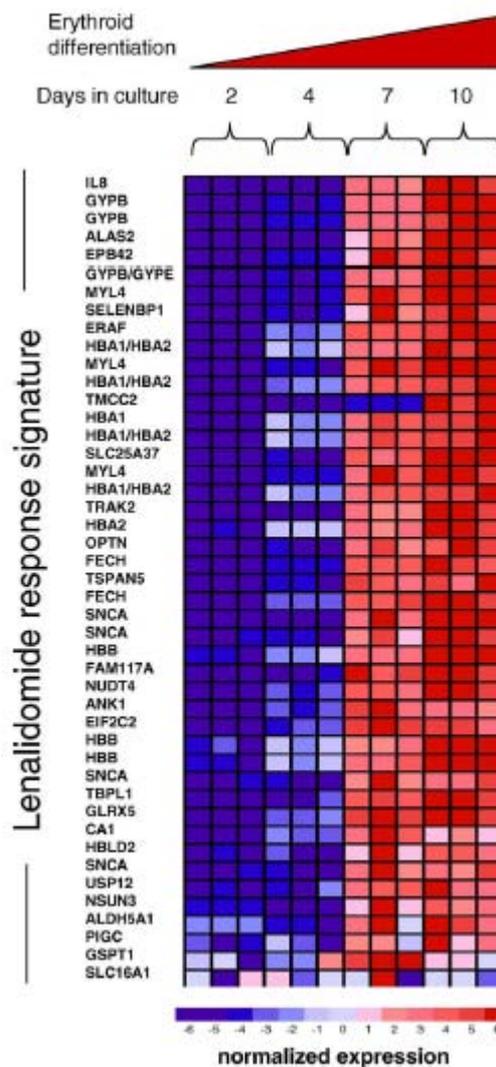


Figure 26 Signature moléculaire du lenalidomide, (Ebert et al., 2008a).

Les auteurs ont testé la valeur prédictive de cette signature moléculaire sur deux groupes de patients, l'un possédant la del(5q), l'autre non. Ces patients provenaient respectivement des études de List et de Raza (List et al., 2006a; Raza et al., 2008). Pour les deux groupes la réponse au lenalidomide est correctement prédite dans presque tous les cas (10 sur 11 pour les del(5q) et 9 sur 11 pour les non del(5q)).

Pour compléter ces données, les auteurs prouvent par des expériences *in vitro* que le lenalidomide favorise la différenciation érythroïde de cellules CD34⁺ ce qui rendrait compte de l'indépendance aux transfusions obtenues chez les patients del(5q) traités au lenalidomide. Grâce à ce modèle de prédiction les auteurs proposent d'utiliser cette signature moléculaire pour afin de déterminer les patients les plus à même à répondre à un traitement au lenalidomide, dont font partie les patients del(5q) (Ebert et al., 2008a).

1.3. Les leucémies aiguës myéloïdes

Les leucémies aiguës myéloïdes (LAM) sont des hémopathies clonales acquises de la cellule souche hématopoïétique ou d'un précurseur déjà commis vers la lignée myéloïde ayant réacquis des propriétés d'auto-renouvellement (Passegue et al., 2003).

Les patients atteints de SMD peuvent se transformer en LAM (acutisation) et le lenalidomide a ainsi été testé chez quelques patients portant notamment la délétion del(5q). Chez les patients LAM, à la différence des patients SMD, la présence de la del(5q) est associée à un pronostic défavorable avec un faible taux de survie et peu de rémission complète (Giagounidis et al., 2006). Le premier cas décrit, concerne un patient âgé portant la del(5)(q13q33) plus la mutation V617F dans JAK2. Le diagnostic de la LAM chez ce patient était subséquent à un syndrome myélodysplasique non traité. Ce patient a reçu uniquement du lenalidomide et a atteint une rémission partielle pendant 5 mois (Mesa et al., 2006).

D'autres études isolées décrivent un traitement par le lenalidomide de patients LAM sans antécédent de SMD et portant la del(5q). Ils atteignent une rémission complète après 2 mois de traitement et qui est restée stable pendant au moins 10 mois (Hussein and Tefferi, 2009; Penarrubia et al., 2009). Un autre patient portant uniquement la del(5q) et traité seulement avec du lenalidomide a lui atteint une rémission complète (Lancet et al., 2007). Un autre cas plus récemment publié, décrit l'utilisation du lenalidomide chez un patient LAM en rechute portant la del(5q)(q13q33) associée à d'autres anomalies (del(22)(q11.2)). Trois mois après le

début du traitement au lenalidomide ce patient a atteint une rémission complète et est resté stable pendant au moins cinq mois.

Une autre étude décrit deux cas de patients LAM portant une trisomie 13 dont l'un est subséquent à une SMD. Le traitement par le lenalidomide de ces patients conduit à la rémission complète au bout de 2 mois et demi pour l'un et quatre mois pour l'autre. Dans les deux cas la rémission complète a perduré sur neuf mois (Fehniger et al., 2009).

Les études ayant étudié le rôle potentiel du lenalidomide dans les LAM ne concernent à l'heure actuelle que des cas isolés et se sont essentiellement focalisées chez des patients possédant la del(5q).

Le lenalidomide a donc une diversité d'action importante en fonction du cancer hématologique dans lequel il est utilisé mais également au sein d'une même pathologie. Quelles propriétés rendent compte de cet éventail d'actions ? C'est l'objet des paragraphes suivant qui s'attacheront à décrire les diverses propriétés du lenalidomide tout en les reliant au contexte pathologique dans lequel elles ont été étudiées.

2. Propriétés du lenalidomide

2.1. Propriétés anti-tumorales directes

Quelques études indiquent une action antiproliférative du lenalidomide sur des lignées de lymphome de Burkitt (lymphome non-hodgkinien) possédant une délétion 5q, par un blocage du cycle en G0/G1 corrélé à la surexpression de p21^{WAF-1}, un inhibiteur de kinases dépendantes des cyclines indispensables au passage de la transition G1/S (Verhelle et al., 2007).

Dans une étude *in vivo*, chez la souris, le lenalidomide inhibe le développement et la progression tumorale d'une lignée de lymphome de Burkitt ainsi que la néo-vascularisation (Lentzsch et al., 2003).

L'effet pro-apoptotique que pourrait avoir le lenalidomide sur des cellules de myélome multiple n'a pas été clairement démontré, il pourrait potentiellement agir en synergie avec des inducteurs d'apoptose comme TRAIL/Apo2L (Mitsiades et al., 2002).

Ces différentes études démontrent que le lenalidomide n'a pas de forte activité anti-tumorale intrinsèque mais une action importante sur l'expression globale des gènes.

Pour les patients atteints de syndromes myélodysplasiques avec del(5q), nous avons précédemment vu que le traitement au lenalidomide permet d'avoir un taux élevé de réponse érythroïde et de rémission cytologique indiquant un effet anti-tumoral direct. Une récente analyse multivariable indique que les deux paramètres prédisant le mieux l'indépendance aux transfusions des patients sont : une réduction de plus de 50% du nombre de plaquettes ou l'apparition de myélosuppressions obligeant l'arrêt momentané du traitement. Ces cytopénies apparaissent au début du traitement par le lenalidomide et traduisent la suppression du clone del(5q) (Sekeris et al., 2008). La délétion 5q correspond à la perte d'un segment de 1,5 Mb entre les bandes 5q31 et 5q32 contenant 44 gènes (Boulwood et al., 2002). Il n'existe donc plus qu'une seule copie de ces gènes affectant ainsi leur niveau d'expression globale. Parmi ces gènes, l'haplo-insuffisance du *RPS14* (ribosomal processing 14) est un exemple probant de son implication dans le phénotype del(5q). Une étude par ARN interférence, montre que l'inactivation de ce seul gène perturbe la différenciation et la viabilité des érythroblastes tout en préservant la maturation des mégacaryocytes. De plus, la transfection d'ADNc de *RPS14* dans des cellules CD34⁺ isolées de patients SMD del(5q) est suffisante pour sauver la différenciation érythropoïétique et n'a pas d'effet sur les cellules CD34⁺ issues de patients SMD non-del(5q) (Ebert et al., 2008b).

Le gène *SPARC* est également situé dans la région de la délétion 5q31-q32 et son niveau d'expression globale est diminué de moitié chez les patients SMD del(5q). La principale fonction de *SPARC* est la régulation des interactions avec la matrice extracellulaire. Il participe au détachement des cellules de leur environnement extracellulaire (Framson and Sage, 2004). L'augmentation des propriétés adhésives liées à une faible expression de *SPARC*, chez les patients SMD del(5q), pourrait conduire à une prolifération préférentielle du clone del(5q) dans la moelle osseuse. Dans cette étude, le lenalidomide augmente de façon significative l'expression du gène *SPARC* aussi bien dans des progéniteurs hématopoïétiques CD34⁺ de donneurs sains que dans des cellules CD34⁺ de patients SMD del(5q). Cependant, il ne diminue la croissance que des cellules de SMD portant la délétion 5q. Ainsi, dans les cellules del(5q), le lenalidomide corrigerait le défaut d'expression de *SPARC* et diminuerait ainsi leur prolifération alors que la surexpression observée dans les cellules normales n'aurait pas d'effet sur leur physiologie (Pellagatti et al., 2007).

Enfin, une dernière étude, implique l'inhibition de deux phosphatases régulant le cycle cellulaire, i.e. CDC25C et PP2A-C α . Ces phosphatases sont aussi présentes dans la région 5q31-q32 et leur expression est diminuée chez les patients SMD del(5q). Une cible majeure

de CDC25C est CDK-1. La déphosphorylation de CDK-1 est visible à l'entrée du point de contrôle G2/M et permet la progression du cycle cellulaire. Dans cette étude, le traitement au lenalidomide inhibe directement l'activité de CDC25C et sa rétention dans le cytoplasme, conduisant à une accumulation de CDK-1 phosphorylée (Tyr¹⁵) et donc à un arrêt du cycle en G2/M. La phosphatase PP2A-C α déphosphoryle CDC25C en Ser²¹⁶ et permet ainsi sa relocalisation au noyau pour activer CDK-1. Elle est aussi inhibée par le lenalidomide mais par un mécanisme impliquant d'autres partenaires. Ainsi, les cellules traitées au lenalidomide sont d'une part bloquées au stade G2/M du cycle cellulaire et d'autre part plus sensibles à l'apoptose (Wei et al., 2009).

2.2. Interférences avec le microenvironnement tumoral

2.2.1. Propriété anti-inflammatoire

Le thalidomide est utilisé dans les maladies où la forte présence de TNF- α est responsable d'atteintes inflammatoires sévères comme dans l'Erythema Nodosum Leprosy. Dès 1991, une explication à la réponse clinique favorable observée chez ces patients est donnée par Sampaio et collaborateurs : le thalidomide inhibe l'expression du TNF- α par des monocytes de donneurs sains activés au LPS (Sampaio et al., 1991). Cette propriété a poussé, en partie, au développement des IMiD® qui ont une activité anti-TNF- α de 2000 à 20 000 fois supérieure au thalidomide (Muller et al., 1999).

L'enzyme COX-2 métabolise l'acide arachidonique en diverses prostaglandines pro-inflammatoires dont la PGE₂ qui peut favoriser la croissance tumorale en stimulant l'angiogenèse (Wang et al., 2006). Le lenalidomide réduit l'expression de COX-2 dans des PBMC stimulés au LPS et donc la production de PGE₂. L'addition d'anticorps bloquant l'IL-10 contrecarre cette inhibition de COX-2 suggérant que le lenalidomide inhibe cette enzyme en augmentant la production d'IL-10 (Payvandi et al., 2004). En effet, le lenalidomide modifie le profil d'expression cytokinique de PBMC de donneurs sains stimulés au LPS avec notamment une forte augmentation de la production d'IL-10, une forte diminution de la production de TNF- α mais aussi de l'IL-6 et dans une moindre mesure de l'IL-1 β et de l'IL-12 (Corral et al., 1999).

2.2.2. Propriété anti-angiogénique

Le Thalidomide inhibe la production de bFGF (basic Fibroblast Growth Factor) comme cela est montré dans un modèle d'angiogenèse sur cornée de lapin (D'Amato et al., 1994). Le thalidomide inhibe également la production de VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) et d'IL-6 par les cellules stromales de moelle osseuse lorsqu'elles sont en co-cultures avec des lignées cellulaires de myélome multiple (Gupta et al., 2001). Les IMiD® présentent aussi cette propriété anti-angiogénique (Gupta et al., 2001). Le lenalidomide, dans un modèle de culture d'HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial Cells) humaines *in vitro*, n'a pas d'action sur la prolifération de ces cellules. En revanche, il réduit le développement de tubules dans ce modèle d'angiogenèse humaine *in vitro* et le nombre de microvaisseaux dans un second modèle *in vitro* d'angiogenèse à partir d'aorte de rat (Dredge et al., 2002). *In vivo*, dans un modèle d'angiogenèse au niveau de la fenêtre méésentérique chez le rat, le lenalidomide inhibe le développement de microvaisseaux induit par le bFGF ou le VEGF. Il réduit aussi la migration d'HUVEC, *in vitro*, induite par les facteurs de croissance (Dredge et al., 2005). Ainsi, l'action anti-angiogénique se ferait par la modulation de facteurs chimiotactiques impliqués dans la migration des cellules endothéliales, incluant le TNF- α , le VEGF et le β FGF (produits par les cellules de myélome multiple et les cellules stromales dérivées de la moelle osseuse) plutôt que par une inhibition directe de la prolifération des cellules endothéliales.

Les patients atteints de myélome multiple ont une angiogenèse anormalement développée dans la moelle osseuse. Ce phénomène participe à la résorption osseuse et au développement tumoral (Matsumoto and Abe, 2006). Ainsi, la description des propriétés anti-angiogéniques du lenalidomide ont servi de base à son utilisation chez les patients atteints de myélome multiple.

Chez les patients atteints de syndrome myélodysplasique, une étude de phase I/II met en évidence le rôle du lenalidomide dans la réduction de la densité en microvaisseaux de la moelle osseuse. Cette réduction est observée chez les patients répondeurs n'ayant plus besoin de transfusion de globules rouges et parmi lesquels la réduction semble plus marquée chez les patients del(5q) (List et al., 2006b).

2.2.3. Modulation de l'expression des molécules d'adhésion

L'adhésion des cellules tumorales à leur microenvironnement est déterminante pour la survie et la progression tumorale. Dans le myélome multiple, le TNF- α induit l'expression de nombreuses molécules d'adhésion telles que LFA-1, ICAM-1, VCAM-1 et VLA-4 importantes pour la survie des cellules (Hideshima et al., 2001). Or, le lenalidomide diminue l'expression du TNF- α et donc pourrait potentiellement diminuer l'expression de ces molécules d'adhésion nécessaires à la survie des cellules de myélome multiple. Breitkreutz et collaborateurs montrent que le lenalidomide diminue l'expression de l'intégrine $\alpha v \beta 3$ (Breitkreutz et al., 2008). Cette intégrine est un marqueur de la différenciation ostéoclastique. Elle est également capable d'activer les ostéoclastes et est donc associée à la résorption osseuse (Faccio et al., 2003). Ainsi, le lenalidomide diminuerait le remodelage osseux induit par les cellules de myélome multiple.

La modulation des molécules d'adhésion par le lenalidomide est un phénomène encore mal caractérisé.

2.2.4. Propriété anti-ostéoclastogénique

La physiopathologie du myélome multiple est caractérisée par une résorption osseuse importante due à la surexpression de nombreux facteurs qui, d'une part, stimulent la différenciation et l'activité des ostéoclastes et d'autre part suppriment les régulateurs négatifs de l'ostéoclastogénèse. Cela a pour conséquence un ratio anormal entre les ostéoblastes et les ostéoclastes en faveur de ces derniers (Terpos et al., 2007). Les ostéoclastes participent à la résorption de l'os alors que les ostéoblastes participent à sa formation. La première évidence d'un effet des IMiD® sur la formation osseuse a été publiée par Anderson et collaborateurs. Ils ont découvert que le thalidomide et plus particulièrement le pomalidomide abrogeait presque complètement la formation d'ostéoclastes induite par RANKL en diminuant l'expression de PU.1, un facteur de transcription majeur dans l'ostéoclastogénèse (Anderson et al., 2006). Le lenalidomide possède également cette nouvelle propriété et inhibe, lui aussi, la formation d'ostéoclastes à différents étages. Il peut ainsi diminuer l'expression de PU.1, la synthèse de RANKL et augmenter celle de l'ostéoprogérine, un récepteur leurre de RANKL, chez des patients atteints de myélome multiple après deux mois de traitement au lenalidomide (Breitkreutz et al., 2008). En revanche, le lenalidomide ne semble jouer aucun rôle dans la

différenciation et la maturation des ostéoblastes (Munemasa et al., 2008) à l'instar du Bortezomib, un inhibiteur du protéasome, qui favorise l'expression d'Osterix, un facteur de transcription essentiel dans la différenciation tardive des ostéoblastes (De Matteo et al., 2010).

2.3. Propriétés immuno-régulatrices

2.3.1. Action sur les cellules NKT

Les cellules NKT sont caractérisées par l'expression d'un TCR invariant ($V\alpha 24$ - $J\alpha 18/V\beta 11$ chez l'Homme) restreint par la molécule du CMH non-classique CD1d présentant un antigène de type glycolipide. Ces cellules représentent 0,001 à 1 % des cellules du sang périphérique. Elles possèdent aussi des marqueurs classiquement attribués aux cellules NK tel que le CD56 en revanche elles n'expriment pas le récepteur de cytotoxicité naturelle NKp46, un marqueur spécifique des cellules NK. Elles prolifèrent fortement à l'ajout d'un ligand exogène l' α -galactocéramide (α -GalCer).

Une première observation indique la capacité du Lenalidomide à augmenter la prolifération *ex vivo* de cellules NKT de donneurs sains et de patients atteints de myélome multiple (Chang et al., 2006). Une étude plus récente a effectué un suivi longitudinal détaillé des cellules T et NKT de patients atteints de syndrome myélodysplasique avant traitement et au cours des 10 mois du traitement au lenalidomide. Le pourcentage de ces deux compartiments cellulaires était identique à celui de donneurs sains avant le début du traitement et aucune expansion ou altération n'a pu être observée pour les lymphocytes T et les cellules NKT au cours des dix mois de traitement (Chan et al., 2010). De plus, la production de cytokines telles que l'IFN- γ , le TNF- α et l'IL-4 qui est normale chez ces patients n'est pas modifiée *in vivo* par le traitement au lenalidomide. Ce n'est qu'*in vitro* et en activant les NKT par l' α -GalCer que ces auteurs mettent en évidence une augmentation de la production de ces cytokines lorsque le lenalidomide est ajouté à la culture (Chan et al., 2010). Le rôle du lenalidomide sur les cellules NKT est sujet à débat.

2.3.2. Propriété de costimulation des lymphocytes T

La principale propriété immunomodulatrice décrite pour le thalidomide est sa capacité à induire la prolifération des lymphocytes T à condition qu'ils aient été au préalable stimulés par un anticorps anti-CD3 (OKT3) (Haslett et al., 1998). Il favorise également leur production

d'IL-2, d'IFN- γ et de TNF- α . Le thalidomide aurait ainsi un rôle de costimulation des lymphocytes T. Pour appuyer cette hypothèse, il faut noter que l'ajout d'IL-2 à la stimulation anti-CD3 des lymphocytes T masque l'effet pro-prolifératif du thalidomide (Haslett et al., 1998).

Le lenalidomide a lui aussi la propriété d'augmenter la prolifération des lymphocytes T préalablement activés par de l'anti-CD3 (LeBlanc et al., 2004) ainsi que leur production d'IL-2 et d'IFN- γ . Ces propriétés semblent plus importantes pour les IMiD® que pour le thalidomide (Davies et al., 2001). Des données de transcriptomes sur l'expression des gènes des lymphocytes T de patients atteints de leucémie lymphoïde chronique révèlent que la présence du clone malin de LLC induit une modification des gènes impliqués dans la différenciation des lymphocytes T CD4 ainsi que la formation du cytosquelette, le trafic vésiculaire et la cytotoxicité des lymphocytes T CD8⁺ (Gorgun et al., 2005). A partir de ces données, le groupe de Gribben montre par des expériences de coculture, que les cellules de LLC induisent une incapacité des lymphocytes T CD4⁺ et T CD8⁺, de patients et de donneurs sains, à créer une synapse immunologique polarisée avec une cible conventionnelle. Par l'utilisation de systèmes de chambres séparées par des membranes (Transwells®), les auteurs démontrent que l'action inhibitrice des cellules de LLC sur les lymphocytes T nécessite un contact cellulaire et que seul le traitement des deux partenaires (effecteur et cible) par le lenalidomide permet de rétablir la mise en place d'une synapse lytique polarisée.

Une étude *in vivo* chez quatre patients atteints de LLC corrobore les résultats précédents. C'est-à-dire qu'à partir de 5 jours de traitement des patients par le lenalidomide, les cellules T ont la capacité de former *ex vivo* une synapse immunologique polarisée avec des cellules de LLC autologues (Ramsay et al., 2008). Des résultats similaires ont été obtenus avec des lymphocytes de patients atteints de lymphome folliculaire (Ramsay et al., 2009).

2.3.3. Propriété d'activation des cellules NK

Les effets que pourraient avoir les IMiD® sur la potentialisation des fonctions des cellules NK sont à ce jour encore mal compris et les données de la littérature peu nombreuses. Une des premières études, réalisées sur des PBMC de donneurs sains activés à l'IL-2 puis traités avec des IMiD®, ne favorise pas la prolifération des cellules NK mais suggère que ce traitement favorise la lyse de cellules tumorales réalisée par les cellules NK (Davies et al., 2001). Comme le lenalidomide favorise la production d'IL-2 par les lymphocytes T, le mécanisme d'action suggéré mais non formellement démontré du lenalidomide sur les

cellules NK serait indirect via la production de cette cytokine activatrice (Hayashi et al., 2005). En revanche, le lenalidomide augmente l'action du Rituximab dans des expériences de cytotoxicité contre diverses lignées tumorales CD20⁺ de lymphome non-hodgkinien (Wu et al., 2008) ainsi que celle d'autres anticorps monoclonaux comme l'anti-CD19 (XmAb5574, IgG1) ciblant des cellules de leucémie lymphoïde chronique (Awan et al., 2010).

Le lenalidomide semblerait donc avoir plutôt une action synergique avec les voies de signalisation du CD16 enclenchées lors d'expériences d'ADCC avec divers anticorps monoclonaux.

Synthèse des principales propriétés du lenalidomide associées aux cancers hématologiques (Figure 27) :

Dans le myélome multiple, les principales actions décrites du lenalidomide concernent d'une part la perturbation des interactions entre les cellules tumorales et leur microenvironnement. Et d'autre part, une activité immunomodulatrice est également mise en avant.

Dans les syndromes myélodysplasiques, la principale propriété du lenalidomide concerne sa capacité à favoriser la différenciation érythroïde. Il est également capable d'inhiber la croissance du clone del(5q).

Dans la leucémie lymphoïde chronique, le lenalidomide ne semble pas avoir une action anti-tumorale directe mais pourrait moduler le microenvironnement et activer les cellules immunitaires.

Effect	Mechanism	Relative potency+ = potency factor of 10		
		Thalidomide	Lenalidomide	Pomalidomide
<i>Immune modulation</i>				
CD4 ⁺ and CD8 ⁺ T-cell co-stimulation	<ul style="list-style-type: none"> - T-cell co-stimulation is associated with: <ul style="list-style-type: none"> - Increased tyrosine phosphorylation of CD28 on T cells and activation of PI3-K-signalling pathway. - Enhanced transcriptional activity of activated protein (AP)-1, a key driver for IL-2 production. 	+	++++	+++++
Tregs suppression	<ul style="list-style-type: none"> - Lenalidomide and pomalidomide inhibits Treg expansion and FOXP3 expression on Treg but do not affect Treg survival and apoptosis. - No effects are seen on Tregs' expression of IL-10 and TGFβ. 	-	+	+
Th1 cytokine production	<ul style="list-style-type: none"> - The co-stimulation effect of IMiDs on T cells and NKT cells result in an increased production of Th1-type cytokines, IL-2 and IFNγ. 	+	++++	+++++
NK and NKT cell activation	<ul style="list-style-type: none"> - IMiDs enhances the degree of DC-induced NKT cell expansion, and NKT cell secretion of IFNγ. - IMiDs-induced NK cell activation is mediated via an increase in IL-2 (from T-cell co-stimulation). 	+	++++	+++++
Antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC)	<ul style="list-style-type: none"> - Enhanced NK cell ADCC in the presence of lenalidomide and pomalidomide corresponds to increased NK cell FasL and granzyme B, but not perforin expression. 	-	++++	++++
<i>Interference with tumour micro-environment interactions</i>				
Anti-angiogenesis	<ul style="list-style-type: none"> - IMiDs inhibits endothelial sprout formation and vessel migration <i>in vitro</i> models. - Anti-angiogenesis occurs via modulation of chemotactic factors involved in endothelial cell migration including TNFα, VEGF and βFGF secreted by BMSC, rather than direct inhibition of endothelial cell proliferation. 	++++	+++	+++
Anti-inflammatory properties	<ul style="list-style-type: none"> - Thalidomide, lenalidomide and pomalidomide downregulate TNFα from LPS-stimulated monocytes, shorten the half life of COX-2 mRNA in a dose-dependent fashion, which resulted in net reduction in PGE₂. - The exact ligand-mediator or signalling pathway involved with this is uncertain. 	+	++++	+++++
Downregulation of adhesion molecules	<ul style="list-style-type: none"> - IMiDs downregulate expression of surface adhesion molecules on both plasma cells and PBMC, partially via the downregulation of TNFα. 			
Anti-osteoclastogenic properties	<ul style="list-style-type: none"> - IMiDs downregulate osteoclastogenic mediators production from BMSC, including IL-6, TNFα, MIP1-a and RANKL. - IMiDs directly inhibit osteoclast maturation. - IMiDs inhibit Wnt/β-catenin signalling pathway, which is associated with osteoblastogenesis, via the activation of DKK1, a negative regulator of Wnt signalling. 			
<i>Direct anti-tumour effects</i>				
Anti-proliferative activity	<ul style="list-style-type: none"> - IMiDs induce cyclin-dependent kinase (CDK) inhibitors: p21, p27 and p15, which result in inhibition of CDK activity causing cell cycle arrest in the G0/G1 phase of the cell cycle. - IMiDs induce changes in expression of early growth response genes (Erg)-1, 2 and SPARC (Secreted protein acidic and rich in cysteine). - IMiDs downregulate NFκB with subsequent reduction in expression of anti-apoptotic proteins including cIAP2 and FLIP. - IMiDs variably inhibit caspase 3, 8 and 9. 	+	+++	+++

Figure 27 Sommaire des principales propriétés des IMiD® (Quach et al., 2010).

III) Les effecteurs lymphoïdes cytotoxiques et traitements des leucémies aiguës myéloïdes : rôle prépondérant des cellules Natural Killer

Les leucémies aiguës myéloïdes représentent un groupe hétérogène d'hémopathies malignes. Elles sont caractérisées par une prolifération clonale de progéniteurs hématopoïétiques myéloïdes bloqués à un stade de différenciation précoce et par une insuffisance médullaire. Ces cellules myéloïdes immatures leucémiques s'accumulent dans la moelle osseuse et le sang et perturbent l'hématopoïèse normale provoquant de nombreuses cytopénies. Ainsi, les anémies, thrombopénies et neutropénies aggravent la maladie en favorisant l'apparition des infections opportunistes. Les LAM touchent principalement les personnes âgées (>60 ans) et de plus, l'âge est un facteur déterminant dans le pronostic des LAM (Tallman et al., 2005) car les traitements intensifs utilisés ne sont pas applicables aux patients les plus âgés en raison de leur toxicité. Les patients atteints de syndromes myéloprolifératifs ou de leucémie myéloïde chronique peuvent évoluer en LAM ce qui constitue une phase terminale de la maladie, on parle d'acutisation.

1. Classification

La LAM est une maladie très hétérogène du fait de la diversité des progéniteurs myéloïdes touchés. Cette diversité est illustrée par la classification French-American-British (FAB) qui distingue sept classes en fonction de critères morphologiques et cytochimiques (**Figure 28**). Les cellules leucémiques, ou blastes, de type M0 à M3 appartiennent à la lignée granulocytaire avec un blocage au stade myéloblaste pour les M0, M1 et M2 ou un blocage au stade promyélocyte pour les M3. Les blastes de type M4 et M5 appartiennent à la lignée monocytaire et sont bloqués au stade monoblaste. Les blastes M6 appartiennent à la lignée érythrocytaire et sont bloqués au stade proérythroblaste. Enfin, les blastes de type M7 appartiennent à la lignée des plaquettes et sont bloqués au stade mégakaryoblaste. Cette classification n'est cependant que descriptive et n'a que peu de valeur pronostic.

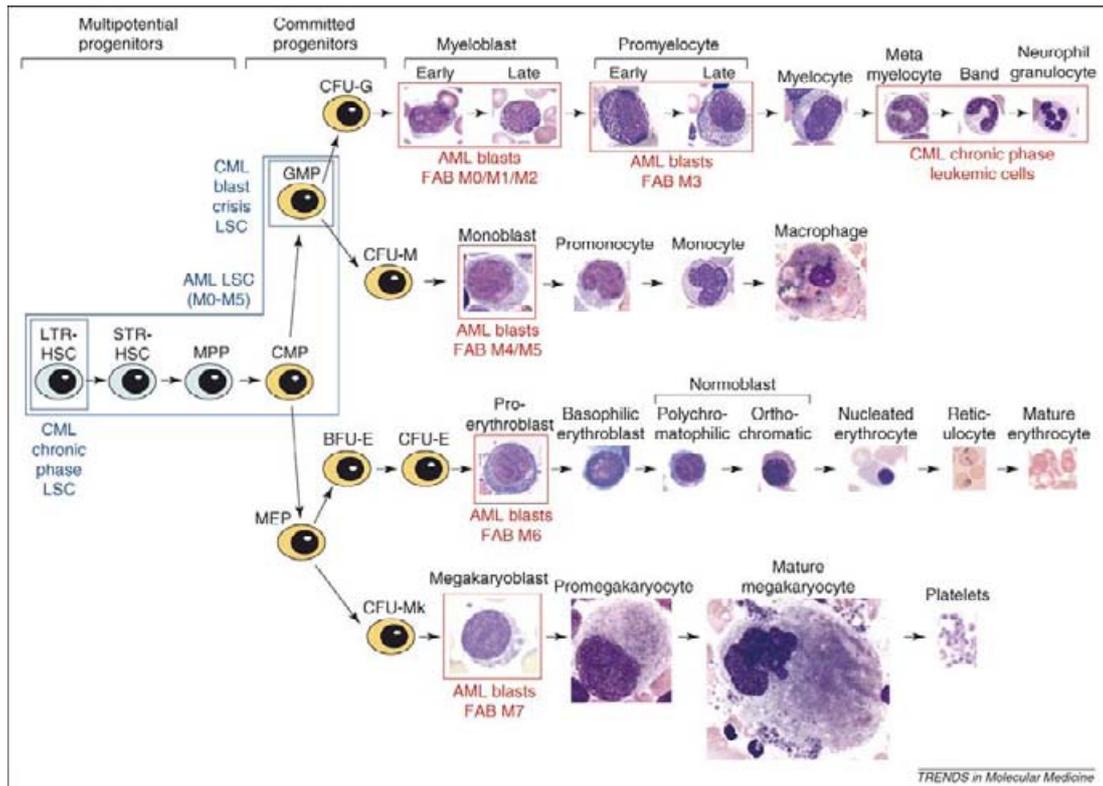


Figure 28 Classification FAB (Krause and Van Etten, 2007).

La classification de l'organisation mondiale de la santé OMS (Vardiman et al., 2009) tient compte de nombreux paramètres : un examen cytologique, un immunophénotypage réalisé par cytométrie en flux ainsi que l'établissement du caryotype cytogénétique ou de l'analyse moléculaire des mutations génétiques. Ces différences génétiques forment des entités clinico-pathologiques associées à des facteurs de mauvais ou de bon pronostic pour les patients (**Figure 29**).

Le schéma suivant résume la prise en compte des anomalies cytogénétiques et moléculaires :

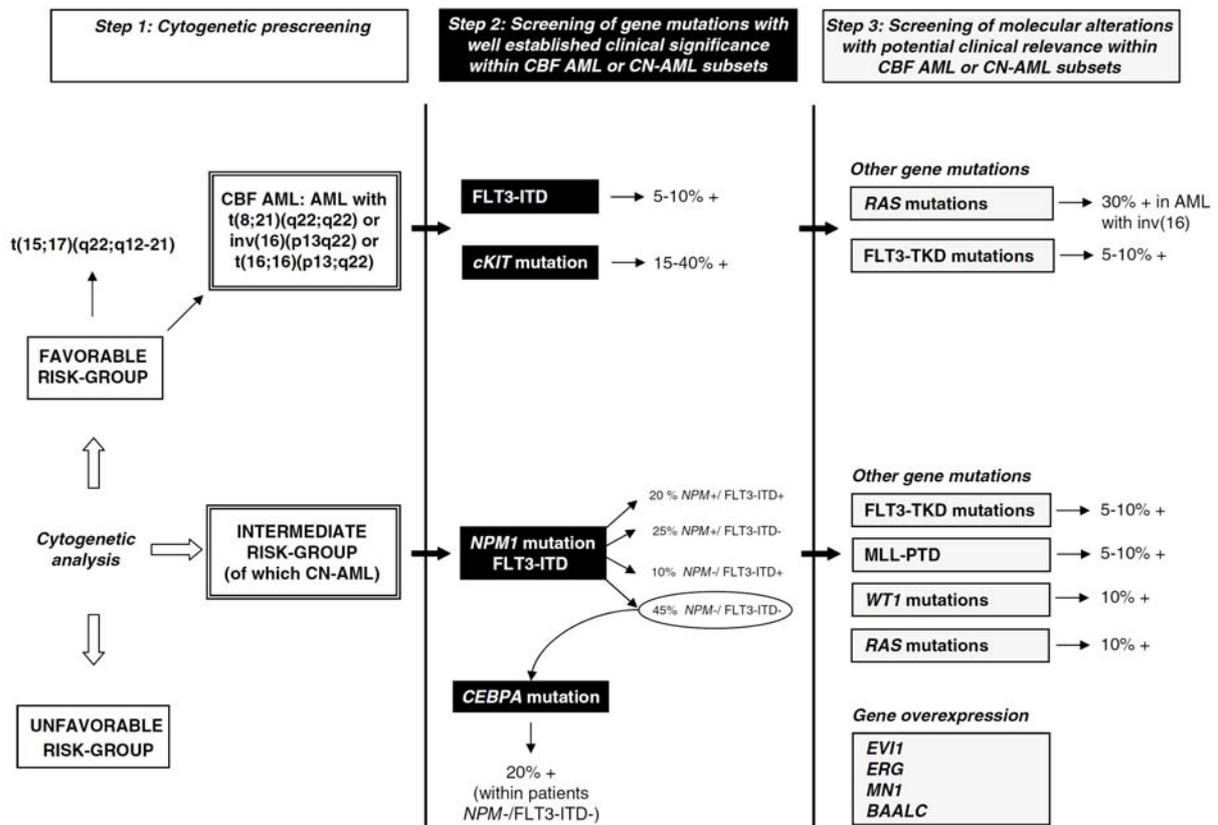


Figure 29 Prise en compte des anomalies moléculaires pour l’ajustement de la classification cytogénétique (Renneville et al., 2008).

Les classifications des LAM sont en pleine évolution du fait de la caractérisation de plus en plus fine des événements cytogénétiques et moléculaires et ainsi de nouvelles classifications apparaissent comme celle publiée tout récemment par Dohner H et collaborateurs (**Figure 30**).

Favorable	t(8;21)(q22;q22); <i>RUNX1-RUNX1T1</i> inv(16)(p13.1q22) or t(16;16)(p13.1;q22); <i>CBFB-MYH11</i> Mutated <i>NPM1</i> without <i>FLT3</i> -ITD (normal karyotype) Mutated <i>CEBPA</i> (normal karyotype)
Intermediate-I*	Mutated <i>NPM1</i> and <i>FLT3</i> -ITD (normal karyotype) Wild-type <i>NPM1</i> and <i>FLT3</i> -ITD (normal karyotype) Wild-type <i>NPM1</i> without <i>FLT3</i> -ITD (normal karyotype)
Intermediate-II	t(9;11)(p22;q23); <i>MLLT3-MLL</i> Cytogenetic abnormalities not classified as favorable or adverse†
Adverse	inv(3)(q21q26.2) or t(3;3)(q21;q26.2); <i>RPN1-EV11</i> t(6;9)(p23;q34); <i>DEK-NUP214</i> t(v;11)(v;q23); <i>MLL</i> rearranged -5 or del(5q); -7; abnl(17p); complex karyotype‡

Figure 30 Classification cytogénétique et moléculaire des LAM (Dohner et al., 2010).

Les fréquences, les taux de réponses et les mesures des résultats devraient être reportés par groupe génétiques et si les échantillonnages le permettent, par sous-ensembles spécifiques indiqués ; en excluant les cas de leucémie aiguë promyélocytaire.

* inclut toutes les LAM avec un caryotype normal sauf ceux du sous-groupe favorable, la plupart de ces cas sont associés avec un faible pronostic mais ils devraient être reportés séparément à cause de leur potentiel différent de réponse au traitement.

† Pour la plupart des anomalies, un nombre adéquat de cas n'ont pas été étudiés afin d'affirmer avec certitude leur valeur pronostic

‡ au moins trois anomalies chromosomiques en absence d'une de celles désignées par la WHO, c'est-à-dire t(15;17), t(8;21), inv(16) ou t(16;16), t(9;11), t(v,11)(v;q23), t(6;9), inv(3) ou t(3;3); indique combien de cas de caryotypes complexes ont une implication des bras des chromosomes 5q, 7q et 17p.

2. Apparition des LAM et cellules « initiatrice de la leucémie »

Selon le « two-hit model » proposé par Gilliland, deux événements mutationnels seraient nécessaires pour rendre compte du phénotype leucémique (Gilliland, 2001). Ces événements moléculaires sont de deux types : les mutations de type I procurent un avantage prolifératif et une résistance à l'apoptose et les mutations de type II conduisent à un blocage de la différenciation cellulaire. Parmi les mutations de type I, la surexpression ou la mutation de gènes impliqués dans les voies de signalisation intracellulaire comme *FLT3* (-ITD ou –

TKD), Ras (N-ras ou K-ras) ou cKit (exon8 ou D836). Les mutations de type II correspondent à des remaniement de facteurs de transcription à travers des translocations ou inversions chromosomiques comme CBF β -MYH11 ou Inv(16)(p13;q22), AML1-ETO ou t(8;21)(q22;q22), PML-RAR α ou t(15;17)(q22;q11-12) et MLL/AF9 ou t(9;11)(p22;q23).

L'acquisition de ce phénotype leucémique se situe vraisemblablement au niveau d'une cellule souche hématopoïétique normale ou d'un progéniteur myéloïde déjà engagé dans un processus de maturation qui aura alors réacquis des propriétés d'auto-renouvellement (Passegue et al., 2003). En effet, les cellules souches leucémiques sont définies par leur fonction c'est-à-dire par leur capacité à être gardées en culture sur le long-terme ou à reproduire chez l'animal la leucémie développée par le patient. Ainsi, les premières expériences ont montré que seules les cellules leucémiques CD34⁺CD38⁻ étaient capables de développer une leucémie dans un modèle de souris immunodéficientes SCID (Lapidot et al., 1994). Ce phénotype plus immature que les cellules capables de former des colonies (CFU, Colony-Forming Units) conduisit à l'idée que la cellule souche leucémique provenait des cellules souches hématopoïétiques normales (Dick, 2008). Or, depuis quelques années ce concept de cellules souches leucémique est clairement mis au défi par différentes publications. D'une part Taussig et collaborateurs montrent que les cellules « initiatrices de la leucémies » expriment des marqueurs de la lignée myéloïde, tels le CD33, le CD13 et le CD123 et la fraction des cellules capables de reformer une leucémie dans une souris NOD/SCID est restreinte à la fraction CD33⁺ pour 11 des 12 patients étudiés (Taussig et al., 2005). Les travaux de cette même équipe ont pu également montrer que la fraction des cellules leucémiques CD34⁺CD38⁺ de patients atteints de LAM était responsable du développement de la leucémie dans des souris NOD/SCID (Taussig et al., 2008). Enfin, la transfection de différents gènes de fusion contenant l'oncoprotéine MLL (MLL-ENL, MLL-AF9) dans des progéniteurs myéloïdes déjà commis dans la différenciation granulomacrophagique sont capables de développer une leucémie dans des modèles murins (Cozzio et al., 2003; Krivtsov et al., 2006) (**Figure 31**). Ces cellules ont une expression anormalement élevée des gènes à homéobox du cluster *HOXA* qui sont en temps normal fortement exprimés par les cellules souches hématopoïétiques et progressivement perdus avec l'avancée dans la maturation myéloïde. Ainsi, ces progéniteurs hématopoïétiques déjà engagés peuvent réacquérir des propriétés « souches » comme l'auto-renouvellement après l'acquisition de MLL-ENL (Cleary, 2009).

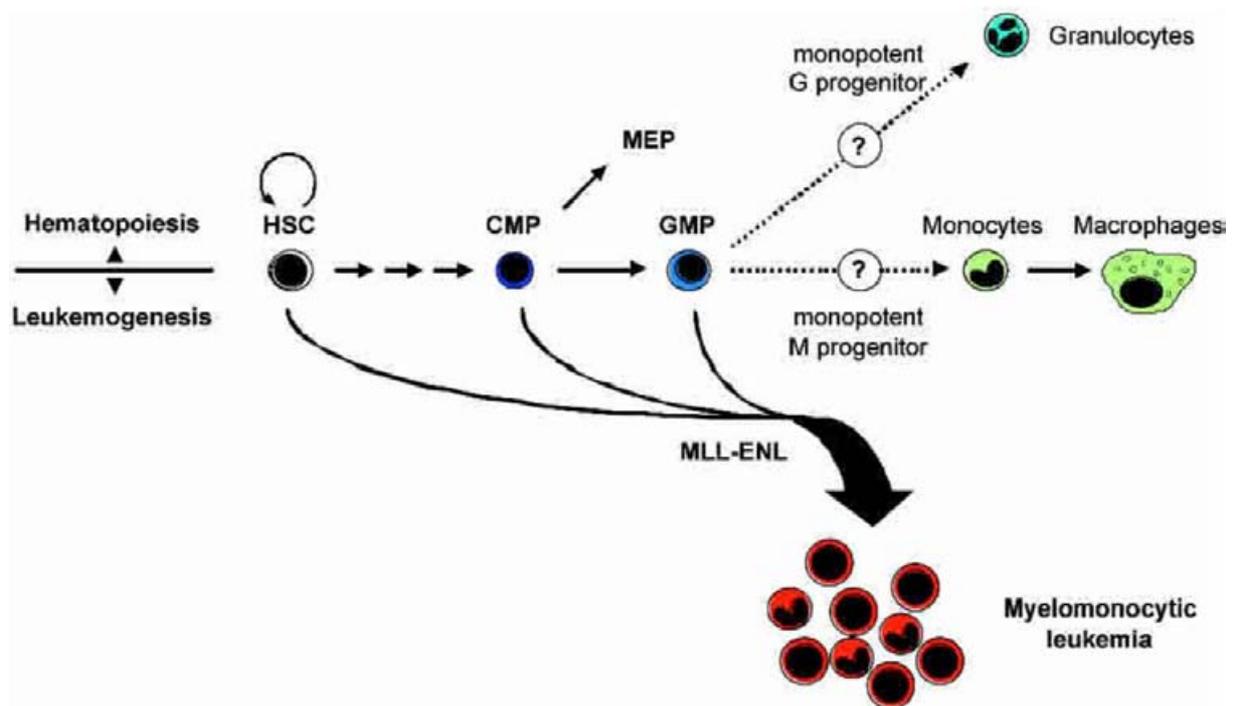


Figure 31 Modèle de la leucémogénèse initiée par MLL-ENL à partir de cellules souches hématopoïétiques mais aussi de progéniteurs myéloïdes (Cozzio et al., 2003).

HSC = cellule souche hématopoïétique, CMP = progéniteur myéloïde commun, GMP = Progéniteur granulo/monocytaire, MLL-ENL = Mixed-lineage leukemia-eleven nineteen leukemia.

3. Traitements conventionnels

Le traitement conventionnel des LAM est constitué de poly-chimiothérapies intensives et se compose de deux phases : une phase d'induction puis une phase de consolidation. Le traitement d'induction a pour objectif de mener à une rémission complète du patient et se compose de trois jours d'anthracycline (Daunorubicine, Idarubicine ou Mitoxantrone anthracenedione) puis sept jours de cytosine arabinoside (Ara C). Ce protocole, « 3 +7 », reste le standard de la chimiothérapie d'induction. La rémission complète se définit comme suit : un pourcentage de blastes dans la moelle osseuse inférieur à 5%, une absence de blastes contenant des tiges d'Auer, l'absence de maladie extra-médullaire, un nombre de neutrophiles dans le sang supérieur à 1000 cellules/ μ l, un nombre de plaquettes supérieur à 100 000 cellules/ μ l et l'absence d'anémie. Ce premier traitement assure chez les patients de moins de 60 ans une rémission complète dans 60 à 80% des cas. Le taux de survie à 5 ans est d'environ

35-40%. Au contraire, les patients âgés de plus de 60 ans atteignent la rémission complète dans 45 à 55% des cas et le taux de survie à 5 ans est d'à peine 10% (Dohner et al., 2010). Suite à cette induction de la rémission, les patients sont en aplasie c'est-à-dire dans l'incapacité transitoire à renouveler et régénérer les cellules du sang et donc du système immunitaire. Ce phénomène est principalement dû à la forte toxicité des drogues envers les progéniteurs hématopoïétiques normaux. Un des problèmes majeurs dans le traitement des LAM réside dans la forte proportion de rechutes après la rémission complète obtenue suite à la chimiothérapie d'induction (environ 50 à 70%). La phase de consolidation de la rémission complète se compose habituellement de plusieurs cycles de chimiothérapie intensive, utilisant l'AraC, suivie ou non d'une greffe allogénique ou autologue en fonction du risque de rechute. L'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques reste le meilleur traitement pour la prévention des rechutes mais elle reste limitée par la disponibilité d'un donneur HLA compatible ainsi que par l'éligibilité du patient à ce traitement lourd.

Les raisons d'un pronostic plus mauvais chez les personnes âgées sont le plus souvent reliées à une fréquence élevée d'événements cytogénétiques défavorables, d'antécédents de SMD ainsi qu'une plus grande résistance des cellules leucémiques aux drogues administrées. De plus, à cause d'une santé généralement fragile de ces patients, leur sensibilité aux traitements intensifs de chimiothérapie est élevée. Ainsi, l'amélioration de la prise en charge de ces patients par des thérapies plus ciblées et moins toxiques que les chimiothérapies conventionnelles est un enjeu majeur pour améliorer leur survie globale et retarder l'apparition de la rechute (Kuendgen and Germing, 2009).

4. Rôle de l'immuno-surveillance dans les LAM

L'importance du système immunitaire dans la progression des LAM est mise en avant par une série d'études montrant que la lente reconstitution du nombre absolu de lymphocytes suite à une transplantation hématopoïétique ou à la chimiothérapie d'induction est un facteur de mauvais pronostic pour la survie sans rechute et la survie globale. Dans le cadre des transplantations allogéniques de moelle osseuse avec pour la plupart des cas une compatibilité HLA de 100%, diverses études démontrent que les patients LAM ayant un nombre absolu de lymphocytes inférieur à 150-200 cellules/ μ l, 1 mois après la transplantation, ont un risque accru de rechute (Kumar et al., 2001; Powles et al., 1998). Les analyses multivariées réalisées mettent en évidence que le nombre absolu de lymphocytes est un facteur pronostic

significatif et indépendant. La lente reconstitution du nombre absolu de lymphocytes est aussi significativement associée à un risque accru de rechute dans le cadre d'une transplantation autologue de cellules souches hématopoïétiques (Porrata et al., 2002b). Dans cette étude, le nombre absolu de lymphocytes est analysé plus tôt (15 jours post-greffe) et le seuil de lymphocytes est placé plus haut que celui des études lors de transplantations allogéniques (500 cellules/ μ l). Ce seuil est cependant faible en regard des valeurs normales qui se situent entre 1500 et 4000 cellules/ μ l et l'on considère qu'il y a lymphopénie lorsque ce nombre est en-dessous de 1000 cellules/ μ l. Enfin, un nombre absolu de lymphocytes au-dessus de 350-500 cellules/ μ L est un facteur indépendant d'une meilleure survie sans rechute 15 à 28 jours après une chimiothérapie d'induction (Behl et al., 2006; De Angulo et al., 2008). De façon analogue à l'effet du greffon contre la leucémie (GvL) observé dans les transplantations allogéniques, où le système immunitaire du donneur serait capable d'éliminer la maladie résiduelle chez le receveur, une reconstitution rapide des lymphocytes permettrait d'avoir un effet protecteur de ces lymphocytes contre la progression de la maladie. Des études supplémentaires sont cependant nécessaires pour déterminer quelles sous-populations de lymphocytes sont responsables de cet effet et si leur fonctionnalité après une chimiothérapie ou une transplantation est altérée. Ces études permettraient d'indiquer les meilleurs effecteurs lymphoïdes cytotoxiques à cibler, les moyens optimaux de les cibler et la fenêtre de temps idéale pour la mise en place d'une telle immunothérapie.

Je développerai ci-après les rôles que peuvent avoir les effecteurs lymphoïdes cytotoxiques dans la lutte contre les cellules leucémiques de LAM et les stratégies utilisées visant à potentialiser leurs fonctions dans un cadre restreint aux leucémies aiguës myéloïdes.

4.1. Les lymphocytes T CD8+ cytotoxiques et les lymphocytes T V γ 9V δ 2

4.1.1. Les lymphocytes T CD8+ cytotoxiques

Les antigènes associés aux tumeurs peuvent induire une réponse lymphocytaire T spécifique et sont la cible privilégiée d'immunothérapies ciblées. Il existe trois principales stratégies : la première est l'utilisation d'une vaccination peptidique dont l'objectif est d'induire une réponse cellulaire T spécifique, la seconde est le transfert adoptif de cellules T déjà spécifiques d'un antigène donné et la troisième consiste à transférer des cellules dendritiques présentant des antigènes tumoraux afin de générer une réponse T, là aussi

spécifique. La condition sine-qua-non de ces stratégies est l'identification d'antigènes tumoraux spécifiques. Cependant, au contraire des tumeurs solides, très peu d'antigènes tumoraux capables d'induire une réponse cellulaire T spécifique ont été décrits chez des patients atteints de LAM.

4.1.1.1. Les antigènes tumoraux associés aux LAM et la vaccination peptidique

Les antigènes tumoraux associés aux LAM appartiennent à des voies essentielles de la prolifération, de la différenciation et de l'apoptose des cellules leucémiques (Greiner et al., 2008).

Dans un premier temps, des lymphocytes T CD8⁺ circulants de patients LAM en rémission complète ou au diagnostic ont montré une réactivité *in vitro* contre des épitopes de WT-1 (Wilm's Tumor gene product 1) et de PR3 (protéinase 3) par l'accumulation intracellulaire d'IFN- γ et par sa sécrétion lors d'un test ELISPOT. La reconnaissance de ces antigènes est également restreinte à leur présentation par la molécule HLA-A2 (Scheibenbogen et al., 2002).

WT-1 est un facteur de transcription dont le domaine d'expression est normalement restreint aux cellules placentaires. Il peut aussi être exprimé plus faiblement et/ou transitoirement dans les cellules rénales et les cellules souches hématopoïétiques normales CD34⁺. WT1 est retrouvé de manière anormale dans plusieurs tumeurs solides et dans des cancers hématologiques autres que la LAM tels que les SMD et la LMC où il est capable d'inhiber la différenciation des progéniteurs hématopoïétiques normaux et leucémiques. L'expression de WT1 dans des cellules autres que leucémiques pourrait logiquement conduire à des réactions d'auto-immunité cependant dans cette étude aucun dysfonctionnement, rénal par exemple, n'a été observé.

PR3, est une sérine protéase des neutrophiles qui peut aussi être exprimée par les lignées monocytaires. Son expression dans les cancers semble restreinte aux tumeurs hématologiques LAM et LMC. PR3 joue un rôle critique dans l'apoptose et la prolifération des progéniteurs myéloïdes en régulant p21 et la pro-caspase 3 (Greiner et al., 2006a). Des essais cliniques à base de vaccination peptidique contenant des épitopes de WT1 seul (Keilholz et al., 2009) ou de WT1 combiné à PR1, un autre peptide dérivé de la protéinase 3, (Rezvani et al., 2008) indiquent que l'apparition de lymphocytes T CD8⁺ réactifs vis-à-vis de ces antigènes

s'accompagne d'une diminution ou d'une perte de la détection des ARN messagers correspondants (WT1 ou PR1), utilisés ici comme marqueurs de la maladie résiduelle.

Un autre antigène important exprimé par des cellules de LAM est le récepteur pour la motilité associée à l'acide hyaluronique (RHAMM/CD168). Il est exprimé dans divers tissus normaux et surexprimé dans de nombreux cancers solides et hématopoïétiques. Ce récepteur par sa participation à la formation du fuseau mitotique et la transduction de signal effectuée par Ras, joue un rôle essentiel dans la croissance, la différenciation et la motilité cellulaire (Hall et al., 1995). Son association avec le proto-oncogène H-ras en fait un élément important dans le processus de transformation cellulaire. Il est ainsi une cible de choix parmi les antigènes tumoraux. En 2005, Greiner et collaborateurs indiquent que 40% des patients, contre 19% des donneurs sains, possèdent des lymphocytes T CD8⁺ répondant *ex-vivo* à une stimulation par un épitope de RHAMM/CD168 (Greiner et al., 2005). En 2008, dans un essai clinique de phase I utilisant une vaccination avec le même épitope de RHAMM/CD168 que précédemment, des lymphocytes T CD8⁺ spécifiques apparaissent chez deux des trois patients LAM, ils produisent aussi de l'IFN- γ *ex-vivo* mais cette réponse est transitoire (Schmitt et al., 2008).

L'antigène PRAME (PReferentially expressed Antigen of MELanoma) a été isolé pour la première fois comme un antigène présent sur un mélanome humain et reconnu par des lymphocytes T cytotoxiques. Il est aussi exprimé dans divers cancers hématologiques dont la LAM et est reconnu par les lymphocytes T CD8⁺ IFN- γ ⁺ de 6 patients LAM sur 10 mais les auteurs n'ont pu démontrer d'évidences directes sur l'activité lytique de ces CTL (Rezvani et al., 2009). PRAME par son rôle de répresseur du récepteur de l'acide rétinoïque participe au blocage de la différenciation et à la reprise du cycle cellulaire.

L'expression de SSX2IP (Synovial Sarcoma X breakpoint 2-Interaction Protein) mesurée par microarray est significativement associée à un meilleur taux de survie chez les patients LAM mais uniquement ceux ayant un caryotype normal (Denniss et al., 2007). Le rôle de SSX2IP est encore mal connu, mais il peut-être exprimé à la surface des cellules leucémiques de LAM au cours de la mitose (Guinn et al., 2009).

90% des patients LAM expriment le récepteur aux tyrosines kinases FLT3 et 30% d'entre eux portent la duplication interne en tandem de FLT3 (FLT3-ITD). *In vitro*, la stimulation des lymphocytes T CD8⁺ d'une patiente LAM, par un peptide synthétique de FLT3-ITD a permis de générer une série de clones reconnaissant aussi bien le peptide synthétique que ses propres cellules leucémiques. Ces résultats démontrent que ces blastes peuvent apprêter et présenter des néo-épitopes immunogènes de FLT3-ITD (Graf et al., 2007).

Le rôle des lymphocytes T CD8⁺ spécifiques d'un antigène tumoral est mis en avant avec l'étude de Greiner et collaborateurs en 2006 où ils établissent, par analyse microarray de 116 échantillons de blastes LAM, une corrélation significative entre le fort niveau d'ARNm de *G250/CA9* et une survie globale prolongée ($p=0,022$). De plus, une réponse T CD8⁺ spécifique contre des cellules présentant un peptide de *G250/C19* est obtenue pour 6 des 10 patients LAM en rémission complète testés alors qu'aucun patient LAM réfractaire au traitement n'est capable de générer une telle réponse T CD8⁺. Ces lymphocytes T CD8⁺ peuvent aussi lyser *in vitro* des blastes exprimant un peptide de *G250/CA9* à condition qu'il soit présenté par HLA-A2. *G250/CA9* appartient à la famille des anhydrases carboniques associées à la membrane plasmique et semble jouer un rôle dans la prolifération cellulaire en réponse à l'hypoxie. Son expression est restreinte aux cellules cancéreuses. Les autres antigènes étudiés comme WT1 ne sont pas corrélés avec le devenir clinique bien que certains comme PRAME et RHAMM/CD168 semblent suivre la même tendance que *G250/CA9* (Greiner et al., 2006b).

Un des inconvénients de la vaccination peptidique associée ou non à des adjuvants est que les lymphocytes T du patient peuvent être hypo-répondeurs du fait de la leucémie ou des divers traitements utilisés fragilisant le système immunitaire du patient.

Ainsi, une étude de l'expression des gènes réalisée sur des lymphocytes T CD8 et T CD4 de patients atteints de LAM montre une dérégulation d'une série de gènes associée à l'activation, la signalisation du TCR ou la polarisation de l'actine en comparaison avec des donneurs sains. Les cellules T CD8⁺ ont une capacité réduite à former une synapse immunologique avec les blastes autologues et à induire un signal phosphotyrosine. D'une part, les cellules T CD8⁺ des patients sont incapables de former une synapse immunologique correcte avec des cellules présentatrices d'antigènes de donneurs sains et d'autre part, les cellules T CD8⁺ de donneurs sains forment des synapses défectueuses avec des blastes de LAM. Les cellules T et les cellules leucémiques de LAM sont donc toutes les deux responsables du défaut de formation de la synapse immunologique (Le Dieu et al., 2009). Ce défaut pourrait être compensé par le traitement au Lenalidomide comme le décrivent Ramsay et collaborateurs chez des patients atteints de LLC où une déficience similaire des lymphocytes T à former une synapse immunologique a été observée (Ramsay et al., 2008).

4.1.1.2. Le transfert adoptif de lymphocytes T cytotoxiques spécifiques

Pour pallier l'éventuelle incapacité des lymphocytes T du patients à répondre à une vaccination peptidique, l'apport direct de lymphocytes T cytotoxiques spécifiques « prêt à l'emploi » provenant de donneurs sains de même HLA est une alternative possible mais quasiment inexplorée dans les LAM (Bae et al., 2004).

4.1.1.3. Utilisation des cellules dendritiques et activation endogène de LT CD8+ spécifiques

Les cellules dendritiques sont les cellules présentatrices d'antigènes les plus efficaces pour activer les cellules T naïves. Elles peuvent être générées *ex-vivo* à partir de monocytes ou de précurseurs CD34⁺ de la moelle osseuse.

De façon remarquable, des cellules dendritiques peuvent également être générées à partir des cellules leucémiques de la lignée monocyttaire de patients atteints de LAM. Elles acquièrent ainsi la pleine capacité à présenter des antigènes et à activer des cellules T *in-vitro* (Charbonnier et al., 1999; Choudhury et al., 1999). Cela représente une perspective intéressante pour le traitement de la maladie résiduelle chez ces patients. Cependant, les études se sont, à l'heure actuelle, focalisées sur la manière de générer ces cellules dendritiques, soit à partir de monocytes soit à partir de cellules leucémiques. Elles se sont aussi focalisées, i) sur leur capacité à présenter des antigènes et à activer *in-vitro* une réponse lymphocytaire T cytotoxique, ii) sur les cytokines qu'elles sécrètent et iii) sur les modalités de vaccination comme le choix d'adjuvants, le nombre de vaccination et la voie d'administration (sous-cutanée ou intraveineuse) (Houtenbos et al., 2006). Les données cliniques chez les patients LAM sont donc limitées. Elles ont cependant pu montrer la possibilité d'activer les lymphocytes T *in-vivo* (Lee et al., 2004b) ou d'augmenter le nombre de lymphocytes T CD8⁺ spécifiques d'antigènes comme PRAME (Li et al., 2006) aucune n'a pu observer de diminution du pourcentage de blastes. Les perspectives de ce type de vaccination sont intéressantes mais son processus est complexe car il requiert de multiples étapes. Il est essentiel que les cellules dendritiques aient un niveau de maturation suffisant afin de ne pas conduire à l'anergie des lymphocytes T ou à l'expansion de lymphocytes T régulateurs. Cette étape est sans doute la plus difficile à obtenir de manière reproductible. De plus on connaît encore mal le niveau optimal de maturation que doit avoir la cellule dendritique au moment

de la vaccination et si la cellule dendritique leucémique peut atteindre un tel état *in vivo* après son administration (Figdor et al., 2004).

4.1.2. Les lymphocytes T $\gamma\delta$: une sous-population lymphocytaire cytotoxique peu étudiée dans les LAM

Le rôle que pourrait avoir les lymphocytes T $\gamma\delta$ dans la progression des LAM est un domaine encore très peu décrit. Seules deux études font mention des lymphocytes T $\gamma\delta$ dans la LAM. La première étude (Aswald et al., 2006), réalisée sur un faible échantillonnage de patients, indique que parmi les patients en échec thérapeutique ceux ayant un taux de blastes élevé ont un nombre de LT $\gamma\delta$ plus faible en comparaison des patients ayant une maladie résiduelle réduite. Cependant, de façon surprenante et non élucidée, les patients en rémission complète ont un nombre de LT $\gamma\delta$ faible et inférieur à la normale. Cette étude montre que le nombre absolu de lymphocytes T $\gamma\delta$ après la chimiothérapie d'induction reflèterait la qualité de réponse au traitement. Il faut aussi souligner que la population habituellement majoritaire des LT $\gamma\delta$ du sang circulant (association des chaînes V γ 9V δ 2) n'a pas clairement été identifiée. Cela a son importance, car la seconde étude décrit chez un patient LAM une sous-population de lymphocyte T $\gamma\delta$ normalement rare parmi les LT $\gamma\delta$ du sang circulant. Cette sous-population possède l'association des chaînes V γ 9 et V δ 1, elle représente 30% des LT $\gamma\delta$ chez ce patient après une transplantation allogénique de cellules souches et possède une forte activité cytotoxique *in vitro* contre des blastes autologues (Dolstra et al., 2001). Aucune stratégie visant à potentialiser les fonctions effectrices de ces lymphocytes T $\gamma\delta$ n'a encore été publiée dans la LAM.

4.2. Les cellules Natural Killer : un effecteur cytotoxique de choix pour les LAM

4.2.1. Utilisation dans un contexte allogénique

4.2.1.1. Rôle des cellules NK allogéniques dans la transplantation

L'expression des KIR à la surface des cellules NK en fait une population aux caractéristiques très particulières. En effet, d'après l'hypothèse du « missing-self », si une cellule n'exprime pas de molécule du CMH-I capable d'envoyer un signal inhibiteur aux

cellules NK, elle sera alors considérée comme une cible à tuer par ces dernières. Cette incompatibilité KIR/CMH-I est parfois désignée sous le terme « KIR-mismatch ».

Lors d'une transplantation allogénique, au moins une partie des cellules NK (NK alloréactives) du donneur vont ainsi être réactives vis-à-vis des cellules du receveur à cause d'un KIR-mismatch. Ainsi, en comparant le statut HLA du receveur et l'expression des KIR à la surface des cellules NK du donneur, il est possible de prédire la présence de cellules NK alloréactives dans une transplantation allogénique. En effet, le conditionnement utilisé, lors d'une transplantation hématopoïétique allogénique, détruit non seulement les lymphocytes du receveur mais aussi les cellules de la moelle osseuse. Ainsi, les cellules NK sont éduquées dans un microenvironnement où prédomine les molécules d'HLA du donneur. Elles acquièrent notamment leur licence pour tuer par les cellules du donneurs. Le répertoire NK constitué est alors tolérant envers les cellules du donneur et potentiellement alloréactif vis-à-vis du receveur. Sur la base de l'expression des KIR inhibiteurs qui permettent à la cellule NK de reconnaître l'absence du soi, il existe trois incompatibilités principales permettant une alloréaction dans le sens donneur versus receveur (greffe versus hôte). Elles correspondent à la présence d'un KIR inhibiteur à la surface des cellules NK du donneur et l'absence d'expression de l'allèle correspondant appartenant au groupe HLA-Cw1, HLA-Cw2 ou HLA-Bw4.

Ruggeri et collaborateurs montrent que ces clones de cellules NK alloréactives peuvent tuer les cellules leucémiques de LAM congelées du receveur (Ruggeri et al., 1999). En 2002, ils apportent la plus belle évidence de l'action bénéfique des cellules NK alloréactives. D'une part, ils mettent en évidence dans des expériences réalisées chez la souris que l'infusion de cellules NK alloréactives peut éradiquer le développement d'une leucémie humaine dans des souris NOD/SCID, et d'autre part qu'elles protègent aussi de la GvHD en éliminant les cellules présentatrices d'antigènes du receveur. Elles améliorent aussi de façon spectaculaire la survie des souris dans des expériences de transplantation allogéniques avec un KIR-mismatch. De plus, l'étude rétrospective des données cliniques sur le devenir de transplantations haploidentiques chez 35 patients atteints de LAL (Leucémie Aiguë Lymphoïde) et 57 patients atteints de LAM, indique que lorsqu'il y a alloréactivité, dans le sens greffe versus hôte, le rejet de greffe et la GvHD aiguë disparaissent. En revanche, la probabilité de rechute à 5 ans est très contrastée car chez les patients atteints de LAM, cette dernière est nulle alors que pour les patients atteints de LAL, elle reste identique à celle observée sans alloréactivité (Ruggeri et al., 2002). Une étude conduite par le même groupe

chez 112 patients atteints de LAM, comprenant les 57 de 2002, démontre aussi un taux de rechute fortement diminué ($p=0.001$) pour les transplantations haploidentiques contenant des cellules NK alloréactives. Cependant, l'action de ces cellules NK alloréactives n'a pas d'effet sur la GvHD comme cela a pu être montré précédemment. L'analyse multivariable incluant des paramètres cruciaux de la transplantation comme l'âge et la cytogénétique des patients, le nombre de cellules CD34⁺ et de lymphocytes T dans la greffe ou le statut de la maladie au moment de la transplantation, confirment que les transplantations possédant des cellules NK alloréactives sont un facteur indépendant d'une meilleure survie (Ruggeri et al., 2007). La possibilité d'effectuer des transplantations allogéniques sans une parfaite compatibilité, habituellement recherchée, ouvre considérablement la disponibilité du nombre de donneurs potentiels. Les cellules souches utilisées dans les transplantations proviennent soit de la moelle soit du sang périphérique mais peuvent aussi provenir du sang de cordons ombilicaux.

Dans les études de Ruggeri et collaborateurs, plusieurs paramètres concernant les transplantations allogéniques sont importants pour rendre compte de l'effet bénéfique de l'alloréactivité des cellules NK. Ainsi, le lien de filiation entre le donneur avec le receveur (greffe haploidentique ou greffe à partir d'un donneur sans lien de filiation), la suppression ou non des lymphocytes T de la greffe et le type de leucémie (LAM ou LAL) sont des facteurs à prendre en compte car ils sont susceptibles de modifier l'importance de l'action des NK alloréactives. Les données de ces études concernent des transplantations haploidentiques ayant subi une forte déplétion préalable en lymphocytes T et qui ont un effet bénéfique sur la survie uniquement chez les patients atteints de LAM. Pour le cas de donneurs n'ayant pas de lien de filiation avec le receveur, les données de la littérature peuvent être contrastées quoique parfois difficilement comparable du fait des différences dans les protocoles utilisés. Willemze et collaborateurs, dans une étude comparative entre des patients LAM et LAL transplantés avec du sang de cordon ombilical préalablement dépourvu des lymphocytes T, démontrent que l'alloréactivité des cellules NK joue un rôle bénéfique dans la survie sans rechute, plus particulièrement chez les patients LAM (Willemze et al., 2009). Dans le cadre de greffes de moelle allogéniques provenant de donneurs sans lien de filiation, l'alloréactivité des cellules NK diminue le risque de rechute. Cependant, si la greffe contient des lymphocytes T, le risque de GvHD est augmenté et masque l'effet bénéfique des NK alloréactives. Cette étude ne fait pas non plus la différence entre les patients atteints de LAM et de LMC (Miller et al., 2007). Gill et collaborateurs, dans une revue synthétique, font ressortir l'extrême difficulté de comparer les différentes études afin de déterminer les conditions précises dans lesquelles

l'alloréactivité des cellules NK est la plus convaincante. Ils suggèrent, à partir des études récapitulées dans le tableau ci-dessous (**Figure 32**) que la forte dose de cellules souches et la déplétion importante des lymphocytes T de la greffe ainsi que l'absence de traitement prophylactique anti-GvHD et une maladie myéloïde comme cible seraient des facteurs importants pour maximiser l'alloréactivité des cellules NK. D'autres raisons qui permettraient d'expliquer la disparité des résultats obtenus sont, entre autres, les différences dans la définition de l'alloréactivité des cellules NK (phénotypique vs génotypique), la source du donneur (avec ou sans lien de parenté), le degré de correspondance du HLA et l'état d'avancement de la maladie au moment de la transplantation.

Reference	Disease	Number of patients	Conditioning	TCD	Graft source and composition	NK alloreactivity?	GVHD prophylaxis	Engraftment failure	Acute GVHD grade II+/Chronic GVHD	Infection	TRM	RFS	OS	Benefit from NK alloreactivity?
Haploidentical														
Ruggieri et al., 2007 [16]	AML	112	MA	Ex vivo	PB: $15 \times 10^6/\text{kg}$ CD34, $3 \times 10^6/\text{kg}$ CD3	1, 2, 3	0	6% vs 10%	10%, NS/NR	38% fatal infections	43%	67% vs 18%	NR	Yes
Leung et al., 2004 [86]	AML, ALL, pediatric	36	NR	CD34 ⁺ selection	PB: $< 3 \times 10^6/\text{kg}$ CD3	1, 2, 4	0	NR	NR/NR	NR	NR	13% vs 54% relapse rate	NR	Yes, for relapse. "mixing ligand" model
Lang, 2004 [134]	Various	63	MA	CD34 or CD133 selected + ATG	PB, $19.5 \times 10^6/\text{kg}$ MNC, $< 2.5 \times 10^6/\text{kg}$ CD3	1	0	17%	7%/13%	17% fatal infections	27%	NR	42%	No (equivalent to histocompatible matched unrelated donor)
HLA-identical related														
Hsu et al., 2005 [17]	AML, CML, ALL, MDS	178	MA	Ex vivo	BM: $9 \times 10^6/\text{kg}$ CD3	2	Yes	0%	NS/NS	NR	NR	$\times 0.41$ relapse (AML, MDS)	$\times 0.52$ risk	Yes
Cook, 2004 [135]	Various	220	MA/RIC	NR	NR	1, 2	Yes	NR	NS/NR	NR	NR	NS	31.6% vs 56.1% (4 years)	No; worse survival for myeloid patients with C1/C2 and KIR2DS2 donor
Unrelated														
Giebel, 2003 [136]	Various	130	MA	ATG	BM: $4.3 \times 10^6/\text{kg}$ MNC	1	Yes	0% vs 4%	0% vs 15% (grade III-IV/NS)	NR	6% vs 40%	Relapse 6% vs 21%	87% vs 48% (4.5 years)	Yes
Kruger et al., 2004 [104]	AML, CML, ALL, MDS	142	MA	ATG	PB/SM	1, 2	Yes	0%	NS/NS	Increased	$\times 2.2$ risk if alloreactive	$\times 3$ relapse risk (activating KIR)	$\times 0.5$ unless donors are KIR haplotype A	No; ligand model
Cooley et al., 2008 [59]	AML	448	MA	No	PB/SM	1, 2	NR	NR	NS/ $\times 1.5$ risk if activating haplotype	NR	NS	$\times 2$ RFS (activating KIR)	$\times 1.5$ with higher number of activating KIR (3 years)	Y for donors with group B KIR haplotype
Davies, 2002 [137]	Various	175	MA	Ex vivo, minority	BM: $7 \times 10^6/\text{kg}$ MNC	1	Yes	NS	NS/NR	NR	NR	9%-12% at 5 years (NS)	NS (whole group); $\times 0.5$ (myeloid)	No
Fang, 2006 [138]	AML, CML, MDS	1571	MA	Minority ex vivo TCD	BM	1	NR	NS	NS/NS	NR	$\times 1.95$ risk	NS	$\times 0.5$ risk	No
Yabe et al., 2008 [132]	Various	1469	MA	ATG, minority	BM	1, 2	Yes	NR	$\times 1.7$ risk, increased with 2DS2 gene in donor/NR	NR	NR	NS	$\times 1.93$ risk	No (worse GVHD)
Miller, 2007 [139]	AML, CML, MDS	2067	NR	NR	NR	1	NR	NR	44% vs 10% (late-phase CML)/NR	NR	NR	$\times 0.54$ relapse in early disease	NR	Yes for early myeloid disease No
Bornhauser et al., 2004 [59]	AML, CML, MDS	118	MA	ATG	PB/BM: $4 \times 10^6/\text{kg}$ CD34	1	NR	10% NS	46% vs 69% NS/NS	NR	NR	Relapse 60% vs 35%	NS	No

Figure 32 Tableau récapitulatif et comparatif des paramètres pouvant influencer l'alloréactivité des cellules NK (Gill et al., 2009).

RFS = Survie sans rechute ; OS = survie globale ; MA = conditionnement myéloablatif ; RIC = conditionnement d'intensité réduite ; ATG = globuline anti-thymocyte ; MNC = cellules mononuclées ; haploA = haplotype KIR A ; C2 = allèles HLA-C2 ; NS = différence non significative ; NR = non reporté.

* modèle utilisé pour définir l'alloréactivité :

- 1, ligand/ligand (typage HLA du donneur et du receveur)
- 2, récepteur/ligand (génotypage ou phénotypage KIR du donneur)
- 3, test de lyse spécifique des cellules NK du donneur contre les cellules du receveur
- 4, test de lyse non-spécifique des cellules NK du donneur contre une cible sensible à la lyse NK (ex : K562)

4.2.1.2. Reconstitution altérée des cellules NK allogéniques après transplantation

Après une transplantation hématopoïétique de cellules souches, les cellules NK sont les premières à se reconstituer et constituent la grande majorité des globules blancs du sang circulant sur une période d'au moins 3 mois. Les cellules NK reconstituées ont cependant un phénotype altéré traduisant une immaturité avec une forte proportion de cellules NK CD56^{bright}, une forte proportion de cellules NK exprimant l'hétérodimère inhibiteur CD94/NKG2A et un faible pourcentage de cellules NK exprimant les KIR (Pittari et al., 2009) (Nguyen et al., 2005; Schulze et al., 2008). Sur cette fenêtre de temps de reconstitution précoce du système immunitaire, le phénotype altéré des cellules NK est associé à une diminution de leur activité cytotoxique (Pittari et al., 2009). De plus, ce phénotype immature contrecarre l'alloréactivité des cellules NK dans le sens donneur versus receveur prévue par la greffe (Nguyen et al., 2005). Les facteurs influençant la reconstitution des cellules NK après une transplantation sont mal connus. D'une part, le conditionnement intensif myéloablatif utilisé peut endommager les cellules stromales essentielles à la maturation des cellules NK (Roth et al., 2000), d'autre part la présence des cellules dendritiques est aussi importante dans la maturation des cellules NK (Ferlazzo et al., 2002). Les lymphocytes T peuvent jouer un rôle positif dans la maturation des cellules NK (Fehniger et al., 2003) mais leur présence dans la greffe semble altérer la reconstitution de l'expression des KIR des NK (Cooley et al., 2005). La cellule tumorale par ces nombreux mécanismes d'échappement est également capable de modifier l'expression de ses molécules HLA et ainsi d'échapper à l'alloréactivité prévue lors d'une transplantation hématopoïétique (Vago et al., 2009).

4.2.1.3. Le transfert adoptif de cellules NK alloréactives

Le transfert adoptif de cellules NK alloréactives « prête à l'emploi » après une transplantation hématopoïétique permettrait de pallier au problème de la persistance des cellules NK immatures et ainsi de favoriser les effets GvL. Cette stratégie est encore très peu étudiée dans le cadre des LAM (Soiffer, 2008).

4.2.2. Alternative aux cellules NK allogéniques par masquage des KIR

Peu de patients LAM sont candidats à la transplantation du fait par exemple d'un âge avancé qui ne leur permet pas de subir une telle intervention thérapeutique. De ce fait, un anticorps capable de bloquer les interactions entre les principaux KIR inhibiteurs et leurs ligands HLA-C a été récemment développé. Cet anticorps, complètement humanisé est d'isotype IgG4 afin d'éviter les réactions d'ADCC. Il se lie aux KIR inhibiteurs KIR2DL1, -DL2 et -DL3 mais aussi aux KIR activateurs correspondants : KIR2DS1 et -S2 avec un doute sur l'absence de reconnaissance du KIR2DS3 (Romagne et al., 2009). Par des tests de lyse au Cr⁵¹ avec des clones de cellules NK exprimant un seul type de KIR inhibiteur contre une cible transfectée avec le ligand HLA-C correspondant, les auteurs montrent la capacité du 1-7F9 à bloquer l'interaction KIR/HLA conduisant alors à la lyse de la cible. De façon similaire, les auteurs ont évalué la lyse de blastes LAM, congelés au diagnostic, par des cellules NK autologues de patients, collectées à la rémission complète et activées *in vitro* à l'IL-2. Les cellules NK prétraitées avec le 1-7F9 ont une cytotoxicité 2 à 3 fois supérieure, que les cellules non traitées, envers les blastes autologues. Afin d'évaluer si le 1-7F9 peut permettre l'activation *in vivo* de cellules NK, les auteurs ont utilisé deux approches. Premièrement, ils ont développé une lignée transgénique murine exprimant le KIR2DL3 dans un fond génétique rag^{-/-}, c'est-à-dire que les souris ne possèdent ni lymphocytes T ni lymphocytes B. Dans ces souris, le 1-7F9 induit, de façon dose dépendante, le rejet de splénocytes KO pour les molécules du CMH-I murines (K^bD^b^{-/-}) et exprimant la molécule HLA-Cw3 (ligand de KIR2DL3). Deuxièmement, la co-injection de blastes LAM et de cellules NK de donneurs sains d'HLA identique dans des souris NOD-SCID conduit au développement d'une leucémie et à la mort des souris alors qu'une unique injection du 1-7F9 (250µg) sauve ces souris.

4.2.3. Utilisation dans un contexte autologue

Le rôle des cellules NK dans la LAM est surtout documenté dans le cadre des transplantations allogéniques que nous avons vu précédemment. Cependant, le rôle que peuvent avoir les cellules NK dans l'élimination des cellules leucémiques dans un contexte autologue est peu connu et nécessite d'être clarifié. Comme cela a été décrit en introduction de cette partie, le nombre absolu de lymphocytes après la chimiothérapie d'induction est un facteur important de bon pronostic. Est-ce que les cellules NK participent à ce bon pronostic ?

4.2.3.1. Déficiences des cellules NK chez les patients LAM

Les études décrivant des altérations phénotypiques et fonctionnelles des cellules NK autologues éclairent cette question mais restent encore peu nombreuses (Rey et al., 2009; Verheyden and Demanet, 2008). Ainsi, des altérations phénotypiques des cellules NK au diagnostic des patients ont été observées, notamment une diminution de l'expression des récepteurs activateurs NKp30 et NKp46 qui va de paire avec une perte d'activité cytolytique. Ce phénotype est réversible au cours du traitement car les patients atteignant la rémission complète retrouvent une expression normale de NKp46 et partielle de NKp30. En revanche, les patients qui n'atteignent pas cette rémission complète ou qui rechutent après rémission, gardent une faible expression de ces deux récepteurs activateurs. Cette réversibilité du phénotype suggère que les cellules leucémiques sont en partie responsables de la diminution d'expression des NCR. En comparaison, l'expression de d'autres récepteurs activateurs comme le CD16, n'est pas modifiée (Costello et al., 2002; Fauriat et al., 2007). La caractérisation approfondie des cellules NK des patients et l'identification des mécanismes responsables des modifications d'expression des récepteurs activateurs et inhibiteurs ainsi que de la perte d'activité de ces cellules permettrait le développement de nouvelles approches thérapeutiques rétablissant leurs fonctions cytotoxiques.

4.2.3.2. Utilisation d'anticorps monoclonaux et ADCC

Le principal anticorps monoclonal utilisé dans le traitement des LAM cible le CD33, une sialoadhésine exprimée par les cellules immatures de la lignée myéloïde. Il faut noter que les cellules souches hématopoïétiques CD34⁺ ne l'expriment pas. Le CD33 est exprimé dans environ 90% des LAM et sur environ 20% des cellules leucémiques (Linenberger, 2005; Stasi

et al., 2008). Les approches thérapeutiques les plus intéressantes ont été obtenues avec le gemtuzumab-ozogamicin (Mylotarg®), un anticorps monoclonal humanisé (IgG4), dirigé contre le CD33 et couplé à un antibiotique : la calichéamicine. Il a été approuvé par la FDA en mai 2000 comme monothérapie chez des patients LAM âgés de plus de 60 ans, en première rechute et inéligibles pour les traitements de chimiothérapies conventionnels. Le taux de rémission complète obtenu dans une étude de phase II (n=142, âge médian 61 ans) est de 13% et le taux de rémission incomplète, c'est-à-dire avec une reconstitution insuffisante du nombre de plaquettes, était lui aussi de 13% (Sievers et al., 2001). Son utilisation combinée avec des agents de chimiothérapie peut cependant être associée à une hépatotoxicité importante. Cet anticorps d'isotype IgG4 n'a qu'une très faible affinité pour le CD16, au contraire des IgG1, et ainsi les mécanismes d'ADCC par les cellules NK ne peuvent rendre compte de son action. C'est pourquoi, un autre anticorps, le Lintuzumab (HuM195) également dirigé contre le CD33 a été développé et contrairement au gemtuzumab-ozogamicin il est d'isotype IgG1. Son utilisation comme agent unique ou en combinaison avec un traitement de chimiothérapie chez des patients LAM réfractaires ou en rechute ne démontrent pas de toxicité particulière mais n'améliore pas de façon significative le taux de survie des patients (Feldman et al., 2003; Feldman et al., 2005).

Dans la LAM, le récepteur à tyrosine kinase FLT3 est fréquemment muté, soit par des duplications internes en tandem (FLT3-ITD) soit par des mutations ponctuelles. Ce récepteur FLT3 muté est alors constitutivement actif et participe au processus de transformation cellulaire (Meshinchi and Appelbaum, 2009). Des inhibiteurs de FLT3 ont ainsi été développés, mais comme pour toutes les petites molécules inhibitrices elles sont sélectives mais pas spécifiques. Elles peuvent inhiber d'autres récepteurs à tyrosine kinase, spécialement quand leur concentration est augmentée. Le développement d'anticorps spécifiques capables de bloquer la signalisation de FLT3 et d'activer l'ADCC pourrait en partie pallier le manque de spécificité des inhibiteurs de FLT3. Dans cette optique, une étude réalisée chez la souris, montre que l'injection d'anticorps dirigés contre FLT3 ou FLT3-ITD diminue l'implantation et le développement des blastes leucémiques issus de patients. Au contraire, l'injection de cet anticorps dans les souris contrôles greffées avec des cellules souches CD34⁺ de donneurs sains n'affecte pas leur développement. Malheureusement, dans cette étude le rôle de l'ADCC n'a été vérifié que dans un système artificiel *in vitro* entre des cellules NK de donneurs sains et des lignées transfectées avec FLT3 ou FLT3-ITD (Piloto et al., 2005). Les études publiées rendant compte d'un effet d'ADCC chez les patients de LAM sont à ce jour encore extrêmement minoritaires.

4.2.3.3. Régulation des ligands de NKG2D par des inhibiteurs de la régulation épigénétique et du protéasome

L'expression des ligands de NKG2D (MICA, MICB et les ULBP) n'est pas ou très peu visible sur les cellules de LAM. Ainsi, dans les expériences *in vitro*, l'importance du récepteur activateur NKG2D dans les fonctions cytolytiques des cellules NK contre les blastes de LAM est très réduite (Nowbakht et al., 2005; Pende et al., 2005b). L'expression des ligands de NKG2D étant acquise au cours de la différenciation des cellules myéloïdes, leur faible expression à la surface des blastes de LAM pourrait être en partie la conséquence du blocage des blastes à un stade de différenciation précoce (Nowbakht et al., 2005; Pende et al., 2005b). En revanche, leur expression est inductible dans des conditions de stress et il n'est pas exclu que sous certaines conditions *in vivo*, les blastes de LAM puissent exprimer ces ligands.

Plusieurs études se sont attachées à étudier cette possibilité en utilisant des agents anticancéreux modifiant les régulations épigénétiques de l'ADN ainsi que le remodelage chromatinien. Le 5-azacytidine et le 5-aza-2'-deoxycytidine sont des inhibiteurs d'ADN méthyltransférase participant à la régulation épigénétique de l'expression des gènes. L'acide valproïque et la trichostatine sont eux des inhibiteurs des histones déacétylases. Les ADN méthyltransférases sont chargées du transfert d'un groupement méthyl sur les CpG de l'ADN et participent le plus souvent à la répression de la régulation génique. Les histones déacétylases sont des enzymes souvent considérées comme répresseurs de l'expression des gènes car la perte des groupements acétyles des histones entraîne généralement une fermeture de la chromatine (Cedar and Bergman, 2009). Ces drogues ont des propriétés anti cancéreuses en induisant l'apoptose, la différenciation ou l'arrêt du cycle cellulaire mais elles sont aussi capables d'induire l'expression des ligands de NKG2D sur les cellules leucémiques de LAM et ainsi d'activer les fonctions cytolytiques des cellules NK (Diermayr et al., 2008; Rohner et al., 2007) (Poggi et al., 2009). Ces résultats sont cependant soumis à discussion car plusieurs études ont pu montrer que l'expression soutenue de MICA par les tumeurs induit une diminution d'expression de NKG2D et ainsi une perte des fonctions cytotoxiques des cellules NK (Oppenheim et al., 2005). D'autre part, un mécanisme d'immuno-évasion utilisé par les cellules tumorales consiste au clivage protéolytique des ligands de NKG2D, tel le clivage de MICA par des ADAM protéases (A Disintegrin And Metalloproteinase), ainsi ces ligands

solubles relâchés dans le milieu extérieur servent de leurres aux effecteurs immunitaires (Salih et al., 2003; Salih et al., 2002; Waldhauer et al., 2008).

Très peu d'études ont utilisé le Bortezomib, un inhibiteur du protéasome, dans le cadre des LAM. Il a été utilisé dans une étude de phase I en combinaison avec des agents de chimiothérapie chez des patients en rechute et 19 des 31 patients (61%) ont atteints la rémission complète (Attar et al., 2008). Il n'est pas connu si le Bortezomib est capable de réguler l'expression des ligands de NKG2D dans la LAM contrairement aux études sur le myélome multiple (Rey et al., 2009).

4.2.3.4. Activation endogène des cellules NK par les cytokines : rôle de l'IL-2 et de l'IFN- α

Parmi les stratégies utilisées pour activer les cellules NK endogènes et potentialiser leur réponse anti-tumorale, diverses cytokines peuvent être utilisées mais l'IL-2 et les IFNs sont jusqu'à présent les seuls à avoir été utilisés en clinique et très peu dans les LAM (Krug et al., 2010).

Pour l'utilisation de l'IL-2, deux études conduites chez de larges cohortes, 161 (Pautas et al., 2010) et 163 patients LAM (Baer et al., 2008), ne mettent pas en évidence d'effet bénéfique de l'IL-2 seule, comme traitement de maintenance chez des patients en première rémission complète après chimiothérapie d'induction et consolidation. L'IL-2 ayant de sérieux effets indésirables, les études décrites ci-dessus ont utilisé soit des doses intermédiaires d'IL-2 administrée en sous-cutané ($5 \cdot 10^6$ U/m² ou moins) pendant 5 jours par mois sur un total de 12 mois de traitement (Pautas et al., 2010), soit un cycle composé de faibles doses d'IL-2 administrées en sous-cutané ($0,9 \cdot 10^6$ U/m²/jour sur 14 jours) suivi de 3 jours avec de fortes doses toujours en sous-cutanée ($12 \cdot 10^6$ U/m²/jour) puis un jour sans injection ; ce cycle étant répété 5 fois (Baer et al., 2008). En dépit du manque d'activité convaincante de l'IL-2 comme monothérapie de maintenance, une étude récente a démontré l'augmentation de la survie sans rechute après 3 ans chez des patients ayant reçu une thérapie de maintenance composée d'IL-2 et d'histamine hydrochloride contre des patients contrôles non-traités. Cette étude de phase III comprenait 320 patients adultes en première rémission complète (Brune et al., 2006; Romero et al., 2009).

Avant que l'imatinib mesylate (Gleevec), un inhibiteur de tyrosine kinase ne devienne un traitement de référence pour la leucémie myéloïde chronique grâce à son action sur la protéine

de fusion Bcr-Abl, l'IFN- α était utilisé en première intention chez ces patients avec de meilleurs résultats que les agents de chimiothérapie (Group, 1997; Pavlovsky et al., 2009). Pour la LAM, l'action de l'IFN- α a été très peu évaluée. Une étude chez 362 patients, dans laquelle de faibles doses d'IFN- α ont été administrées pendant 12 mois comme traitement de maintenance après rémission ne démontre aucun bénéfice concernant le risque de rechute, la survie sans maladie ou la survie globale (Goldstone et al., 2001).

OBJECTIFS DES TRAVAUX

Le lenalidomide possède un grand nombre de propriétés sur le système immunitaire et une activité clinique importante pour le traitement de cancers hématologiques. Son action principale ne semble pas dirigée contre la cellule tumorale elle-même mais vers les multiples cellules de son environnement. Il possède une action directe sur les lymphocytes T en favorisant leur production d'IFN- γ et d'IL-2 permettant ainsi, indirectement, d'activer les cellules Natural Killer. Nous avons donc voulu approfondir le rôle immunomodulateur du lenalidomide sur les cellules NK en cherchant à déterminer s'il pouvait avoir un effet direct sur les cellules NK de donneurs sains.

Chez les patients atteints de leucémies aiguës myéloïdes, la chimiothérapie d'induction permet l'élimination d'une grande partie des cellules cancéreuses conduisant à un taux de rémission complète important. Cependant, certaines cellules sont résistantes et sont responsables du taux élevé de rechutes dans cette pathologie. Ainsi, la période après la chimiothérapie d'induction est déterminante pour le devenir de la maladie et serait une période propice à l'utilisation de thérapies complémentaires capables de prévenir la rechute. Pour cela, il faut déterminer les éléments qui préviennent ou qui participent à la rechute. Plusieurs études ont pu montrer que le nombre absolu de lymphocytes est un facteur prédictif d'une meilleure survie sans rechute. Néanmoins, les sous-populations lymphocytaires impliquées dans ce phénomène ainsi que leurs fonctionnalités ne sont pas connues. Ainsi, nous avons voulu caractériser les effecteurs lymphoïdes cytotoxiques de patients LAM en rémission complète après la chimiothérapie d'induction afin d'évaluer leur rôle dans la prévention de la rechute.

RÉSULTATS

1) Propriétés immunomodulatrices du Lenalidomide sur les cellules Natural Killer de donneurs sains

(Accepté pour publication dans Cellular Immunology)

Lenalidomide down regulates the production of Interferon- γ and the expression of Inhibitory Cytotoxic Receptors of human Natural Killer cells

Nicolas Dauguet^a, Jean-Jacques Fournié^a, Rémy Poupot^a and Mary Poupot^{a*}

^a *INSERM, U.563, Centre de Physiopathologie de Toulouse-Purpan, Toulouse, F-31300 France; Université Paul-Sabatier, Toulouse, F-31400 France*

* Corresponding author. Address: INSERM 563 – Centre de Physiopathologie de Toulouse-Purpan, CHU Purpan, BP 3028, 31024 Toulouse Cedex 3, France. Fax: +33 562 744 558.

E-mail: mary.poupot@inserm.fr

¹ *Abbreviations used:* Chronic Lymphocytic Leukemia, CLL; Fetal Calf Serum, FCS; IFN- γ , interferon- γ ; IL-2, interleukin-2; KIR(s), Killer cell Immunoglobulin-like Receptor(s); LipoPolySaccharide, LPS; Mean Fluorescence Intensity, MFI; Metastatic Renal Cell Cancer, MRCC; Molecules of Equivalent Soluble Fluorochrome, MESF; monoclonal antibody, mAb; Multiple Myeloma, MM; Myelodysplastic Syndromes, MDS; Natural Cytotoxicity Receptors, NCR; NK, Natural Killer; PBMC, Peripheral Blood Mononuclear Cells; Tumor Necrosis Factor- α , TNF- α .

Abstract

Lenalidomide, a daughter molecule of Thalidomide, and IMiDs[®] are immunomodulatory drugs that have been described as having immunomodulatory properties and anti-tumor activity. The effect of Lenalidomide towards Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMC) has been studied and direct effects towards T cells have been described, such as an increase of interferon- γ (IFN- γ) and interleukin (IL)-2 production. As a consequence, it has been also described that IL-2 subsequently activates Natural Killer (NK) cells. Nevertheless, direct effects of Lenalidomide on NK cells from healthy volunteers have never been described, if searched. Here we show that Lenalidomide can inhibit the production of IFN- γ by NK cells from healthy donors. It also modifies the phenotype of NK cells through a decrease of the expression of Killer cell Immunoglobulin-like Receptors (KIRs) and NKp46. However, we did not detect consequence of these phenotype modifications on the cytotoxic potential of NK cells.

Keywords

cell surface molecules, cytotoxicity, immunomodulation, Natural Killer cells, Lenalidomide

1. Introduction

Thalidomide received renewed interest at the beginning of 90's due to its anti-inflammatory and anti-angiogenic activities [1, 2]. Nevertheless, because of its deleterious side effects, chemical analogs have been developed. One of them, Lenalidomide, with increased activities, is used to successfully treat both inflammatory disorders and cancers in the past ten years [3]. It has been initially intended as a treatment for Multiple Myeloma (MM) [4, 5] but also shows efficacy against Myelodysplastic Syndromes (MDS) with interstitial deletion of chromosome 5q [6, 7] and Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL) [8, 9]. Apart from hematological diseases, lenalidomide has been tested in the treatment of solid cancers such as the Metastatic Renal Cell Cancer (MRCC) [10]. *In vitro*, Lenalidomide displays direct anti-tumor effect, inhibition of the microenvironment which supports tumour cells and an immunomodulatory role. Lenalidomide belongs to a new class of drugs called IMiDs[®] (immunomodulatory drugs) and is classified as “immunomodulatory agent” and “antiangiogenic agent”. Nevertheless, Lenalidomide's exact mechanism of action on cancer cells is not fully understood. It affects the way the immune system works by enhancing or decreasing cytokine and growth factor production involved in the modulation of the immune system and in the growth and survival of cancer cells.

In the early 90's it was shown that Thalidomide, the parent-compound of Lenalidomide, inhibits the *in vitro* production of Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α) by human monocytes after stimulation by LipoPolySaccharide (LPS) [11]. Then, it has been published that Thalidomide is able to costimulate CD8⁺ T cells from healthy donors *in vitro*, leading to an increased production of IFN- γ and IL-2 [12]. Studying the effect of Thalidomide and two of its analogs (including Lenalidomide) towards PBMC from normal donors and MM patients, it has been shown that these drugs increase the production of IL-2 by T-cells [13]. In the same work, it has been shown that treatment of PBMC from healthy donors with Lenalidomide enhances the cytotoxicity of NK cells against cancer cell lines. Finally, these authors have established that responder patients treated with Thalidomide have an increased number of circulating NK cells. Authors suggest that the direct effect of Thalidomide on T cells results in an increase in IFN- γ and IL-2 secretion, which augments NK cell number and function. The molecular events leading to the indirect activation of NK cells by IMiDs (including Lenalidomide) has been delineated later on [14]. It is noteworthy that nothing has been found so far regarding a direct effect of IMiDs, especially of Lenalidomide, on NK cells.

Nevertheless, this point is of importance as Lenalidomide is used as an anti-cancer agent against hematological malignancies in which alterations in NK cells does exist. Therefore, our work focuses on the effect of Lenalidomide on NK cells from healthy volunteers to reference its immunomodulatory properties. We have sought after immunomodulatory effects of Lenalidomide towards proliferation, cytokine production, phenotype and cytotoxicity of NK cells.

2. Materials and methods

2.1. Reagents

Lenalidomide was obtained from Celgene (Summit, NJ) and dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO) at 4 mM. 5,6-carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE) was from Invitrogen (Carlsbad, CA). PKH67, EDTA and Brefeldin A were obtained from Sigma-Aldrich (Saint-Louis, MO). Purified recombinant human IL-12 (ImmunoTools, Friesoythe, Germany) and IL-18 (Invitrogen) were reconstituted in sterile water at 100 µg/mL (endotoxin level is less than 0.1 ng/µg). Recombinant human IL-2 was given by Sanofi-Aventis (Toulouse, France).

2.2. Monoclonal antibodies

Pacific Blue-coupled monoclonal antibody (mAb) against CD3 (UCHT1) was from Biolegend (San Diego, CA). Phycoerythrin-cyanine (PC)5-coupled mAb against CD56 (N901), phycoerythrin (PE)-coupled mAbs against NKp30 (Z25), NKp44 (Z231), CD94 (HP-3B1), NKG2A (Z199), CD16 (3G8), NKG2D (ON72), ILT2 (HP-F1) and CD158ah (EB6B) were from Beckman Coulter (Fullerton, CA). PE-coupled mAbs against NKp46 (9E2), NKB1 (DX9) and NKAT2 (DX27), and allophycocyanin (APC)-coupled mAb against IFN-γ (B27) were from BD Bioscience (San Jose, CA). Appropriate isotypic controls were used. Flow cytometry was performed with a BD LSR-II device and results were analyzed with FACS Diva 6.0.

2.3. Cell lines, cell isolation and culture

Fresh blood samples were collected from healthy donors and PBMC were prepared on a Ficoll-Paque density gradient (GE Healthcare, Uppsala, Sweden). PBMC were cultured in complete RPMI-1640 medium, *i.e.* supplemented with 10% of heat-inactivated Fetal Calf Serum (FCS), 1mM sodium pyruvate and 2 mM L-glutamine (Invitrogen), 100 U/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin (Cambrex East Rutherford, NJ).

Highly pure CD3⁻CD56⁺ NK cells (> 90%, as checked by flow cytometry) were negatively selected by magnetically NK cell isolation kit II (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) according to the manufacturer's instructions.

Daudi is a Burkitt's lymphoma cell line (ATCC number CCL-213) which is β2-microglobulin deficient. The β2-microglobulin-transfected Daudi (Daudi-β2m) cell line was a kind gift from Anne Quillet-Mary [15].

P815, mouse mastocytoma cell line (ATCC number TIB-64) were cultured in DMEM (Invitrogen) supplemented with 5% FCS, 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin and 2mM L-glutamine.

2.4. Proliferation assay

5.10⁶ of specified cells were labelled with 1 µM CFSE in 1 mL of PBS for 10 min at 37°C. FCS is added to stop the reaction, and cells were washed three times. 2.10⁵ CFSE labelled-cells had been cultured for 7 or 8 days in 96-well U-bottom plates in the presence of 300 U/mL of IL-2 and Lenalidomide 5 µM or control DMSO. Then, cells were labelled with anti-CD3 and anti-CD56 mAbs. The percentage of proliferative NK cells was measured by CFSE dilution by flow cytometry.

2.5. Cytokine production

2.10⁵ purified NK cells had been cultured in 200 µL of complete medium in 96-well U-bottom plates in the presence of indicated cytokines (mix of IL-12 and IL-18) for 24 hr. When indicated, Lenalidomide 5 µM was added in the cultured medium from the beginning. Brefeldin-A had been added for the last 4 hours at 10 µg/mL final. Then, cells were stained with anti-CD3 and anti-CD56 mAbs, washed with PBS, fixed with 50 µL of PBS 2% paraformaldehyde for 10 min at room temperature (RT) and permeabilized with PBS-5%FCS-

0,1% saponin for 30 min at RT. Finally, NK cells had been stained for 30 min in PBS 1% saponin with a mAb directed against IFN- γ .

2.6. Trogocytosis

Purified NK cells were incubated 5 days with Lenalidomide 5 μ M or control DMSO. Membranes of Daudi and Daudi- β 2m cell lines were stained with the lipophilic green-emitting dye PKH67 according to the manufacturer's instruction manual. They were then co-incubated with NK cells in 96-well U-bottom culture plates at an effector / target cell ratio of 2 / 1. Cells were pelleted by gentle centrifugation (110 g for 2 min) and left in co-incubation for either 3 min (control) or 4 hr, then washed with PBS / EDTA 0.5 mM to dissociate conjugates. Synaptic transfer was measured as the acquisition of PKH67 fluorescence from the PKH67⁺-labeled target cells by NK cells. Results were expressed as the ratio of the Mean of Fluorescence Intensity (MFI) acquired by effector cells between 4 hr and 3 min of incubation [16].

2.7. NK cell cytotoxicity

Purified NK cells were incubated 5 days with Lenalidomide 5 μ M or control DMSO. Target cells (Daudi or Daudi- β 2m) had been labelled with 100 μ Ci ⁵¹Cr-sodium bichromate (Perkin Elmer, Waltham, MA) for 45 min, cells were then washed 3 times. NK cell cytotoxicity against either Daudi or Daudi- β 2m cell line was evaluated with a standard 4 hr ⁵¹Cr-release assay at the indicated effector / target cell ratios. Radioactivity of supernatants was measured with MicroBeta TriLux (Perkin Elmer). The percentage of specific lysis was calculated as follows: $[(^{51}\text{Cr release}) - (\text{spontaneous release})] / [(\text{maximum release}) - (\text{spontaneous release})] \times 100$.

For the redirected lysis assays, 2.10^6 P815 cells were labelled in 100 μ l with 100 μ Ci of ⁵¹Cr for 1 hr. Then, 0.5×10^6 P815 cells were incubated in 250 μ l of PBS containing 5 μ g/ml of anti-NKp46 mAb (clone 195314) or 5 μ g/ml of IgG2b isotype control (R&D systems, Minneapolis, MN) for 30 min at room temperature and washed once with PBS. Finally, NK cells and target cells were coincubated for a standard 4 hr ⁵¹Cr release assay at the indicated ratios.

2.8. Statistical analysis and Mean Fluorescence Intensity conversion

Significant differences were assessed by paired Student's *t*-test (for normal distributions) or Wilcoxon's signed rank test (for other distributions) with $\alpha = 0.05$ with the SigmaStat software (Systat Software Inc., Chicago, IL). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. Some flow cytometry results are expressed as Molecules of Equivalent Soluble Fluorochrome (MESF) units as described in the Quantum™ R-PE and PE-Cy5 MESF kits (Bangs Laboratories, Fishers, IN). These kits allow for the direct quantification of the fluorescence intensity of a sample in terms of number of MESF.

3. Results

3.1. Lenalidomide does not enhance the proliferation of NK cells but can inhibit their production of IFN- γ

IL-2-activated PBMC from healthy donors were cultured for 7 days in the presence of Lenalidomide or with DMSO as a control. Among PBMC, NK cells were gated due to their CD3⁻ CD56⁺ phenotype and their proliferation was assessed by the analysis of the dilution of CFSE by flow cytometry. A proliferative NK cell was considered if it had divided at least once [17]. The presence of DMSO did not modify the proliferation of NK cells (**fig. 1A**). Data from 9 healthy donors were compiled and showed that Lenalidomide between 0.1 and 5 μ M had no effect on the proliferation of NK cells (**fig. 1B**).

Then, we tested the effect of Lenalidomide on the production of IFN- γ by purified NK cells. IFN- γ is classically induced by triggering NK cells with a mix of IL-12 and IL-18 [18]. Production of IFN- γ by NK cells was evaluated by flow cytometry after an intracellular staining of the cytokine (**fig. 1C**). The rate of IFN- γ producing NK cells was measured, and the MFI was considered to quantify IFN- γ in these cells. When added at 5 μ M, Lenalidomide did not modify the percentage of IFN- γ producing NK cells but significantly inhibited the quantity of IFN- γ accumulated in IFN- γ producing NK cells (**fig. 1C**).

3.2. Lenalidomide modifies the expression of inhibitory and activating NK receptors

We compared the level of expression of inhibitory and activating NK receptors using the MESF unit to have a reliable time-to-time quantification among donors. Regarding the KIR family, the NKAT2 antigen encompasses two inhibitory receptors (KIR2DL2, KIR2DL3) and their paired activating receptor (KIR2DS2). The NKB1 antigen corresponds to the inhibitory KIR3DL1 receptor, and CD158ah antigen accounts for the inhibitory KIR2DL1 and its activating KIR2DS1 paired receptor. To assess the global expression of KIRs by NK cells from Lenalidomide-treated PBMC, we used a mix of the three monoclonal antibodies against NKAT2, NKB1 and CD158ah. **Fig. 2A** shows a significant decrease of the expression of these KIRs by NK cells when PBMC were treated during 5 days by 5 μ M of Lenalidomide. To depict the respective part of each antigen in this decrease, we also assayed the expression of each KIR separately. We observed a significant decrease of the expression of NKAT2 (**fig. 2B**), NKB1 (**fig. 2C**) and, to a less extent, of CD158ah (**fig. 2D**). On the contrary, Lenalidomide had effect neither on the expression of the lectin-like inhibitory heterodimer CD94-NKG2A (**fig. 2E and 2F**) nor on the expression of ILT2 (CD85j, LIR1).

Concerning the cytotoxic receptors, we analyzed the expression of the major NK receptor families: the lectin-like type II transmembrane homodimer NKG2D, the Fc γ RIII receptor CD16 and Natural Cytotoxicity Receptors (NCR; NKp30, NKp44, NKp46). Among them, only NKp46 was significantly under-expressed, although slightly, on NK cells after treatment by 5 μ M of Lenalidomide (**fig. 2, from panel G to panel L**). Finally, we examined the expression of CD56 and found that it is significantly over-expressed by NK cells from Lenalidomide-treated PBMC (**fig. 2M**).

In order to eliminate the hypothesis of a by-stander effect mediated by some particular sub-population of PBMC, we confirmed the direct effect of Lenalidomide on the phenotype of purified NK cells. We show that Lenalidomide exerted a direct effect on the expression of CD56 by NK cells (**fig. 2N**). We followed up the evolution of the expression of KIRs (with a mix of monoclonal antibodies against NKAT2, NKB1 and CD158ah) from day 0 to day 5 using the MESF unit. For three healthy donors, incubation of purified NK cells with 5 μ M of Lenalidomide led to the decrease of the expression of KIRs from day 2 (**fig. 3A**). We then depicted the direct effect of Lenalidomide on NK cells regarding the expression of NKAT2, NKB1 and CD158ah. We showed that NKAT2 and NKB1, but not CD158ah, were significantly under-expressed (**fig. 3B**). Finally, we assessed the dose-effect of Lenalidomide (between 0.1 and 10 μ M) on the expression of KIRs and showed that it displays a statistically significant effect at 5 μ M (**fig. 3C**).

3.3. Inhibition of the expression of KIRs on NK cells is not sufficient to potentiate their cytotoxic function

In order to exert their cytotoxic activity, NK cells need to interact tightly with their putative target cells. During this period of contact, the effector cell interacts with the surface of its partner and takes thereof membrane patches (this phenomenon is known as trogocytosis) [16]. It has been shown that the balance between the triggering of activating and inhibitory receptors of NK cells determines both trogocytosis and killing of target cells [19]. To evaluate the consequences of the decrease of KIR expression induced by Lenalidomide, we compared trogocytosis and lysis by Lenalidomide-treated and untreated NK cells against the Burkitt's lymphoma Daudi cell line and the Daudi- β 2m cell line. Daudi cells don't express MHC-class I molecules, the ligands of KIRs, whereas Daudi- β 2m cells do [15]. Membrane of the target cells was labeled with a fluorescent lipophilic dye. Trogocytosis was measured by flow cytometry. **Fig. 4A** shows the ratio between MFI of NK cells after 1 hr and 3 min (control) of contact. As awaited, purified NK cells performed higher trogocytosis with Daudi cell line than with Daudi- β 2m cell line, due to the expression of ligands of MHC-class I molecules by the latter. Pre-incubation of purified NK cells with 5 μ M of Lenalidomide during 5 days prior to trogocytosis experiments did not modify trogocytosis of target cells expressing MHC-class I molecules (**fig. 4A**).

Standard assays of specific lysis based on ^{51}Cr -release by target cells (Daudi and Daudi- β 2m) were performed with NK cells purified from 4 donors (**fig. 4B**). As awaited, the specific lysis of Daudi cell line was higher than that of Daudi- β 2m and the treatment of NK cells by 5 μ M of Lenalidomide did not modify the specific lysis of the Daudi cell line. Unfortunately, it did not modify either the specific lysis of Daudi- β 2m cell line.

3.4. Inhibition of the expression of NKp46 on NK cells is not sufficient to impair their cytolytic function

First, we checked the direct effect of Lenalidomide on the expression of NKp46 on purified NK cells (**fig. 5A**). Then, we evaluated the effect of the lower expression of NKp46 induced by Lenalidomide on the specific lysis of P815 mastocytoma mouse cell line in a standard assay redirected by a mAbs against NKp46. The measurement was based on the release of ^{51}Cr . **Fig. 5B** shows that the weaker expression of NKp46 by NK cells after treatment with 5

μM of Lenalidomide was not sufficient to impair their cytotoxicity triggered through this particular NCR.

4. Discussion

In this study we searched for a direct effect of Lenalidomide on NK cells from normal donors. At first, we show that Lenalidomide, in a range of 0.1-5 μM , has no direct effect on the proliferation of NK cells. Therefore, our results strengthen the hypothesis that Lenalidomide stimulates NK cell proliferation *via* the increased production of IL-2 by T cells [13], on which Lenalidomide acts as a costimulatory signal [12]. Regarding the production of IFN- γ , we show that Lenalidomide is able to significantly impair the production of IFN- γ by purified NK cells. Thus, from this point of view, Lenalidomide has opposite properties on T cells [20] and on NK cells (our work) from healthy donors.

In a second part, we analyzed the effect of Lenalidomide on the phenotype of NK cells. On the one hand, we observed a significant down-regulation of the expression of KIRs. This was observed on NK cells cultured with all PBMC and on purified NK cells, indicating a direct effect of the drug. The KIR family mainly encompasses cytotoxicity inhibitory receptor, but also activating receptors, whose ligands are MHC-class I molecules. Using the Daudi- $\beta 2\text{m}$ cell line, which is positive for the expression of MHC-class I molecules, we did not detect an increase on the specific lysis of this target by Lenalidomide-treated NK cells. This disappointing result can be due to an insufficient decrease of the expression of KIRs. A haplotype mismatch between the NK cells we have purified and the target cell line may be also invoked.

On the other hand, we have shown that Lenalidomide mitigates the expression of the NCR NKp46. Nevertheless, the significant decrease of the expression of this cytotoxicity activating receptor is probably not sufficient to induce a decrease of the cytotoxic potential of Lenalidomide-treated NK cells, as investigated in a redirected lysis assay.

Finally, we have evidenced that Lenalidomide instigates an over-expression of CD56 on NK cells in absence of additional IL-2. Previously, it was shown that in PBMC treated by Lenalidomide, NK cells undergo an increase of the expression of CD56 [21]. This preliminary observation could rely on the indirect effect of Lenalidomide *via* the increased production of IL-2 by T cells. Here we show that it is also a direct effect of Lenalidomide. Surprisingly, the increase of CD56 should afford a NK cell population with an augmented production of

cytokines, particularly of IFN- γ [22]. This can be due to two distinct effects of Lenalidomide on human NK cells.

Lenalidomide is an anti-cancer drug developed recently whose mechanism of action is multifactorial. Undoubtedly, it involves immunomodulation of effector immune cells, comprising NK cells. This latter population plays a key role in fighting against almost all hematologic malignancies. Thus, the effects - direct or indirect - of anti-cancer drugs such as Lenalidomide towards NK cells need to be delineated and our results contribute thereto.

Acknowledgements

The authors thank Celgene Corporation for providing Lenalidomide. This study was performed with financial support from the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) and from the university Paul Sabatier of Toulouse.

References

- [1] S.K. Teo, D.I. Stirling, J.B. Zeldis, Thalidomide as a novel therapeutic agent: new uses for an old product, *Drug Discovery Today* 10 (2005) 107-114.
- [2] J.B. Bartlett, K. Dredge, A.G. Dalglish, The evolution of thalidomide and its ImiD derivatives as anticancer agents, *Nature Rev. Cancer* 4 (2004) 314-322.
- [3] C. Galustian, A. Dalglish, Lenalidomide: a novel anticancer drug with multiple modalities, *Expert Opin. Pharmacother.* 10 (2009) 125-133.
- [4] P.G. Richardson, R.L. Schlossman, E. Weller, T. Hideshima, C. Mitsiades, F. Davies, R. LeBlanc, L.P. Catley, D. Doss, K. Kelly, M. McKenney, J. Mechlowicz, A. Freeman, R. Deocampo, R. Rich, J.J. Ryoo, D. Chauhan, K. Balinski, J. Zeldis, K.C. Anderson, Immunomodulatory drug CC-5013 overcomes drug resistance and is well tolerated in patients with relapsed multiple myeloma, *Blood* 100 (2002) 3063-3067.
- [5] J.P. Laubach, C.S. Mitsiades, A. Mahindra, R.L. Schlossman, T. Hideshima, D. Chauhan, N.A. Carreau, I.M. Ghobrial, N. Raje, N.C. Munshi, K.C. Anderson, P.G. Richardson, Novel therapies in the treatment of multiple myeloma, *J. Natl. Compr. Canc. Netw.* 7 (2009) 947-960.

- [6] A. List, S. Kurtin, D. J. Roe, A. Buresh, D. Mahadevan, D. Fuchs, L. Rimsza, R. Heaton, R. Knight, J.B. Zeldis, Efficacy of lenalidomide in myelodysplastic syndromes. *N. Engl. J. Med.* 352 (2005) 549-557.
- [7] J. Ortega, A. List, Immunomodulatory drugs in the treatment of myelodysplastic syndromes, *Curr. Opin. Oncol.* 19 (2007) 656-659.
- [8] A. Chanan-Khan, K.C. Miller, L. Musial, D. Lawrence, S. Padmanabhan, K. Takeshita, C.W. Porter, D.W. Goodrich, Z.P. Bernstein, P. Wallace, D. Spaner, A. Mohr, C. Byrne, F. Hernandez-Ilizaliturri, C. Chrystal, P. Starostik, M.S. Czuczman, Clinical efficacy of lenalidomide in patients with relapsed or refractory chronic lymphocytic leukemia: results of a phase II study, *J. Clin. Oncol.* 24 (2006) 5343-5349.
- [9] S. Molica, Immunomodulatory drugs in chronic lymphocytic leukemia: a new treatment paradigm, *Leuk. Lymphoma* 48 (2007) 866-869.
- [10] T.K. Choueiri, R. Dreicer, B.I. Rini, P. Elson, J.A. Garcia, S.G. Thakkar, R.C. Baz, T.M. Mekhail, H.A. Jinks, R.M. Bukowski, Phase II trial of lenalidomide in patients with metastatic renal cell cancer, *Cancer* 107 (2006) 2609-2616.
- [11] E.P. Sampaio, E.N. Sarno, R. Galilly, Z.A. Cohn, G. Kaplan, Thalidomide selectively inhibits tumor necrosis factor alpha production by stimulated human monocytes, *J. Exp. Med.* 173 (1991) 699-703.
- [12] P.A. Haslett, L.G. Corral, M. Albert, G. Kaplan, Thalidomide costimulates primary human T lymphocytes, preferentially inducing proliferation, cytokine production and cytotoxic responses in the CD8+ subset, *J. Exp. Med.* 187 (1998) 1885-1892.
- [13] F.E. Davies, N. Raje, T. Hideshima, S. Lentzsch, G. Young, Y.T. Tai, B. Lin, K. Podar, D. Gupta, D. Chauhan, S.P. Treon, P.G. Richardson, R.L. Schlossman, G.J. Morgan, G.W. Muller, D.I. Stirling, K.C. Anderson, Thalidomide and immunomodulatory derivatives augment natural killer cell cytotoxicity in multiple myeloma, *Blood* 98 (2001) 210-216.
- [14] T. Hayashi, T. Hideshima, M. Akiyama, K. Podar, H. Yasui, N. Raje, S. Kumar, D. Chauhan, S.P. Treon, P. Richardson, K.C. Anderson, Molecular mechanisms whereby immunomodulatory drugs activate natural killer cells: clinical application, *Br. J. Haematol.* 128 (2005) 192-203.
- [15] A. Quillet, F. Presse, C. Marchiol-Fournigault, A. Harel-Belan, M. Benbunan, H. Ploegh, D. Fradelizi, Increased resistance to non-MHC-restricted cytotoxicity related to HLA A, B expression. Direct demonstration using beta 2-microglobulin-transfected Daudi cells, *J. Immunol.* 141 (1998) 17-20.

- [16] M. Poupot, J.J. Fournié, R. Poupot, Trogocytosis and killing of IL4-polarized monocytes by autologous NK cells, *J. Leukoc. Biol.* 84 (2008) 1298-1305.
- [17] D. Portevin, M. Poupot, O. Rolland, C.O. Turrin, J.J. Fournié, J.P. Majoral, A.M. Caminade, R. Poupot, Regulatory activity of azabisphosphonate-capped dendrimers on human CD4⁺ T cell proliferation enhances ex-vivo expansion of NK cells from PBMCs for immunotherapy, *J. Transl. Med.* 7 (2009) 82-94.
- [18] T.A. Fehniger, M.H. Shah, M.J. Turner, J.B. VanDeusen, S.P. Whitman, M.A. Cooper, K. Suzuki, M. Wechser, F. Goodsaid, M.A. Caligiuri, Differential cytokine and chemokine gene expression by human NK cells following activation with IL-18 or IL-15 in combination with IL-12: implications for the innate immune response, *J. Immunol.* 162 (1999) 4511-4520.
- [19] J. Tabiasco, E. Espinosa, D. Hudrisier, E. Joly, J.J. Fournié, A. Vercellone, Active trans-synaptic capture of membrane fragments by natural killer cells, *Eur. J. Immunol.* 32 (2002) 1502-1508.
- [20] L.G. Corral, P.A.J. Haslett, G.W. Muller, R. Chen, L.M. Wong, C.J. Ocampo, R.T. Patterson, D.I. Stirling, G. Kaplan, Differential cytokine modulation and T cell activation by two distinct classes of thalidomide analogues that are potent inhibitors of TNF- α , *J. Immunol.* 163 (1999) 380-386.
- [21] D. Zhu, L.G. Corral, Y.W. Fleming, B. Stein, Immunomodulatory drugs Revlimid® (lenalidomide) and CC-4047 induce apoptosis of both hematological and solid tumor cells through NK cell activation, *Cancer Immunol. Immunother.* 57 (2008) 1849-1859.
- [22] M.A. Cooper, T.A. Fehniger, M.A. Caligiuri, The biology of human natural killer-cell subsets, *Trends Immunol.* 22 (2001) 633-640.

Figure legends

Fig. 1. Lenalidomide does not enhance the proliferation of NK cells but can inhibit their production of IFN- γ . (A) Effect of 5 μ M Lenalidomide on the IL2-induced proliferation of NK cells among PBMC measured by CFSE dilution (first histogram: IL-2 alone, second histogram: DMSO control, third histogram: 5 μ M Lenalidomide), one representative experiment among 9. (B) Compilation of results of IL2-induced proliferation of NK cells among PBMC treated by Lenalidomide (black bars) or not (white bars). Percentages represent the proportion of NK cells that have divided at least once. Error bars show SD of 9 independent experiments. (C) Dot plots of purified NK cells triggered by 1 ng/ml of rhIL-12 and 10 ng/ml of rhIL-18. The vertical bar separates the IFN- γ producing NK cells from the non-producing ones. First series of histograms shows the evolution of the percentages of IFN- γ producing NK cells (after stimulation with 1 ng/ml of rhIL-12 and 10 or 100 ng/ml of rhIL-18) treated by 5 μ M Lenalidomide (black bars) or control DMSO (white bars). Second series of histograms shows MFI of intracellular staining of IFN- γ in IFN- γ producing NK cells (after stimulation with 1 ng/ml of rhIL-12 and 10 or 100 ng/ml of rhIL-18) treated by 5 μ M Lenalidomide (black bars) or control DMSO (white bars).

Fig. 2. Lenalidomide modifies the expression of inhibitory and activating NK receptors. PBMCs were treated with 5 μ M of Lenalidomide (filled squares) or control DMSO (open squares). (A–N) The expression of the different inhibitory and activating receptors, as well as CD56, on NK cells was examined by flow cytometry by gating the NK cell population. MFI are expressed in MESF units. (A) KIRs are detected by NKAT2 + NKB1 + CD158ah mAbs. (B) NKAT2 mAb recognizes KIR2DL2, KIR2DL3 and KIR2DS2. (C) NKB1 mAb recognizes KIR3DL1. (D) CD158ah recognizes KIR2DL1 and KIR2DS1. (N) shows the direct effect of lenalidomide on the expression of CD56 by purified NK cells.

Fig. 3. Lenalidomide directly downregulates KIR expression on purified NK cells. (A) Monitoring of the KIR expression (NKAT2 + NKB1 + CD158ah mAbs) on purified NK cells of 3 donors from day 0 to day 5. (B) NK cells were treated by 5 μ M of Lenalidomide (filled squares) or control DMSO (open squares). The expression of KIRs was detected with the mix of NKAT2 (KIR2DL2, KIR2DL3 and KIR2DS2), NKB1 (KIR3DL1) and CD158ah mAbs (KIR2DL1 and KIR2DS1), or with each mAb separately. MFI from the positive NK cell

populations are expressed in MESF units. (C) Lenalidomide dose-dependent expression of KIRs by purified NK cells. Results are shown for 3 donors. The statistical significance is calculated with a paired *t*-test between DMSO control and each Lenalidomide concentration.

Fig. 4. Inhibition of the expression of KIRs on NK cells is not sufficient to potentiate their cytotoxic function. (A) Trogocytosis (MFI PKH67 1h / MFI PKH67 3 min) of PKH67 labeled Daudi or Daudi- β 2m cells by purified NK cells from four donors treated by 5 μ M Lenalidomide (filled bars) or control DMSO (white bars). (B) Specific lysis of Daudi (solid lines) or Daudi- β 2m cells (dashed lines) by purified NK cells from 4 donors treated by 5 μ M Lenalidomide (black squares) or control DMSO (white squares) measured by 51 Cr-release assay.

Fig. 5. Inhibition of the expression of NKp46 on NK cells is not sufficient to impair their cytolytic function. (A) Analysis by flow cytometry of NKp46 expression of purified NK cells from 8 donors treated by 5 μ M Lenalidomide (black squares) or control DMSO (white squares). (B) Redirected lysis of P815 mouse cell line by purified NK cells from 8 donors treated by 5 μ M Lenalidomide (black squares) or control DMSO (white squares) *via* an anti-NKp46 mAb (solid lines). Control using an isotype-matched mAb is shown with dashed lines. Error bars show SD of 8 independent experiments.

Figures

FIGURE 1.

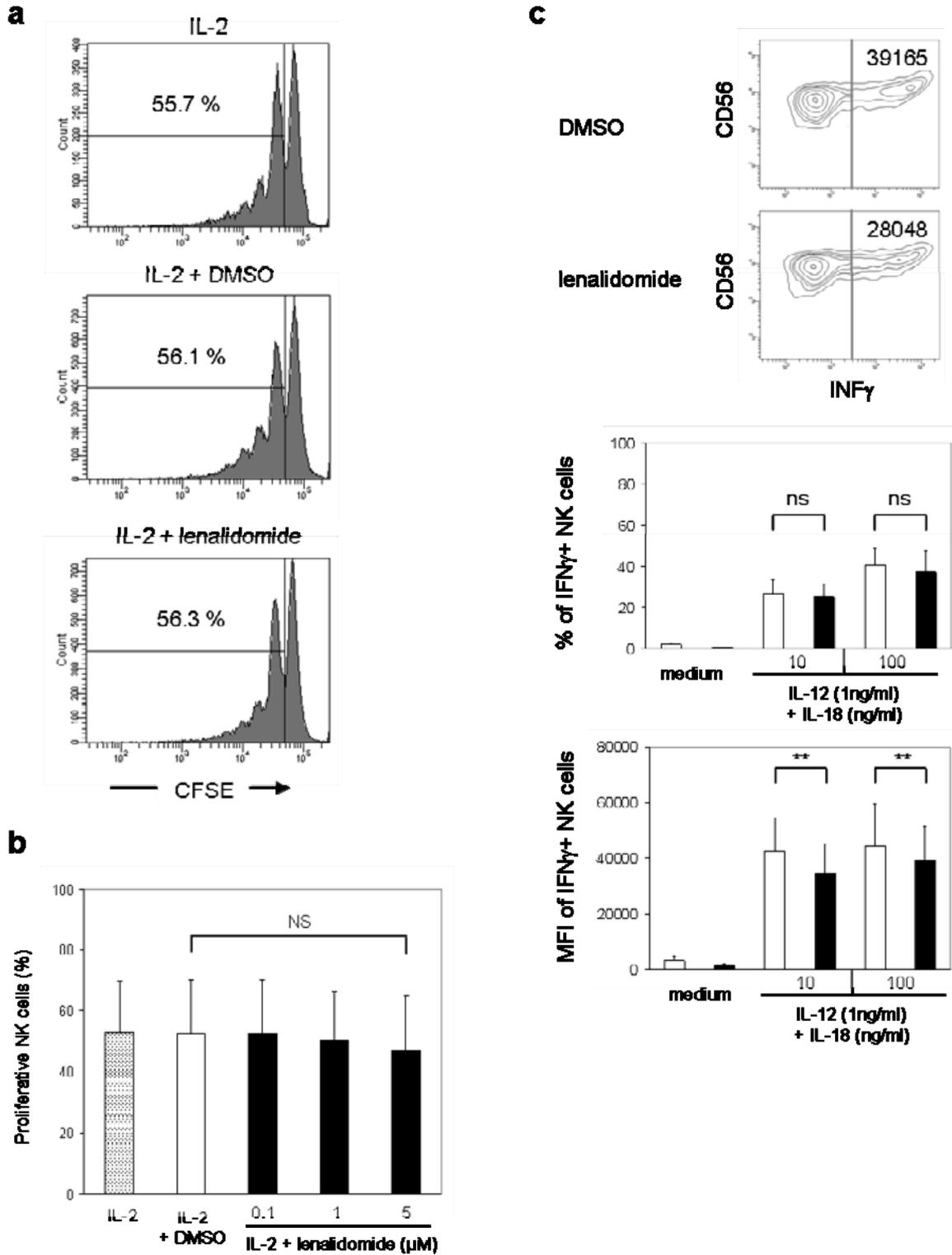


FIGURE 2.

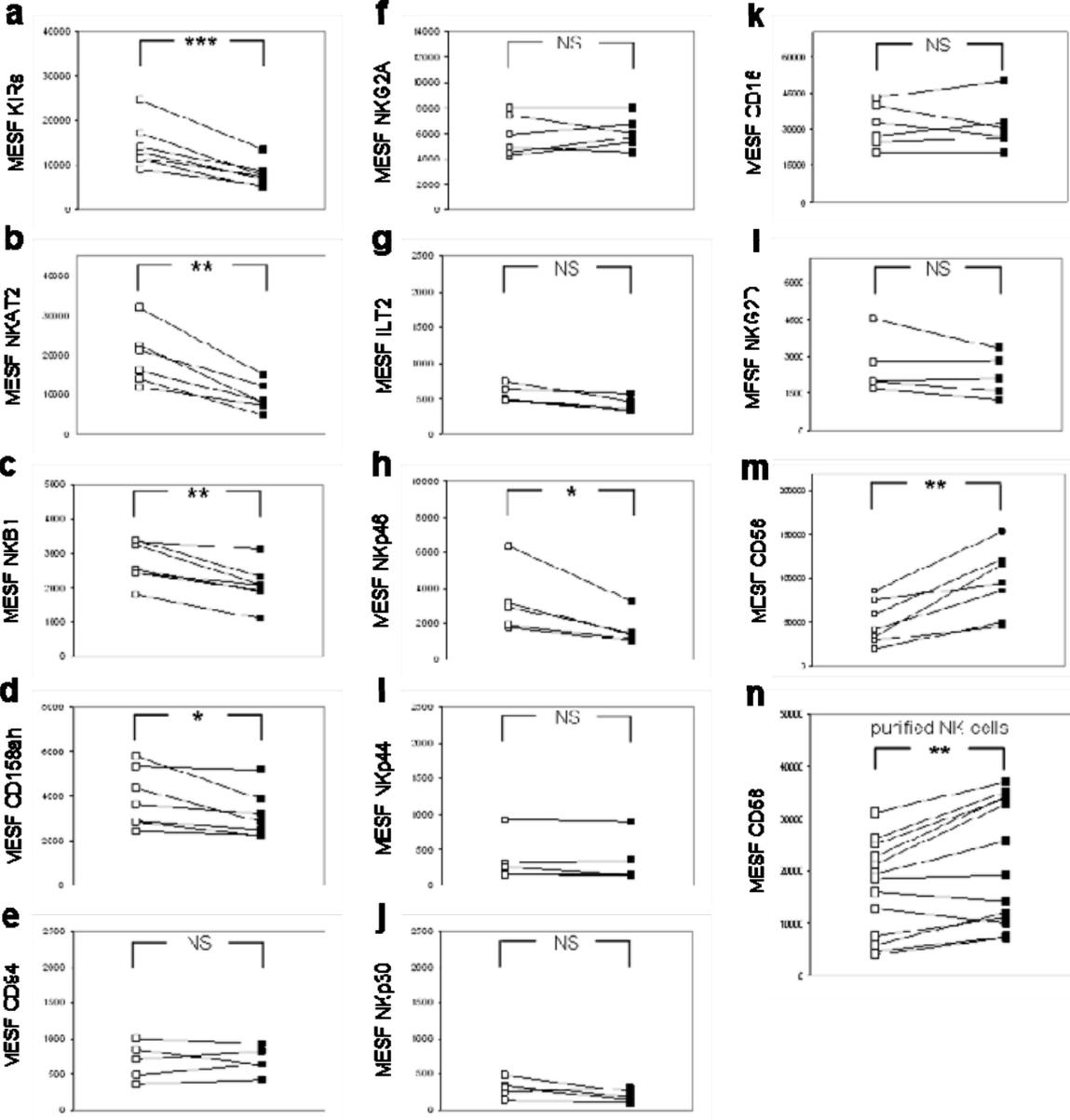


FIGURE 3.

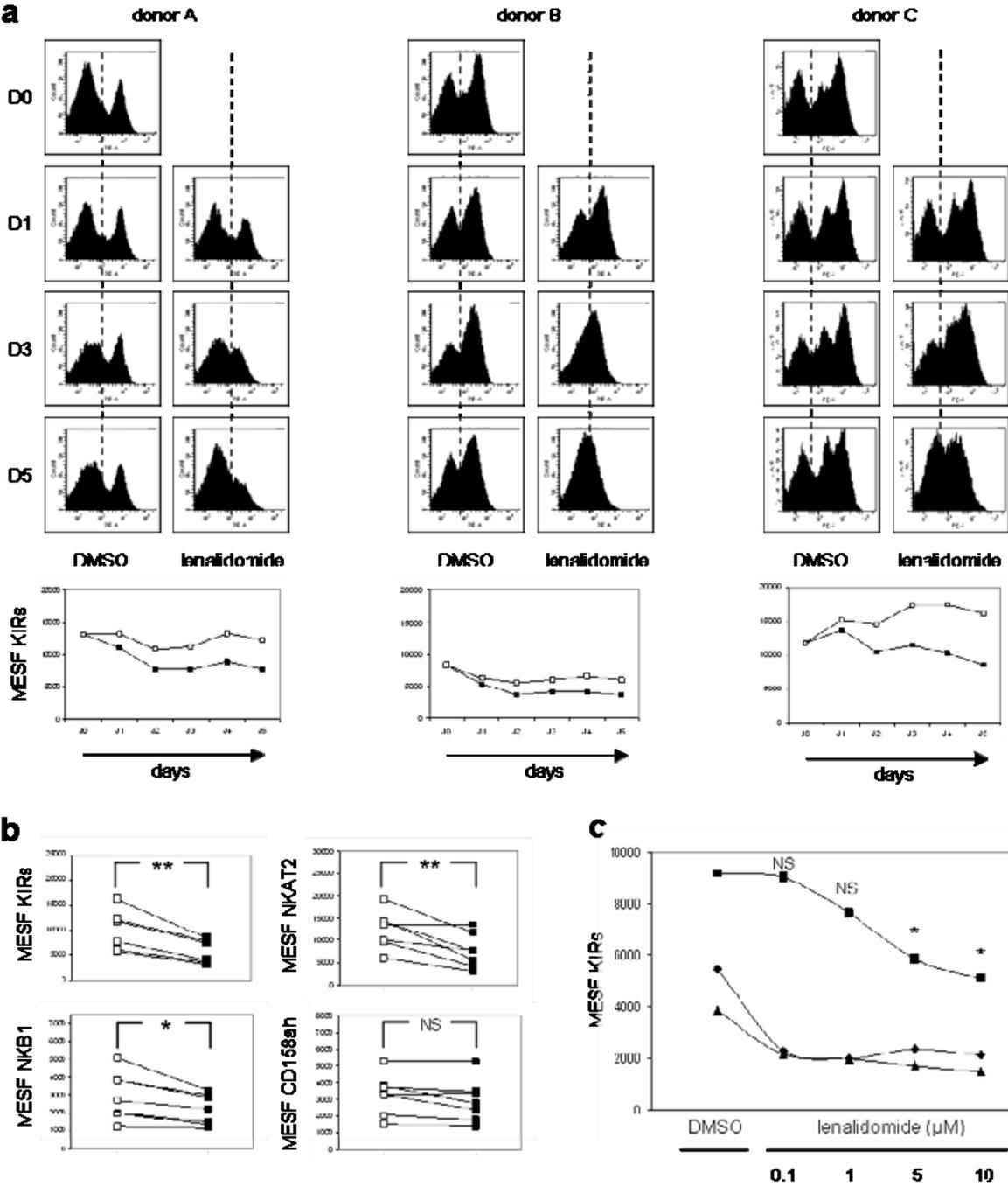


FIGURE 4.

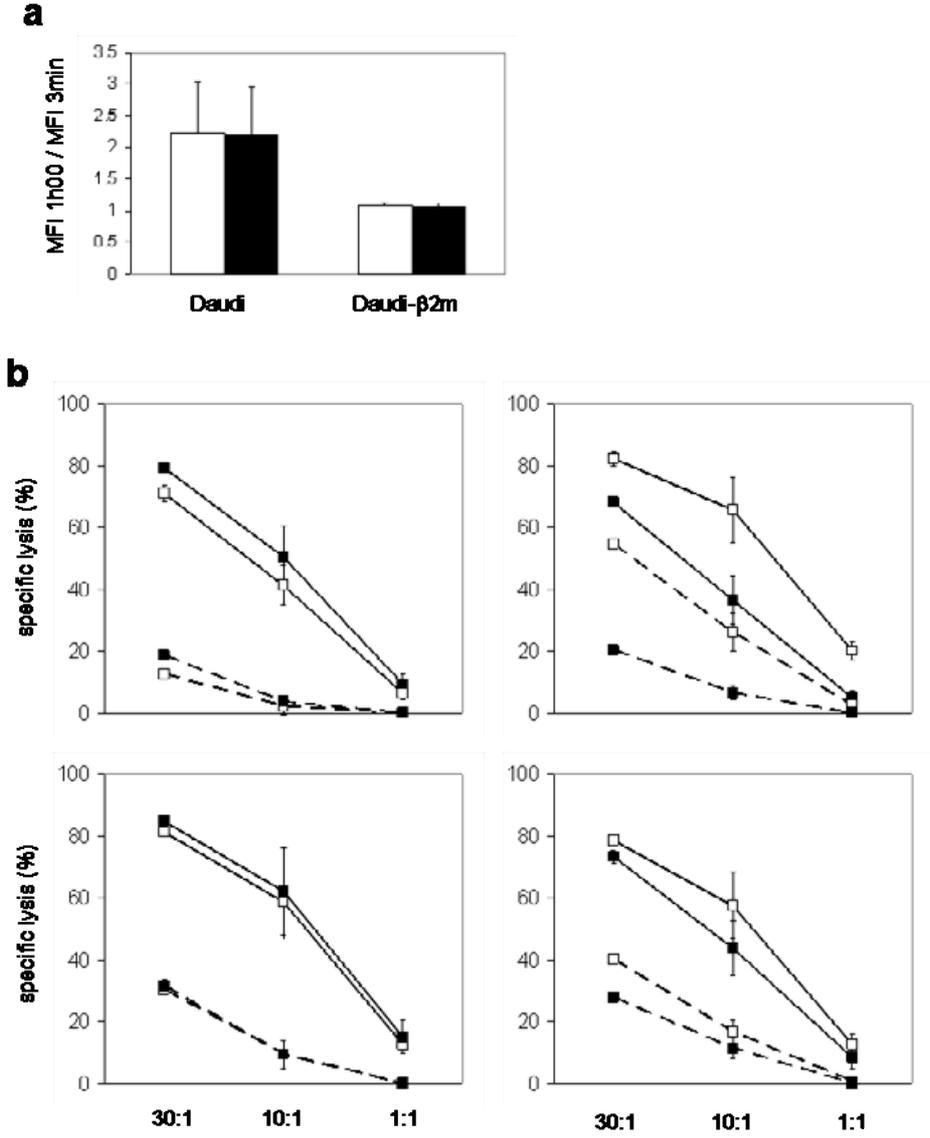
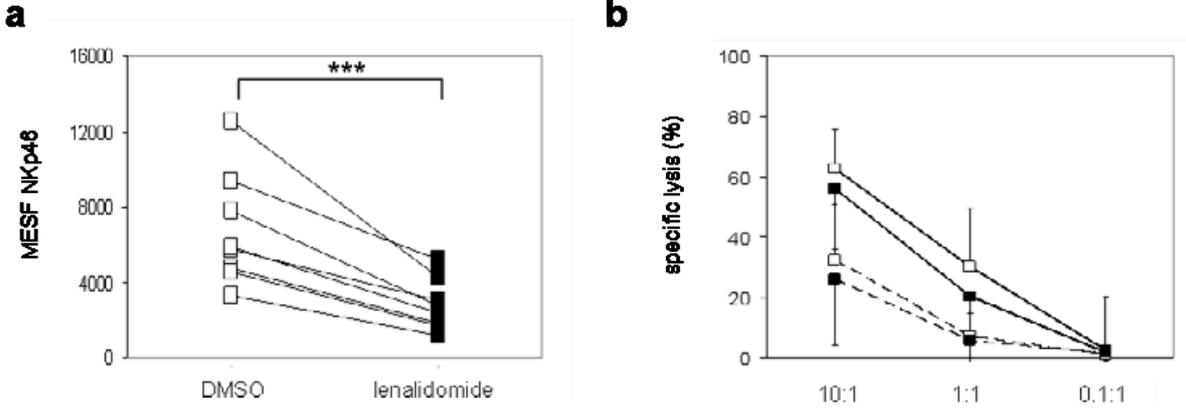


FIGURE 5.



Conclusion et discussion

L'utilisation du lenalidomide a permis d'obtenir des résultats cliniques probants, notamment pour le traitement du myélome multiple (Dimopoulos et al., 2008) et des syndromes myélodysplasiques possédant la del(5q) (List, 2009). Cependant les mécanismes d'action rendant compte de cette efficacité clinique sont à l'heure actuelle encore peu connus. Son action anti-tumorale directe apparaît limitée en regard de ses nombreux effets sur l'environnement tumoral. En effet, le lenalidomide possède diverses propriétés immunomodulatrices et a également, la capacité de perturber, à plusieurs niveaux, les interactions entre les cellules tumorales et les cellules stromales (Quach et al., 2010). Une des principales propriétés immunomodulatrices du lenalidomide est son action costimulatrice des lymphocytes T. Cette costimulation favorise la production d'IFN- γ et d'IL-2 et augmenterait ainsi la cytotoxicité des cellules NK (Davies et al., 2001). Jusqu'à présent aucun effet direct du lenalidomide ou des IMiD® en général, n'a été montré sur les cellules NK.

Nos travaux mettent en évidence une action directe du lenalidomide sur les cellules NK de donneurs sains. En effet, nous avons montré que le lenalidomide diminuait l'expression des KIR. Néanmoins, ce phénotype n'a pas d'impact sur la lyse spécifique de la lignée daudi- β 2m. Nous ne pouvons cependant pas exclure qu'une incompatibilité, entre les KIR exprimés par les cellules NK et les molécules du CMH-I exprimées par la lignée daudi- β 2m, puisse influencer le résultat obtenu. Afin de tester cette hypothèse, il est possible de mener un test de lyse très restrictif entre une cible exprimant un seul type de molécule du CMH-I et des cellules NK d'un donneur exprimant le KIR inhibiteur correspondant.

L'expression des KIR dans la population caucasienne peut être divisée en deux haplotypes nommés A et B. L'haplotype A contient 7 loci : 2DL1, 2DL3, 2DL4, 3DL1, 3DL2, 3DL3 et 2DS4. La plus grande différence entre les haplotypes A et B est le nombre de gènes codant les récepteurs activateurs. En effet, l'haplotype A ne contient qu'un unique gène codant une molécule activatrice, 2DS4. En revanche, l'haplotype B se caractérise par l'expression supplémentaire de combinaisons variées de molécules activateurs 2DS1, 2DS2, 2DS3, 2DS4 et 3DS1 (**Figure 33**).

		KIR haplotype									Gene frequency (%)			
		A	B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8	B9	A + B haplo- types	A haplo- types	B haplo- types
KIR gene	2DL4											100	100	100
	2DL5											27.4	0	69.1
	3DL1 3DS1	L	L	L	S	S	S	S	L	L	L	88.8 11.2	100 0	71.7 28.3
	3DL2											100	100	100
	2DL1											96.9	100	92.1
	2DL2 2DL3	3	2	2	2	2	2	3	2	2	2	36.6 63.4	0 100	92.1 7.9
	2DS1											19.0	0	47.9
	2DS2											36.6	0	92.1
	2DS3											15.5	0	39.0
	2DS4							?				88.8	100	71.7
	2DS5											8.7	0	21.9
	3DL3											100	100	100
	Haplotype frequency (%)	58.1	11.8	8.1	3.4	2.4	2.0	3.0	4.1	2.4	1.0			

Figure 33 Les KIR : haplotypes les plus fréquents de la population caucasienne. Adapté de (Parham, 2005).

Les gènes conservés entre les haplotypes A et B sont représentés en marron. Les gènes qui peuvent être présents dans les haplotypes A et B sont représentés en jaune et les gènes qui sont spécifiques aux haplotypes B sont représentés en bleu.

Sur la ligne des KIR3DL1 et KIR3DS1, le « L » indique la présence du KIR3DL1 et le « S » le KIR3DS1. Sur la ligne des KIR2DL2 et KIR2DL3, le « 2 » indique la présence de KIR2DL2 et le « 3 » celle de KIR2DL3. Ces KIR sont regroupés sur la même ligne car leur présence est exclusive.

Le « ? » indique l'incertitude quand à la présence du gène dans l'haplotype.

Pour le test de lyse restrictif, il serait ainsi possible de choisir un donneur exprimant un haplotype particulier en limitant la présence de KIR activateurs. Un donneur homozygote pour l'haplotype A et qui exprimerait le KIR3DL1 à la place du KIR3DS1 est une combinaison idéale (**figure 34**).

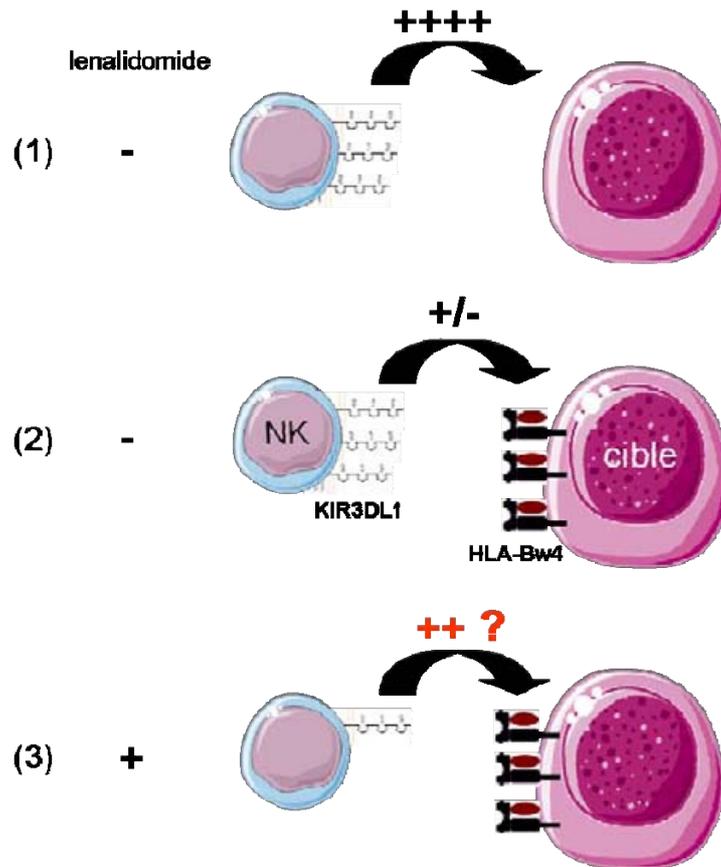


Figure 34 Test de lyse restrictif avec une association unique KIR inhibiteur/CMH-I

(1) La cible (exemple : cellule 721.221) n'exprime pas de CMH-I capables d'être reconnus par les KIR des cellules NK (ici KIR3DL1 sans expression du KIR3DS1, génotype A). (2) La cible est transfectée par un seul type de molécule du CMH-I (ici HLA-Bw4) capable de fournir un signal inhibiteur aux cellules NK. (3) La pré-incubation des cellules NK avec du lenalidomide diminue l'expression des KIR diminuant ainsi les signaux inhibiteurs reçus et permettant éventuellement d'augmenter la lyse

Nos résultats montrent également que le lenalidomide augmente directement l'expression du CD56 sur les cellules NK en absence d'IL-2 additionnel. Les cellules NK CD56^{bright} constituent la sous-population des cellules NK capable de produire des quantités élevées de cytokines comme l'IFN- γ (Cooper et al., 2001). Cependant, nos résultats mettent en évidence que le lenalidomide diminue l'expression de l'IFN- γ par les cellules NK stimulées par la combinaison IL-12 et IL-18. Ainsi, malgré l'augmentation de l'expression du CD56, nous ne sommes peut-être pas en présence d'une véritable population de cellules NK CD56^{bright} puisque la production d'IFN- γ est diminuée. Un autre élément important est que

nos données suggèrent un rôle opposé du lenalidomide sur les cellules NK et les cellules T concernant la production d'IFN- γ . En effet, sur cette dernière population, le lenalidomide augmente l'expression d'IFN- γ après stimulation par un anti-CD3 (Davies et al., 2001).

Dans un contexte pathologique, les études publiées par le groupe de Gribben montrent que les lymphocytes T de patients atteints de LLC, de lymphome folliculaire ou de LAM forment des synapses immunologiques défectueuses avec les cellules tumorales autologues. Seul le traitement des deux protagonistes (effecteur et cible) par le lenalidomide permet de rétablir une synapse immunologique fonctionnelle, avec notamment la polarisation de l'actine, pour la LLC et le lymphome folliculaire (Le Dieu et al., 2009; Ramsay et al., 2009; Ramsay et al., 2008). Dans le cadre des LAM, ces études n'ont pas évalué la capacité des cellules NK à effectuer une synapse lytique avec les cellules tumorales. Cependant, comme le lenalidomide semble également agir sur la cible pour favoriser la formation de la synapse lytique, il serait intéressant de déterminer les effets du lenalidomide sur l'expression des ligands des récepteurs NK par les cellules tumorales. Chez les patients atteints de LLC, l'utilisation du lenalidomide est associée à une flambée tumorale et un syndrome de lyse tumoral qui résulteraient d'une réponse immunitaire anti-tumorale induite par cet agent. Aue et collaborateurs montrent que lorsque des patients atteints de LLC sont traités par le lenalidomide, la flambée tumorale est associée à l'induction de l'expression de molécules de costimulation par les cellules de LLC ainsi qu'à l'activation des lymphocytes T (Aue et al., 2009). Le rôle que pourrait avoir les cellules NK dans l'apparition de ce syndrome n'a là encore pas été évalué.

Ces données mettent donc en avant la complexité d'action du lenalidomide sur une même population cellulaire mais également sur des populations immunitaires différentes. Des études complémentaires sont toutefois nécessaires pour déterminer avec précision les mécanismes d'actions du lenalidomide sur les cellules immunitaires dans un contexte pathologique.

2) Caractérisation phénotypique des effecteurs lymphoïdes cytotoxiques de patients atteints de leucémies aiguës myéloïdes en rémission complète après chimiothérapie d'induction

(soumis pour publication à American Journal of Hematology)

Pre-eminence and persistence of immature natural killer cells in acute myeloid leukemia patients in first complete remission

Nicolas Dauguet,¹ Christian Récher,² Jean-Jacques Fournié,¹ Mary Poupot,¹ and Rémy Poupot¹

¹INSERM, U.563, Centre de Physiopathologie de Toulouse-Purpan, Toulouse, F-31300 France; Université Paul-Sabatier, Toulouse, F-31400 France and ²Service d'Hématologie, CHU Purpan

Correspondence: Rémy Poupot, INSERM 563, Centre de Physiopathologie de Toulouse-Purpan, CHU Purpan, BP3028, 31024 Toulouse Cedex3, France. E-mail:

remy.poupot@inserm.fr

The authors would like to thank Dr. Cécile Demur from the Haematology Department of Toulouse Hospital for annotation of AML patients included in the HIMIP collection.

Introduction

Acute myeloid leukemia (AML) is characterized by an accumulation of neoplastic myeloid precursors in the bone marrow and the blood. The neoplastic transformation is thought to arise at the hematopoietic stem cell level or at the committed myeloid progenitors level.¹ AML is the most common acute leukemia affecting adults and its incidence increases with age. Most AML patients who receive intensive chemotherapy achieve first complete remission (1st CR) but the frequency of relapse is high and the overall 5-year leukemia-free survival rate is only 25% and even lower in patients over 60 years old. Patients are stratified in prognosis groups in regard with their cytogenetics and genes mutational status with different probabilities of achieving and maintaining 1st CR. This stratification is still evolving.²

The pivotal role of cytotoxic effector cells of the innate immune system (natural killer (NK) cells and $\gamma\delta$ T cells) in the control and the clearance of most haematological malignancies have been highlighted thanks to clinical and experimental data in the recent years.³ In AML, the potent role of NK cells is clearly evidenced in allogeneic hematopoietic stem cells transplantation (HSCT) in a context of killer cell immunoglobulin-like receptor (KIR) mismatch.^{4,5} Nevertheless, studying the reconstitution of NK cells in patients after allogeneic HSCT with KIR mismatch, it has been discovered that the reconstituted NK cell population displays abnormal phenotype (imbalanced toward an immature phenotype) and cytotoxicity, impairing the graft versus-leukemia effect.⁶ Apart from HSCT, very few is known about the role of autologous NK cells in AML patients.⁷ Phenotypic alterations of NK cells have been described in AML patients at diagnosis with recovery of NK cell phenotype and cytolytic function after 1st CR.⁸ This study focused on natural cytotoxicity receptors (NCR) and shows that leukemia cells are responsible for the down-regulation of NCR. As phenotypic and functional alterations of NK cells may explain the escape of the malignant cells from the innate immune system and therefore relapse after 1st CR, the contribution of autologous NK cells in the control of AML awaits to be clarified. In this study, for the first time, we delineate the phenotype of NK cells from patients in 1st CR and we afford data regarding the persistence of an abnormal phenotype.

Design and Methods

Informed consent of the patients

Fresh and thawed samples from AML patients have been obtained after informed consent and stored at the HIMIP (Haematcollection. According to the French law, HIMIP collection has been declared to the Ministry of Higher Education and Research (DC 2008-307 collection 1) and has obtained a transfer agreement (AC 2008-129) after approbation by the “Comité de Protection des Personnes Sud-Ouest et Outremer II” (ethical committee). Clinical and biological annotations of the samples have been declared to the CNIL (Comité National Informatique et Libertés, ie Data processing and Liberties National Committee).

Study design

Patients included in the study were assessed for and considered in 1st CR about one month after the induction chemotherapy if the following features were completed: bone marrow blasts < 5%; absence of blasts with Auer rods; absence of extramedullary disease; absolute neutrophil count >1 G/L ($G=10^9$ cells); platelet count >100 G/L; independence of red cell transfusions. Fresh blood samples were collected from these patients and peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were subsequently prepared on a Ficoll-Paque density gradient (GE Healthcare, Uppsala, Sweden). PBMC from healthy donors (HD) were isolated with similar procedure.

For the follow up of patients in 1st CR, blood samples were collected one to four month after 1st CR, before the first and second consolidation chemotherapies (to avoid a possible direct effect of chemotherapeutic drugs on PBMC).

Clinical and haematological characteristics of the patients

Cytogenetic pronostic, n (%)
favorable, 6 (17)
Intermediate, 27 (75)
adverse, 3 (8)
not done, 1
<hr/>
Cytogenetic and molecular pronostic, n (%)
favorable, 13 (39)
Intermediate-I, 11 (33)
Intermediate-II, 8 (24)
adverse, 1 (3)
not done, 4
<hr/>
Age (y), median n (%)
< 60, 18 (49)
≥ 60, 19 (51)
<hr/>
Bone marrow blast (%), median (range)
62.8, (25-98)
not done, 1
<hr/>
WBC, n (%)
< 30 G/L, 25 (68)
> 30 G/L, 12 (32)
<hr/>
Duration of 1st CR (month), median (range)
13, (3-24)

Monoclonal antibodies and flow cytometry

Pacific Blue-coupled monoclonal antibody (mAb) against CD3 (clone UCHT1) was from Biologend (San Diego, CA). Phycoerythrin-cyanine(PC)5-coupled mAb against CD56 (N901), phycoerythrin(PE)-coupled mAbs against NKp30 (Z25), NKp44 (Z231), NKG2A (Z199), CD16 (3G8), NKG2D (ON72), ILT2 (HP-F1) and CD158ah (EB6B), fluorescein isothiocyanate(FITC)-coupled mAbs against TCR V γ 9 (IMMU 360) and CD4 (13B8.2), Phycoerythrin-cyanine(PC)7-coupled mAb against CD8 (SFCI21Thy2D3) were from Beckman Coulter (Fullerton, CA). PE-coupled mAbs against NKp46 (9E2), NKB1 (DX9) and NKAT2 (DX27) were from BD Bioscience (San Jose, CA). Appropriate isotype controls were used. Flow cytometry was performed with a BD LSR-II device, NK cells were gated among PBMC as CD3⁻CD56⁺ cells. Results were analyzed with FacsDiva 6.0 or FlowJo 7.6 (Treestar).

Statistical analysis

Significant differences were assessed by paired Student's *t*-test (for normal distributions) or Wilcoxon's signed rank test (for other distributions) with $\alpha = 0.05$. Correlative studies for coordinated expression of receptors were assessed by the Spearman Rank Order Correlation, a nonparametric association, with $\alpha = 0.05$. Correlative studies between clinical characteristics and biological characteristics were assessed by one way analysis of variance (ANOVA), $\alpha = 0.05$ and subsequent multiple comparison pairwise were performed only when one way ANOVA *p* value is significant. For this the Holm-Sidak method was used, $\alpha = 0.05$. Statistical analysis were performed with the SigmaStat software (Systat Software Inc., Chicago, IL). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

Results and Discussion

PBMC obtained from HD ($n = 51$) and 1st CR patients ($n = 34$) were counted. The medians of the counts (6.5 G/L for HD, 1.6 G/L for patients) were statistically different (**Figure 1A, first panel**). Monocyte, B lymphocyte, CD4+ T lymphocyte, CD8+ T lymphocyte and V γ 9+ T lymphocyte sub-populations were then counted. For each of them, the medians of the counts were also statistically different between AML patients and HD (**Figure 1A**).

The absolute number of NK cells was also assessed. Median values of 0.66 and 0.075×10^6 NK cells/L were found for HD ($n = 51$) and 1st CR patients ($n = 32$) respectively. These counts were statistically different (**Figure 1B**). Based upon the expression of CD56, two sub-populations of NK cells are distinguished.⁹ Therefore, we counted separately CD56^{dim} and CD56^{bright} NK cells, and the percentages of each sub-population were calculated (**Figure 1B**). All counts were statistically lower in 1st CR patients when compared to HD. Interestingly, the CD56^{bright} NK cells represented 26.9% in patients, which was significantly higher than in HD (5.7%). Thus, at this stage, it seemed that AML patients in 1st CR were characterized by a high level of CD56^{bright} immature NK cells.^{9,10}

To further characterize this over-represented CD56^{bright} NK cell sub-population in 1st CR patients, we established the pattern of expression of activating and inhibitory NK Receptors (NKR)¹¹ and compared it to the one of HD. NKR that had been tested included:

NKG2D (a lectin-like type II transmembrane activating homodimer), CD16 (a Fc γ RIII receptor responsible for Antigen Dependent Cell Cytotoxicity), Natural Cytotoxicity Receptors (NCR; NKp30, NKp44 and NKp46), NKG2A (a lectin-like receptor associated with CD94 to form an inhibitory heterodimer), ILT2 (an inhibitory receptor also known as CD85j) and Killer Immunoglobulin-like Receptors (KIR). Regarding the latter family, we used a mix of three different monoclonal antibodies directed against NKAT2, NKB1 and CD158ah antigens. The NKAT2 antigen encompasses two inhibitory receptors (KIR2DL2, KIR2DL3) and their paired activating receptor (KIR2DS2). The NKB1 antigen corresponds to the inhibitory KIR3DL1 receptor, and CD158ah antigen accounts for the inhibitory KIR2DL1 and its activating KIR2DS1 paired receptor. The expression of these NKR was assessed by flow cytometry. For NKG2D, NKp30, NKp44 and NKp46 receptors, the histograms obtained in the flow cytometry study did not evidenced negative and positive populations (**see Supplementary Figures**). Thus, the level of expression of these receptors was expressed with the Mean of Fluorescence Intensity (MFI) (**Figure 2A**). On the contrary, for CD16, KIR, NKG2A and ILT2 stainings, a positive population could be distinguished and the rates of NK cells positive for each of these receptors could be obtained (**Figure 2A**). No significant difference was observed between HD and 1st CR patient groups for the expression of ILT2, NKp30 and NKp44. We found that NKG2D, NKp46 and NKG2A were over-expressed on NK cells of patients, whereas CD16 and KIR were under-expressed.

Finally, we searched for correlations between the levels of expression of different NKR. Classically, CD56^{bright} NK cells express CD16 at a lower level than CD56^{dim} NK cells, and CD56^{bright}/CD16^{dim/-} NK cells are known as “immature” circulating NK cells. **Figure 2B** reports the rate of CD56^{bright} versus the rate of CD16⁺ NK cells for HD and 1st CR patients. As awaited, higher rates of CD56^{bright} NK cells in patients correlated with lower rates of CD16⁺ NK cells. This correlation indicates that 1st CR patients have a higher percentage of normal immature NK cells among PBMC. To confirm this normal immature phenotype, we checked in **Figure 2B** that CD56^{bright} NK cells expressed high levels of NKG2A and that the percentage of NKG2A⁺ NK cells was inversely proportional to the percentage of KIR⁺ NK cells. Overall, our results show that in AML patients at 1st CR the proportion of immature NK cells is abnormally high. This can indicate that the NK cell population is under reconstitution after the intensive induction chemotherapy. Such an immature phenotype has also been observed after HSCT during the reconstitution of NK cells from engrafted progenitors.^{12,13}

As the persistence of a large proportion of immature NK cells might be deleterious for patients regarding the dreaded relapse of the disease, we initiated the follow-up of the

evolution of NK cell populations in four 1st CR patients during the first four months after CR was effective. We monitored the level of expression of CD56 (and assessed the rate of CD56^{bright} NK cells), NKG2A and KIR. These preliminary data indicate that the immature NK cell population in patients was still more important than in HD, and did not have a tendency to decrease four months after 1st CR. This observation is consistent with the one of Dulphy et al. who shows that the immature NK cell subset is pre-eminent up to one year after HSCT.¹³ The follow-up is going on to assess the persistence of NK cell immaturity and finally the correlation with relapse.

To end, we sought after correlation between the cytogenetic and molecular prognostic groups and expression of the NKR. The only significant difference was obtained regarding the percentage of CD16⁺ NK cells (analyzed for 22 patients) which was lower in the intermediate-II group when compared to the favorable group.

In conclusion, our results strengthen the data accumulated over recent years indicating a qualitative and quantitative defectiveness of NK cells in AML patients in 1st CR (with HSCT treatment or not) and highlight the need for immunological intervention aimed at activating the reconstitution of this population of anti-leukemia effectors and triggering at its best its cytolytic potential.

References

1. Passegué E, Jamieson CH, Ailles LE, Weissman IL. Normal and leukemic hematopoiesis: are leukemias a stem cell disorder or a reacquisition of stem cell characteristics? Proc Natl Acad Sci U S A 2003;100(suppl.1),11842-9.
2. Döhner H, Estey EH, Amadori S, Appelbaum FR, Büchner T, Burnett AK, et al. Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European LeukemiaNet. Blood 2010;115,453-74.
3. Rey J, Veuillen C, Vey N, Bouabdallah R, Olive D. Natural killer and gammadelta T cells in haematological malignancies: enhancing the immune effectors. Trends Mol Med 2009;15,275-84.
4. Ruggeri L, Capanni M, Urbani E, Perruccio K, Shlomchik WD, Tosti A, et al. Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants. Science 2002 ;295,2097-100.

5. Velardi A, Ruggeri L, Mancusi A, Aversa F, Christiansen FT. Natural killer cell allorecognition of missing self in allogeneic hematopoietic transplantation: a tool for immunotherapy of leukemia. *Curr Opin Immunol* 2009;21,525-30.
6. Nguyen S, Dhedin N, Vernant JP, Kuentz M, Al Jijakli A, Rouas-Freiss N, et al. NK-cell reconstitution after haploidentical hematopoietic stem-cell transplantations: immaturity of NK cells and inhibitory effect of NKG2A override GvL effect. *Blood* 2005;105,4135-42.
7. Verheyden S, Demanet C. NK cell receptors and their ligands in leukemia. *Leukemia* 2008;22,249-57.
8. Fauriat C, Just-Landi S, Mallet F, Arnoulet C, Sainty D, Olive D, Costello RT. Deficient expression of NCR in NK cells from acute myeloid leukemia: Evolution during leukemia treatment and impact of leukemia cells in NCRdull phenotype induction. *Blood* 2007;109,323-30.
9. Cooper MA, Fehniger TA, Caligiuri MA. The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends Immunol* 2001;22,633-40.
10. Romagnani C, Juelke K, Falco M, Morandi B, D'Agostino A, Costa R, et al. CD56^{bright}CD16⁻ killer Ig-like receptor⁻ NK cells display longer telomeres and acquire features of CD56^{dim} NK cells upon activation. *J Immunol* 2007;178,4947-55.
11. Lanier LL. Up on the tightrope: natural killer cell activation and inhibition. *Nat Immunol* 2008;9,495-502.
12. Pittari G, Fregni G, Roguet L, Garcia A, Vataire AL, Wittnebel S, et al. Early evaluation of natural killer activity in post-transplant acute myeloid leukemia patients. *Bone Marrow Transplant* 2010;45,862-71.
13. Dulphy N, Haas P, Busson M, Belhadj S, Peffault de Latour R, Robin M, et al. An unusual CD56^(bright) CD16^(low) NK cell subset dominates the early posttransplant period following HLA-matched hematopoietic stem cell transplantation. *J Immunol* 2008;181,2227-37.

Figure Legends

Figure 1. Pre-eminence of CD56^{bright} NK cells among PBMC of AML patients in 1st CR. (A) Comparative analysis of absolute numbers (G/L; G=10⁹ cells/L) of the main immune populations between healthy donors (HD) and AML patients at 1st CR (patient). Each donor is represented by a white circle and the median of the population is represented by a horizontal black bar. (B) Comparative analysis of absolute numbers and rates of CD56^{dim} and CD56^{bright} NK cells between HD and patients. On the overall chart on the right, the height of histograms represents the median of absolute number of NK cells, the white portion of histograms represents the rate of CD56^{dim} NK cells whereas the grey portion represents the rate of CD56^{bright} NK cells.

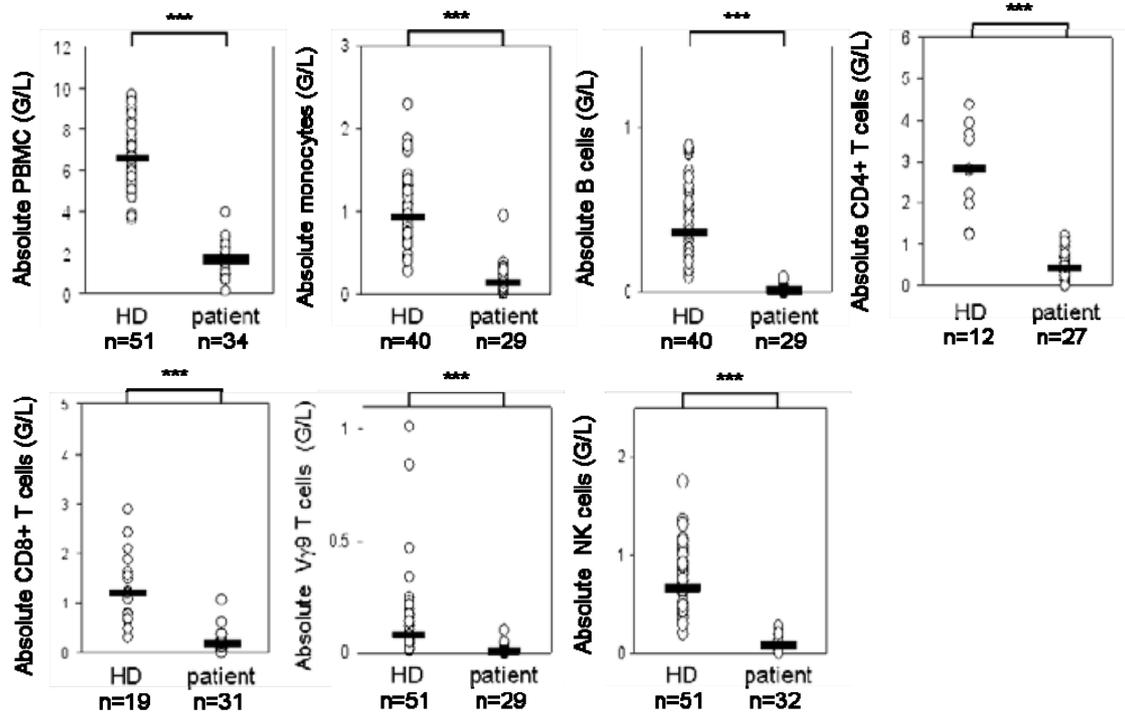
Figure 2. Pattern of expression of inhibitory and activating receptors on NK cells of AML patients. (A) Comparative analysis of the expression (as MFI or as % of positive cells) of activating and inhibitory receptors on NK cells between healthy donors (HD) and AML patients at 1st CR (patient). Each donor is represented by a white circle and the median of the population is represented by a horizontal black bar. (B) Graphical representation of paired expression (as % of positive cells) of CD56^{bright} vs CD16⁺; CD56^{bright} vs NKG2A⁺; CD56^{bright} vs KIR⁺ and KIR⁺ vs NKG2A⁺. Each patient is represented by a white circle. n = number of patients, ρ = Spearman coefficient of correlation, p = p-value of the Spearman's test.

Figure 3. Follow-up of the immature phenotype of NK cells for four AML patients (a, b, c and d) in 1st CR. (A) Evolution of the percentage CD56^{bright} NK cells and the absolute number (G/L) of NK cells along the first four months in 1st CR. (B) Evolution of the percentage of NKG2A⁺ (B) and KIR⁺ (C) NK cells along the first four months in 1st CR. For (B) and (C), the grey histograms show the isotype control, the dark line show NKG2A (B) and KIR (C) stainings.

Figures

Fig. 1

A.



B.

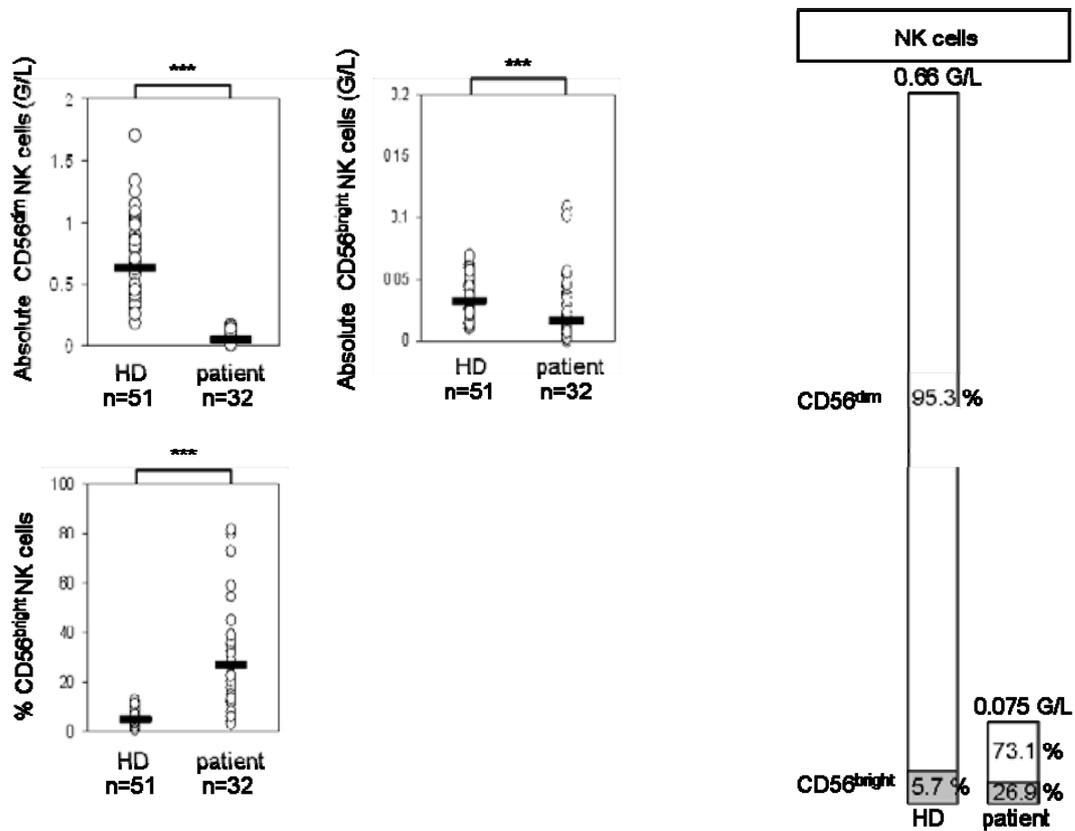
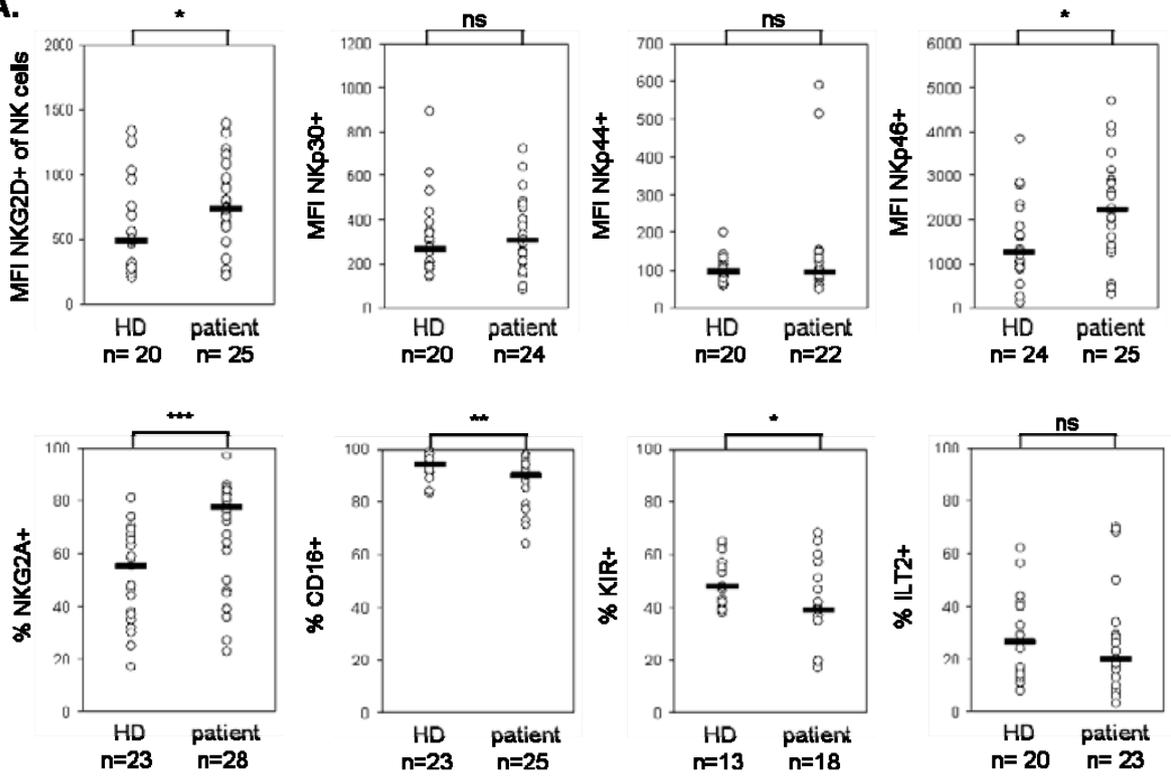


Fig. 2

A.



B.

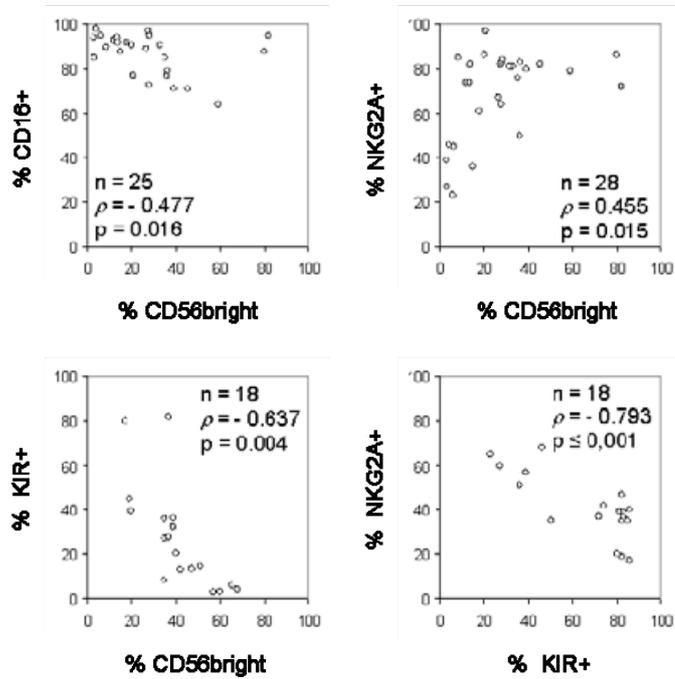
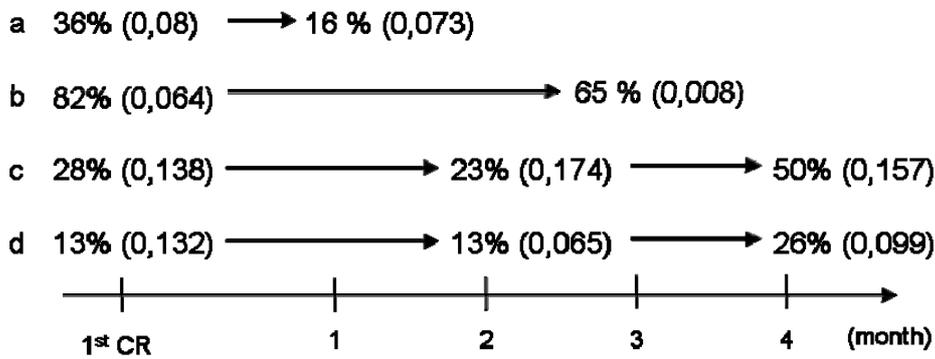
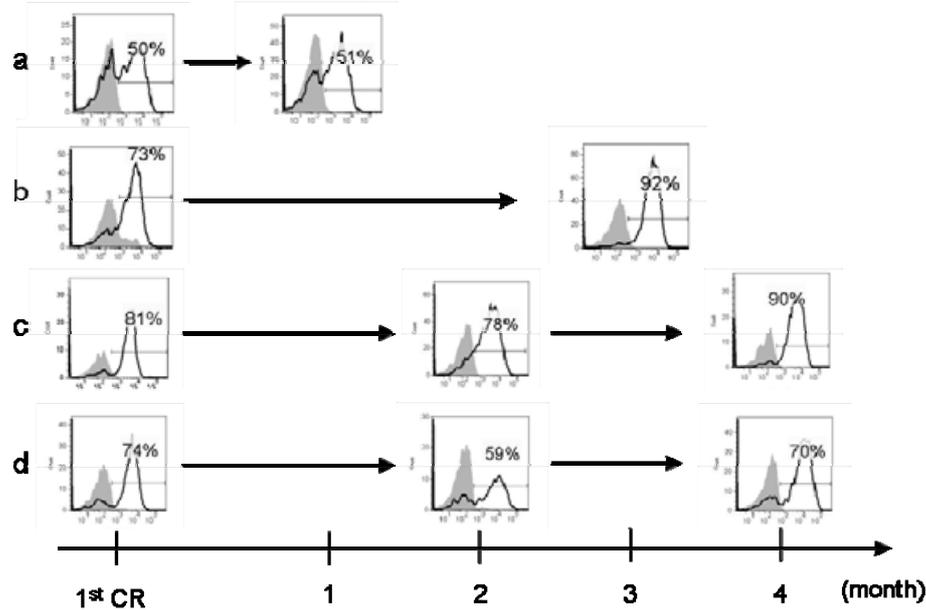


Fig. 3

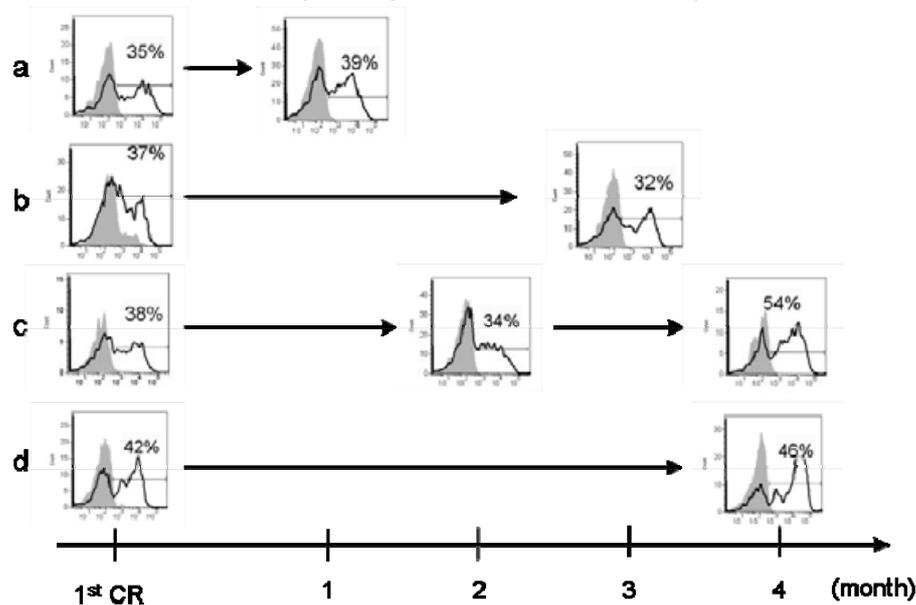
A. % CD56^{bright} NK cells (absolute (G/L)) (healthy donor median = 5,7%; 0,03 G/L)



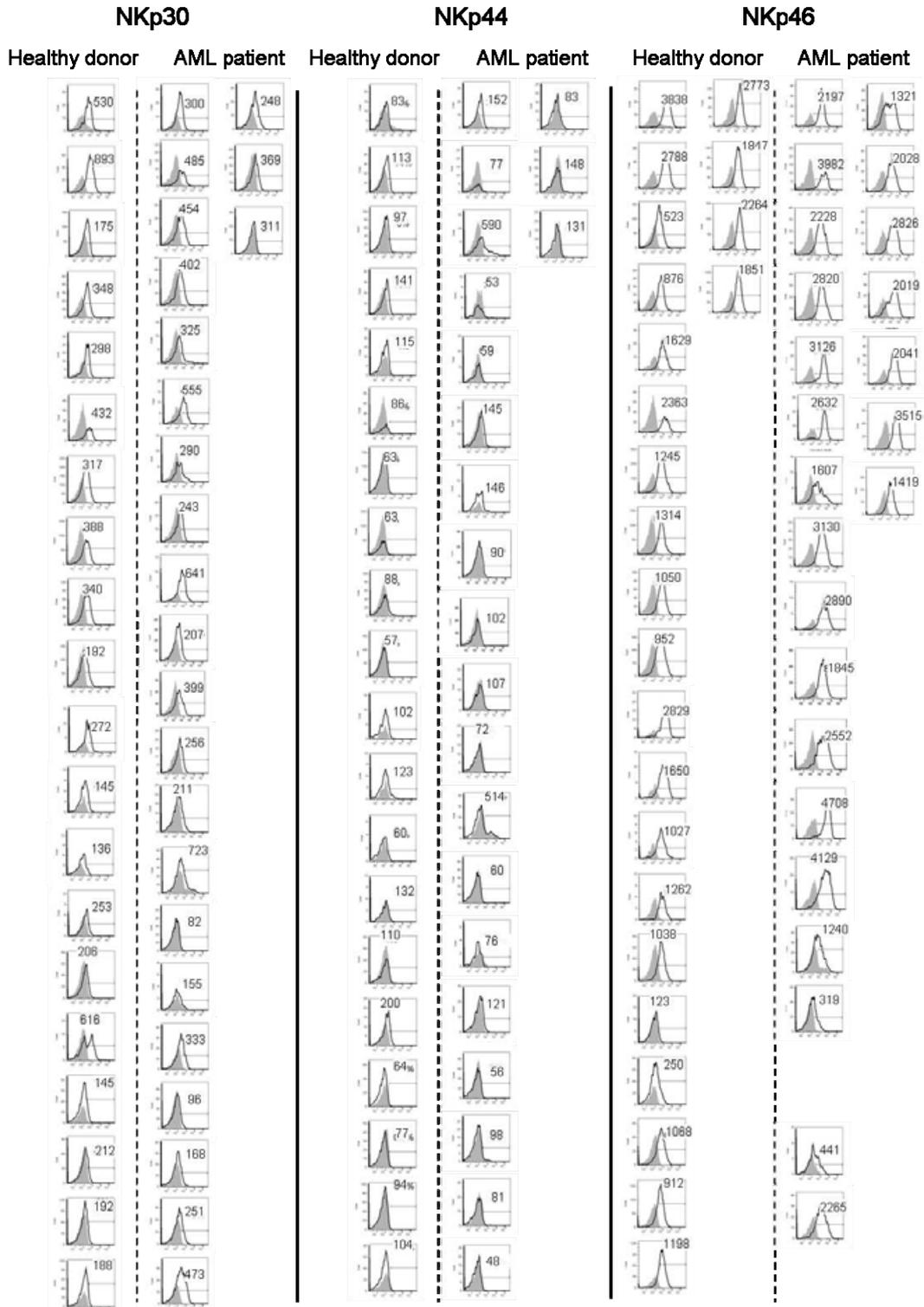
B. % NKG2A+ NK cells (healthy donor median = 55 %)



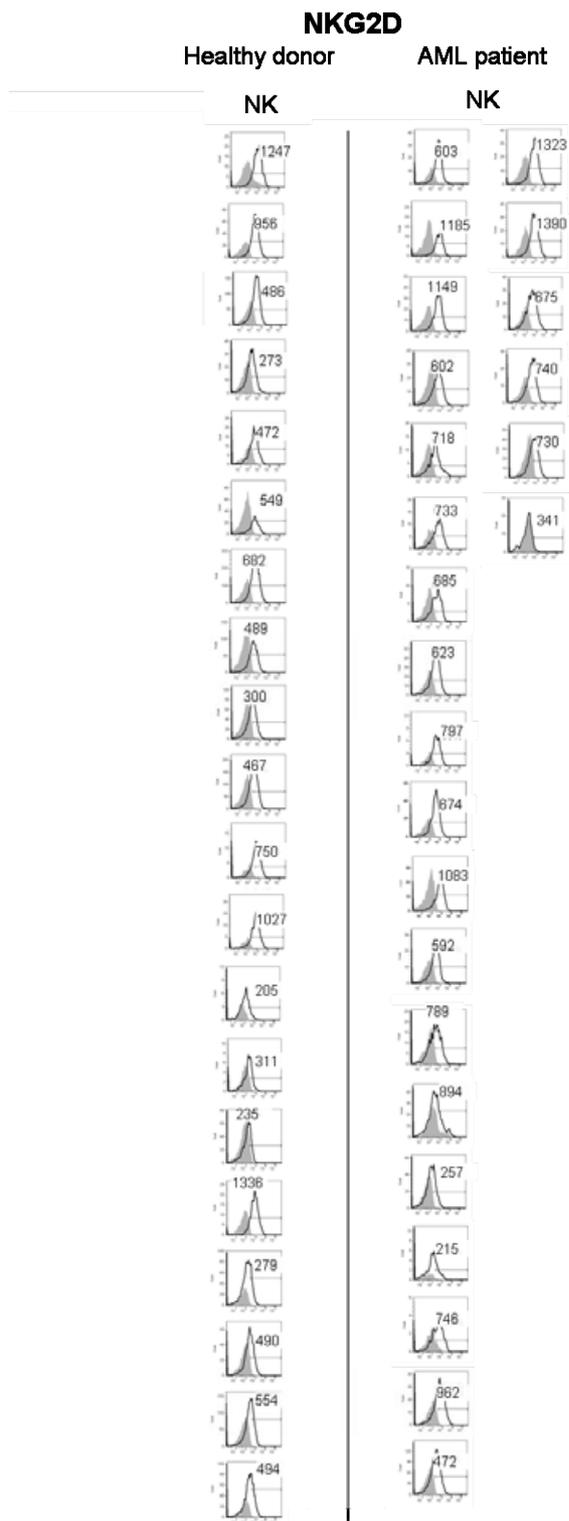
C. % KIR+ NK cells (healthy donor median = 48 %)



Supplementary data :



Supplementary data 1. NCR expression on NK cells from HD and AML patients in 1st CR. Grey histograms show the isotype control, dark lines show NKp30, NKp44 or NKp46 staining. The MFI of the overall population is indicated.

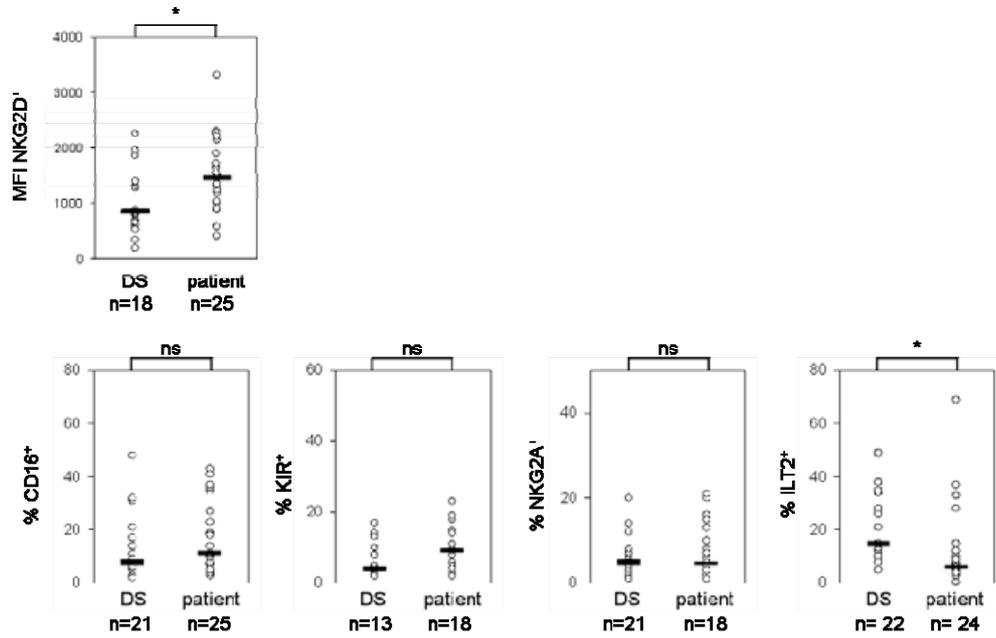


Supplementary data 2. NKG2D expression on NK cells from HD and AML patients in 1st CR.

Grey histograms show the isotype control, dark lines show NKG2D staining. The MFI of the overall population is indicated.

Figure complémentaire :

(A) Lymphocytes T CD8⁺



(B) Lymphocytes T Vγ9Vδ2

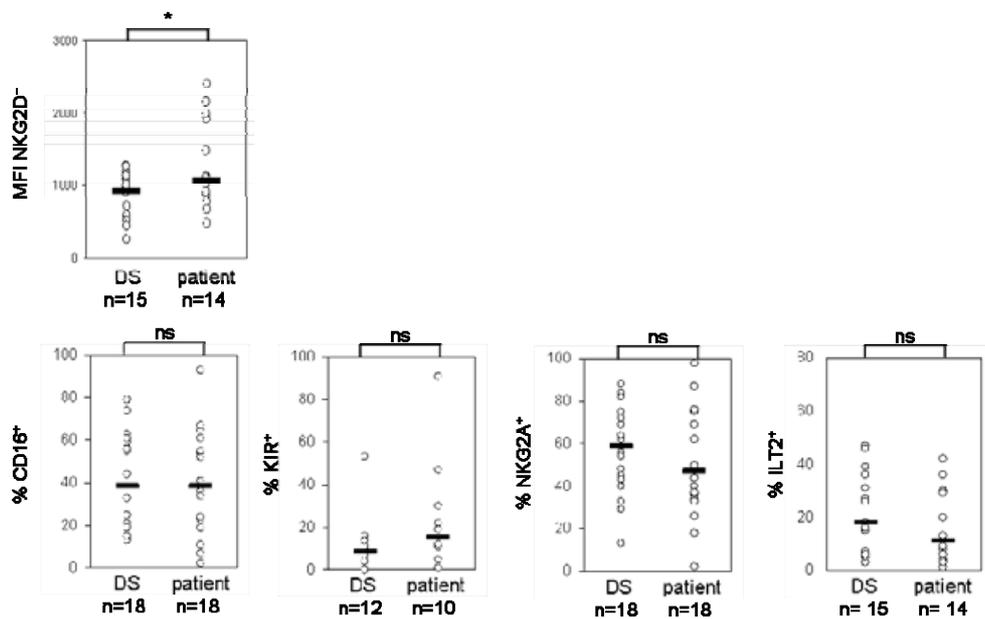


Figure complémentaire 1. Profil d'expression des récepteurs NK à la surface des LT CD8⁺ (A) et des LT Vγ9Vδ2 (B)

Chaque cercle blanc représente un donneur ou un patient et la médiane de chaque population est indiquée par une barre horizontale. MFI = Mean Fluorescence Intensity. DS = donneurs sains

Nous avons également évalué l'expression des « récepteurs NK » par les lymphocytes T CD8⁺ et les lymphocytes T V γ 9V δ 2. Nous avons ainsi pu mettre en évidence que les LT CD8⁺ et les LT V γ 9V δ 2 (**Figure complémentaire 1**), comme les cellules NK (**Figure 2**), surexpriment le récepteur activateur NKG2D. Comme cela a été expliqué précédemment, une sécrétion massive d'IL-15 est observée après une forte lymphodéplétion (Miller et al., 2005) et est responsable de la surexpression de NKG2D (Boyiadzis et al., 2008). Dans notre étude, nous n'avons pas dosé la concentration d'IL-15 dans le sérum de ces patients mais il est possible que celle-ci soit également élevée et puisse être responsable de la surexpression de NKG2D par les trois effecteurs lymphoïdes cytotoxiques.

Mis à part la diminution d'expression d'ILT2 par les LT CD8⁺ des patients, nous n'avons pas observé de différences significatives dans l'expression des autres récepteurs NK par les LT CD8⁺ ou les LT V γ 9V δ 2. L'expression de ces récepteurs NK sur les lymphocytes T est souvent associée à des cellules activées ou mémoires. Il ne nous a cependant pas été possible de faire le rapprochement entre l'expression de ces récepteurs et les statuts d'activation (CD69 et CD25) ou de maturation (CD27/CD45RA) des lymphocytes T car nos données concernant ces statuts ne sont pas suffisamment nombreuses pour émettre des conclusions.

Sur le plan fonctionnel plusieurs points n'ont pas été abordés dans cette étude :

- la détection d'une activité cytotoxique des lymphocytes T CD8⁺ ainsi que la production d'IFN- γ face aux cellules leucémiques autologues seraient les premiers éléments permettant de mettre en évidence la présence de lymphocytes T spécifiques de la tumeur, actuellement peu caractérisés.
- les lymphocytes T V γ 9V δ 2 n'ont été que très peu étudiés dans la LAM et il serait également intéressant d'évaluer leur capacité à lyser les cibles tumorales autologues ainsi que leur capacité à être activés par des phosphoantigènes de synthèse comme le BrHPP puis à proliférer en présence d'IL-2.

Conclusion et discussion

Dans cette étude, nous avons cherché à caractériser les effecteurs lymphoïdes cytotoxiques de patients atteints de LAM en première rémission complète (RC) après la chimiothérapie d'induction (1^{ère} RC).

Afin d'avoir une efficacité maximale et d'éliminer le maximum de cellules tumorales, la chimiothérapie d'induction est intensive et conduit à l'aplasie comme la chimiothérapie précédant une greffe allogénique de cellules souches hématopoïétiques. Nos résultats mettent en évidence que les cellules NK de ces patients ont un phénotype « immature » avec une forte proportion de cellules NK CD56^{bright} (26,9%), NKG2A⁺ (78%) et au contraire une faible proportion de cellules NK KIR⁺ (39%). Ces taux d'expression que nous obtenons 1 mois après la chimiothérapie d'induction correspondent environ à ceux qui peuvent être obtenus à 6 mois post-transplantation (CD56^{bright} (30%), NKG2A⁺ (70-80%) et KIR⁺ (30-50%)).

En effet, lors de la reconstitution du système immunitaire après une transplantation allogénique de cellules souches hématopoïétiques, précédée d'une chimiothérapie myéloablatrice, une disproportion entre les populations NK CD56^{dim} et CD56^{bright} (population immature (Romagnani et al., 2007)) est observée. En effet, à trois mois post-transplantation le pourcentage de cellules NK CD56^{bright} est d'environ 40 à 50 % (Dulphy et al., 2008; Shilling et al., 2003) et d'environ 30% à 6 mois (Cooley et al., 2005; Shilling et al., 2003) alors que chez un donneur sain le pourcentage moyen est d'environ 10% (Cooper et al., 2001). Ces deux sous-populations de cellules NK expriment divers marqueurs (Cooper et al., 2001) à l'inverse les uns des autres et ainsi les taux d'expression respectifs de ces divers marqueurs sur la population globale est intimement lié à la disproportion entre les populations CD56^{bright} et CD56^{dim}. Par exemple, le pourcentage de cellules NK exprimant le récepteur inhibiteur CD94/NKG2A est nettement plus élevé, environ 80% à trois mois après transplantation, (Nguyen et al., 2005; Shilling et al., 2003) que celui du donneur et encore d'environ 70% à un an post-transplantation (Shilling et al., 2003; Triplett et al., 2009). De façon inverse, le pourcentage de cellules NK exprimant les KIR reste plus faible que celui du donneur même à 100 jours post-transplantation (Cooley et al., 2005) (environ 30% contre 50% chez le donneur). Dans cette étude, Cooley et collaborateurs mettent aussi en évidence que la présence de lymphocytes T dans la greffe affecte le processus du développement des cellules NK et l'expression des KIR. Les cellules T pourraient directement rentrer en compétition pour

des cytokines telles que l'IL-7 ou l'IL-15 qui jouent un rôle essentiel dans l'homéostasie des cellules NK (Huntington et al., 2009) et des lymphocytes T (Jameson, 2002).

De plus, suite à une transplantation hématopoïétique, les cellules NK contrairement aux lymphocytes T se reconstituent plus rapidement et le nombre absolu de cellules NK, à un mois post-transplantation, est nettement supérieur à celui des lymphocytes T (Storek et al., 2008). Or, dans notre étude, à 1 mois après la chimiothérapie d'induction, malgré un nombre de globules blancs nettement inférieur à celui des donneurs sains, le nombre de cellules NK n'est pas supérieur à celui des lymphocytes T (**Figure complémentaire 2**).

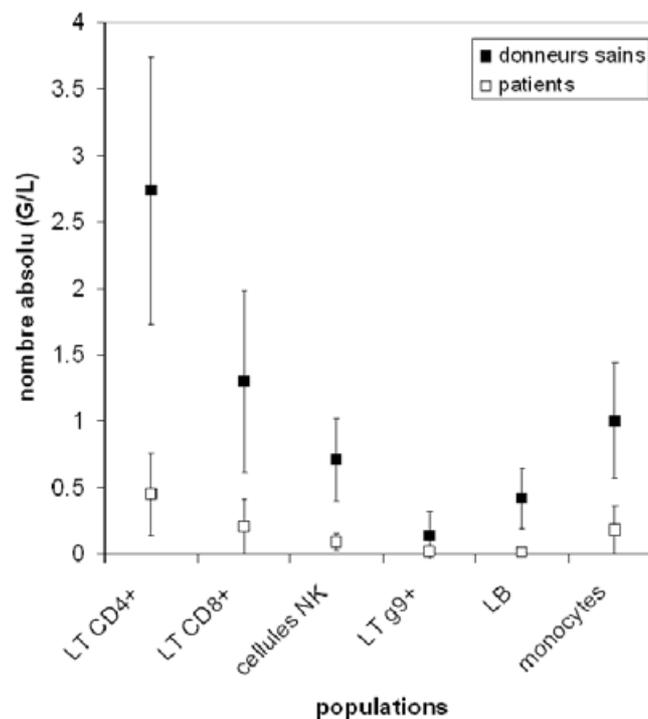


Figure complémentaire 2. La reconstitution du système immunitaire, à 1 mois post-chimiothérapie d'induction, n'est pas terminée mais est plus avancée qu'après une transplantation.

LT CD4+ et CD8+ = Lymphocytes T CD4+ et CD8+, LT g9+ = lymphocytes T V γ 9V δ 2, LB = lymphocytes B.

Ces données mettent d'une part en évidence que les cellules NK des patients LAM en 1^{ère} RC ont un phénotype immature et d'autre part que ce phénotype est lié à la reconstitution immunitaire. En effet, l'expression coordonnée des marqueurs NKG2A, KIR et CD56 nous indique que les cellules NK ont un phénotype immature « normal ». Nous pouvons également

noter que la reconstitution immunitaire à un mois après la chimiothérapie d'induction bien qu'elle ne soit pas terminée est cependant plus rapide que celle observée après une transplantation allogénique.

Pour les quatre patients suivis au cours de leur traitement, les pourcentages de cellules NK CD56^{bright} (16 à 65%) et NKG2A⁺ (51 à 92%) restent majoritairement très au-dessus des valeurs normales (5,7% pour CD56^{bright} et 55% pour NKG2A). Concernant l'expression des KIR, bien que le pourcentage des cellules NK exprimant les KIR semble augmenter légèrement, les données fluctuent entre ces quatre patients et il est difficile de dégager une tendance. Ainsi, malgré une reconstitution qui semble rapide, l'immaturation des cellules NK apparaît maintenue au cours du traitement. Toutefois, après le traitement d'induction, les patients subissent à intervalles réguliers des chimiothérapies de consolidation. Elles sont nécessaires pour continuer à éliminer les cellules tumorales résiduelles mais elles contribuent également au ralentissement de la reconstitution immunitaire et pourraient expliquer en partie les phénotypes que nous avons observés. En effet, le traitement chimiothérapeutique peut détériorer de nombreux éléments essentiels à la bonne reconstitution et maturation des cellules NK comme i) les cellules du stroma médullaire (Roth et al., 2000), ii) les cellules dendritiques (Walzer et al., 2005) et iii) les lymphocytes T (Cooley et al., 2005).

Nous avons ensuite cherché à déterminer si des corrélations pouvaient être dégagées entre les différentes caractéristiques cliniques et les données phénotypiques. Une seule corrélation a pu être mise en évidence : elle relie le pourcentage de cellules NK exprimant le CD16 avec le pronostic cytogénétique et moléculaire. Ainsi, plus le pourcentage de cellules NK exprimant le CD16 est élevé, à ce stade de la 1^{ère} RC, plus le pronostic déterminé au diagnostic était favorable avec une différence statistique entre les groupes favorables et intermédiaire-II. Nous n'avons cependant pas évalué si cette corrélation pouvait rendre compte d'une activité cytolytique différente (via le CD16) entre les groupes pronostics.

Le recul de temps sur les patients étudiés nous a permis d'avoir une durée médiane de la rémission complète de 13 mois (3 à 24 mois) et 19% des patients (7 sur 37) ont eu une rechute. Nous n'avons toutefois pas observé de corrélation entre les phénotypes des effecteurs immunitaires étudiés et le taux de rechute des patients. Il est cependant tout à fait envisageable que le nombre de patient et surtout le recul de temps n'aient pas été suffisants pour observer ces corrélations. Ce point est toutefois crucial car il pourrait permettre de préciser le rôle des effecteurs immunitaires dans la prévention de la rechute. En effet, jusqu'à présent, seul le nombre absolu de lymphocytes sans distinction des populations et de leurs

fonctionnalités possède un rôle prédictif d'une meilleure survie sans rechute (Behl et al., 2006; De Angulo et al., 2008).

Plusieurs questions concernant les propriétés fonctionnelles des cellules NK sont également en suspens dans cette étude. Après une transplantation allogénique chez des patients atteints de LAM, l'activité cytolytique des cellules NK est altérée que se soit contre une cible conventionnelle telle K562 (une lignée de leucémie myéloïde chronique, CMH-I négative) (Pittari et al., 2009) ou contre des blastes congelés au diagnostic du patient (Nguyen et al., 2005). Nguyen et collaborateurs ont pu montrer que cette baisse d'activité était en partie due à la surexpression du récepteur inhibiteur CD94/NKG2A. Dans notre étude, les propriétés fonctionnelles des cellules NK vis à vis des blastes autologues congelés au diagnostic des patients n'ont pas pu être évaluées par un manque d'accès à ces cellules. Un point important aurait été de vérifier l'expression d'HLA-E sur ces blastes et d'effectuer un test de lyse avec des cellules NK purifiées en présence d'un anticorps masquant NKG2A afin de déterminer si une amélioration de la lyse des blastes pouvait être obtenue. De plus, la caractérisation des cytokines et des molécules lytiques exprimées par les cellules NK face à des cellules tumorales autologues aurait également permis de mieux caractériser les interactions entre les effecteurs immunitaires et leur cible tumorale à ce stade de la maladie.

Les tests de lyse contre les blastes leucémiques du diagnostic permettraient d'avoir une première indication sur la capacité des effecteurs lymphoïdes cytotoxiques à éliminer les cellules de LAM. Néanmoins, dans notre étude, les interactions que pourraient avoir les effecteurs immunitaires avec les cellules cancéreuses sont à priori restreintes car la chimiothérapie a détruit un grand nombre de blastes. De plus, ces cellules résistantes ont des caractéristiques différentes des blastes présents au diagnostic et/ou résident dans un microenvironnement médullaire protecteur (Ishikawa et al., 2007). Ces cellules conduisent souvent à la réapparition de la maladie (c'est la rechute). En terme clinique, cette maladie résiduelle (MRD) est l'une des principales causes des échecs thérapeutiques dans la LAM (Liu Yin, 2002). Techniquement, l'isolement de ces cellules est difficile à mettre en œuvre du fait de leur faible nombre et de l'absence d'un phénotype consensuel permettant de les trier, mais leur utilisation reflèteraient plus justement la réalité dans le cadre notre étude.

SYNTHÈSE ET PERSPECTIVES

Le lenalidomide est une drogue anti-cancéreuse ciblant de nombreux éléments de l'environnement tumoral (Breitkreutz et al., 2008; Dredge et al., 2005). En tant que membre de la famille des IMiD®, il possède des propriétés immunomodulatrices en co-stimulant les lymphocytes T à produire de l'IFN- γ et de l'IL-2 et ainsi active indirectement les cellules NK (Davies et al., 2001). Nous avons cherché à affiner la description de ses propriétés immunomodulatrices et nous avons ainsi pu montrer qu'il avait une action directe sur les cellules NK de donneurs sains. Son action est cependant complexe, car contrairement à ce qui avait été démontré sur lymphocytes T, il diminue la production d'IFN- γ par les cellules NK. De plus, la modulation de l'expression de récepteurs activateurs et inhibiteurs que nous avons mis en évidence n'a pas d'influence sur les propriétés cytotoxiques des cellules NK dans notre modèle. Le lenalidomide possède donc de multiples propriétés qui ciblent principalement l'environnement tumoral dont font partie les cellules immunitaires.

Seuls quelques cas d'utilisation du lenalidomide chez des patients atteints de LAM ont été publiés (Hussein and Tefferi, 2009; Penarrubia et al., 2009) et ses propriétés n'ont pas encore été décrites dans cette pathologie. Pourtant, l'environnement tumoral des LAM joue lui aussi un rôle très important dans le devenir de la maladie.

En effet, un des problèmes majeurs actuellement rencontré dans le traitement des LAM est le taux de rechute important (50 à 70%) malgré la rémission complète atteinte après la chimiothérapie d'induction. Plusieurs études ont pu mettre en évidence que le nombre absolu de lymphocytes, après la chimiothérapie d'induction, était corrélé à une meilleure survie sans rechute. L'objectif de notre travail était donc de caractériser les effecteurs lymphoïdes cytotoxiques des patients LAM en rémission complète après la chimiothérapie d'induction. Nous avons pu mettre en évidence que les cellules NK de ces patients ont un phénotype immature qui, de plus, semble perdurer dans le temps. Dans notre étude, nous n'avons pas pu évaluer l'impact de ce phénotype sur les capacités cytotoxiques des cellules NK mais d'après la littérature il est envisageable de supposer qu'elles ne soient pas en mesure d'exercer pleinement leurs fonctions anti-tumorales. Ainsi, Nguyen et collaborateurs montrent que la surexpression de CD94/NKG2A des cellules NK inhibe la lyse des blastes des patients LAM (Nguyen et al., 2005). De plus, Dulphy et collaborateurs montrent, chez des patients atteints de cancers hématologiques, que la surexpression de ce récepteur inhibiteur sur les cellules NK après une transplantation abolit les signaux activateurs reçus via NKp46 et NKG2D lors

d'expériences de lyse redirigée (Dulphy et al., 2008). La poursuite du suivi longitudinal des patients étudiés permettrait de déterminer le rôle que pourrait avoir les cellules NK dans la prévention de la rechute. En effet, dans notre étude les patients suivis n'ont pas subi de rechute.

La rechute est due à la persistance des cellules leucémiques résistantes à la thérapie. Ces cellules correspondraient en partie aux cellules « initiatrices de la leucémie » capables de régénérer l'hématopoïèse leucémique. Elles sont localisées dans la moelle osseuse, notamment dans la niche endostéale (Ishikawa et al., 2007), où les éléments de l'environnement régulent étroitement leurs fonctions de survie, de prolifération, de différenciation. Le microenvironnement médullaire est à la fois un support physique de l'hématopoïèse mais aussi un élément indispensable à sa régulation (Yin and Li, 2006). Les cellules « initiatrices de la leucémie » sont protégées par leur relative quiescence mais également par les interactions qu'elles développent avec le stroma médullaire. Ainsi, des stratégies thérapeutiques ont été développées et visent soit à conduire les cellules « initiatrices de la leucémie » à entrer dans le cycle cellulaire (Saito et al., 2010) soit à perturber les liaisons matrice/intégrine (Matsunaga et al., 2003) ou encore à induire la différenciation des cellules leucémiques (Jin et al., 2006). Saito et collaborateurs ont utilisé du G-CSF pour induire l'entrée dans le cycle et sensibiliser les cellules « initiatrices de la leucémie » à l'action de la chimiothérapie (Saito et al., 2010). Matsunaga et collaborateurs ont utilisé un peptide dérivé de la fibronectine (le FNIII14) pour inhiber les interactions entre la fibronectine et l'intégrine $\alpha4\beta1$ (VLA-4) et ainsi empêcher la résistance à la chimiothérapie des cellules de LAM. (Matsunaga et al., 2008). Jin et collaborateurs montrent que l'utilisation d'un anticorps anti-CD44 inhibe la migration des cellules « initiatrices de la leucémie » vers la moelle osseuse ou la rate, empêchant ainsi le développement d'une LAM chez la souris NOD/SCID. De plus, le prétraitement de ces cellules avec l'anti-CD44 avant de les greffer directement dans la moelle, les pousse vers un état plus mature qui ne leur permet plus d'établir une véritable leucémie chez la souris (Jin et al., 2006). L'AMD3100 et l'AMD3465 sont des antagonistes compétitifs de SDF-1 α , le ligand de CXCR4, ils permettent d'induire la mobilisation des cellules de LAM et des progéniteurs dans la circulation de la même manière que le G-CSF et ainsi d'augmenter l'action de la chimiothérapie *in vivo* chez la souris (Nervi et al., 2009; Zeng et al., 2008). Comme décrit ci-dessus, les stratégies thérapeutiques capables de perturber les interactions entre les cellules de LAM et leur microenvironnement ont récemment fait l'objet d'importantes études. Ainsi, la caractérisation du rôle du lenalidomide

sur la modulation des interactions adhésives entre les cellules de LAM et leur microenvironnement pourrait constituer une perspective de recherche à ces travaux.

La période de temps après la chimiothérapie d'induction lorsque les patients atteints de LAM sont en rémission complète constitue un moment critique dans l'évolution de la maladie. En effet, le système immunitaire est en cours de reconstitution et n'est probablement pas en mesure de jouer correctement son rôle anti-tumoral. De plus, les agents de chimiothérapie ont pu perturber le fonctionnement des niches hématopoïétiques en induisant des dommages aux cellules stromales supportant l'hématopoïèse. Ceci peut favoriser l'élimination des cellules leucémiques résiduelles qui auraient perdu leur environnement protecteur mais peut également désorganiser la reprise d'une hématopoïèse normale. Ainsi, cette fenêtre de temps apparaît essentielle pour la mise en place de thérapies complémentaires à la chimiothérapie visant i) une reconstitution rapide des effecteurs immunitaires, ii) la potentialisation des fonctions effectrices des cellules immunitaires cytotoxiques iii) les interactions entre les cellules de la maladie résiduelle et les cellules stromales.

BIBLIOGRAPHIE

- Allison, T.J., Winter, C.C., Fournie, J.J., Bonneville, M., and Garboczi, D.N. (2001). Structure of a human gammadelta T-cell antigen receptor. *Nature* *411*, 820-824.
- Anderson, D.H., Sawaya, M.R., Cascio, D., Ernst, W., Modlin, R., Krensky, A., and Eisenberg, D. (2003). Granulysin crystal structure and a structure-derived lytic mechanism. *Journal of molecular biology* *325*, 355-365.
- Anderson, G., Gries, M., Kurihara, N., Honjo, T., Anderson, J., Donnenberg, V., Donnenberg, A., Ghobrial, I., Mapara, M.Y., Stirling, D., *et al.* (2006). Thalidomide derivative CC-4047 inhibits osteoclast formation by down-regulation of PU.1. *Blood* *107*, 3098-3105.
- Anfossi, N., Andre, P., Guia, S., Falk, C.S., Roetyncck, S., Stewart, C.A., Bresò, V., Frassati, C., Reviron, D., Middleton, D., *et al.* (2006). Human NK cell education by inhibitory receptors for MHC class I. *Immunity* *25*, 331-342.
- Angelini, D.F., Borsellino, G., Poupot, M., Diamantini, A., Poupot, R., Bernardi, G., Poccia, F., Fournie, J.J., and Battistini, L. (2004). FcγRIII discriminates between 2 subsets of Vγ9Vδ2 effector cells with different responses and activation pathways. *Blood* *104*, 1801-1807.
- Arnon, T.I., Achdout, H., Lieberman, N., Gazit, R., Gonen-Gross, T., Katz, G., Bar-Ilan, A., Bloustein, N., Lev, M., Joseph, A., *et al.* (2004). The mechanisms controlling the recognition of tumor- and virus-infected cells by NKp46. *Blood* *103*, 664-672.
- Aswald, J.M., Wang, X.H., Aswald, S., Lutynski, A., Minden, M.D., Messner, H.A., and Keating, A. (2006). Flow cytometric assessment of autologous gammadelta T cells in patients with acute myeloid leukemia: potential effector cells for immunotherapy? *Cytometry* *70*, 379-390.
- Attar, E.C., De Angelo, D.J., Supko, J.G., D'Amato, F., Zahrieh, D., Sirulnik, A., Wadleigh, M., Ballen, K.K., McAfee, S., Miller, K.B., *et al.* (2008). Phase I and pharmacokinetic study of bortezomib in combination with idarubicin and cytarabine in patients with acute myelogenous leukemia. *Clin Cancer Res* *14*, 1446-1454.
- Aue, G., Njuguna, N., Tian, X., Soto, S., Hughes, T., Vire, B., Keyvanfar, K., Gibellini, F., Valdez, J., Boss, C., *et al.* (2009). Lenalidomide-induced upregulation of CD80 on tumor cells correlates with T-cell activation, the rapid onset of a cytokine release syndrome and leukemic cell clearance in chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica* *94*, 1266-1273.
- Awan, F.T., Lapalombella, R., Trotta, R., Butchar, J.P., Yu, B., Benson, D.M., Jr., Roda, J.M., Cheney, C., Mo, X., Lehman, A., *et al.* (2010). CD19 targeting of chronic lymphocytic leukemia with a novel Fc-domain-engineered monoclonal antibody. *Blood* *115*, 1204-1213.
- Bae, J., Martinson, J.A., and Klingemann, H.G. (2004). Identification of novel CD33 antigen-specific peptides for the generation of cytotoxic T lymphocytes against acute myeloid leukemia. *Cellular immunology* *227*, 38-50.
- Baer, M.R., George, S.L., Caligiuri, M.A., Sanford, B.L., Bothun, S.M., Mrozek, K., Kolitz, J.E., Powell, B.L., Moore, J.O., Stone, R.M., *et al.* (2008). Low-dose interleukin-2

immunotherapy does not improve outcome of patients age 60 years and older with acute myeloid leukemia in first complete remission: Cancer and Leukemia Group B Study 9720. *J Clin Oncol* 26, 4934-4939.

Barrett, A.J., and Rezvani, K. (2007). Translational mini-review series on vaccines: Peptide vaccines for myeloid leukaemias. *Clinical and experimental immunology* 148, 189-198.

Barry, M., and Bleackley, R.C. (2002). Cytotoxic T lymphocytes: all roads lead to death. *Nature reviews* 2, 401-409.

Barry, M., Heibey, J.A., Pinkoski, M.J., Lee, S.F., Moyer, R.W., Green, D.R., and Bleackley, R.C. (2000). Granzyme B short-circuits the need for caspase 8 activity during granule-mediated cytotoxic T-lymphocyte killing by directly cleaving Bid. *Molecular and cellular biology* 20, 3781-3794.

Bartlett, J.B., Dredge, K., and Dalgleish, A.G. (2004). The evolution of thalidomide and its IMiD derivatives as anticancer agents. *Nat Rev Cancer* 4, 314-322.

Bauer, S., Groh, V., Wu, J., Steinle, A., Phillips, J.H., Lanier, L.L., and Spies, T. (1999). Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA. *Science* (New York, NY 285, 727-729).

Beatty, G.L., Smith, J.S., Reshef, R., Patel, K.P., Colligon, T.A., Vance, B.A., Frey, N.V., Johnson, F.B., Porter, D.L., and Vonderheide, R.H. (2009). Functional unresponsiveness and replicative senescence of myeloid leukemia antigen-specific CD8+ T cells after allogeneic stem cell transplantation. *Clin Cancer Res* 15, 4944-4953.

Behl, D., Porrata, L.F., Markovic, S.N., Letendre, L., Pruthi, R.K., Hook, C.C., Tefferi, A., Elliot, M.A., Kaufmann, S.H., Mesa, R.A., *et al.* (2006). Absolute lymphocyte count recovery after induction chemotherapy predicts superior survival in acute myelogenous leukemia. *Leukemia* 20, 29-34.

Belmant, C., Denise, D. & Fournie, J.J. (2006). Phosphoantigens and aminobisphosphonates: New leads targeting gamma delta T lymphocytes for cancer immunotherapy. *drug discovery today : Therapeutic Strategies*, 17-23.

Belmant, C., Espinosa, E., Poupot, R., Peyrat, M.A., Guiraud, M., Poquet, Y., Bonneville, M., and Fournie, J.J. (1999). 3-Formyl-1-butyl pyrophosphate A novel mycobacterial metabolite-activating human gammadelta T cells. *The Journal of biological chemistry* 274, 32079-32084.

Beresford, P.J., Xia, Z., Greenberg, A.H., and Lieberman, J. (1999). Granzyme A loading induces rapid cytolysis and a novel form of DNA damage independently of caspase activation. *Immunity* 10, 585-594.

Bertone, S., Schiavetti, F., Bellomo, R., Vitale, C., Ponte, M., Moretta, L., and Mingari, M.C. (1999). Transforming growth factor-beta-induced expression of CD94/NKG2A inhibitory receptors in human T lymphocytes. *European journal of immunology* 29, 23-29.

Biassoni, R., Cantoni, C., Falco, M., Verdiani, S., Bottino, C., Vitale, M., Conte, R., Poggi, A., Moretta, A., and Moretta, L. (1996). The human leukocyte antigen (HLA)-C-specific "activatory" or "inhibitory" natural killer cell receptors display highly homologous

extracellular domains but differ in their transmembrane and intracytoplasmic portions. *The Journal of experimental medicine* 183, 645-650.

Biassoni, R., Pessino, A., Malaspina, A., Cantoni, C., Bottino, C., Sivori, S., Moretta, L., and Moretta, A. (1997). Role of amino acid position 70 in the binding affinity of p50.1 and p58.1 receptors for HLA-Cw4 molecules. *European journal of immunology* 27, 3095-3099.

Billadeau, D.D., Upshaw, J.L., Schoon, R.A., Dick, C.J., and Leibson, P.J. (2003). NKG2D-DAP10 triggers human NK cell-mediated killing via a Syk-independent regulatory pathway. *Nature immunology* 4, 557-564.

Bleakley, M., and Riddell, S.R. (2004). Molecules and mechanisms of the graft-versus-leukaemia effect. *Nat Rev Cancer* 4, 371-380.

Bonneville, M., and Fournie, J.J. (2005). Sensing cell stress and transformation through Vgamma9Vdelta2 T cell-mediated recognition of the isoprenoid pathway metabolites. *Microbes and infection / Institut Pasteur* 7, 503-509.

Boshoff, C., and Weiss, R. (2002). AIDS-related malignancies. *Nat Rev Cancer* 2, 373-382.

Boultonwood, J., Fidler, C., Strickson, A.J., Watkins, F., Gama, S., Kearney, L., Tosi, S., Kasprzyk, A., Cheng, J.F., Jaju, R.J., *et al.* (2002). Narrowing and genomic annotation of the commonly deleted region of the 5q- syndrome. *Blood* 99, 4638-4641.

Bourgeois, C., Rocha, B., and Tanchot, C. (2002). A role for CD40 expression on CD8+ T cells in the generation of CD8+ T cell memory. *Science (New York, NY)* 297, 2060-2063.

Boyiadzis, M., Memon, S., Carson, J., Allen, K., Szczepanski, M.J., Vance, B.A., Dean, R., Bishop, M.R., Gress, R.E., and Hakim, F.T. (2008). Up-regulation of NK cell activating receptors following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation under a lymphodepleting reduced intensity regimen is associated with elevated IL-15 levels. *Biol Blood Marrow Transplant* 14, 290-300.

Braud, V.M., Aldemir, H., Breart, B., and Ferlin, W.G. (2003). Expression of CD94-NKG2A inhibitory receptor is restricted to a subset of CD8+ T cells. *Trends in immunology* 24, 162-164.

Braud, V.M., Allan, D.S., O'Callaghan, C.A., Soderstrom, K., D'Andrea, A., Ogg, G.S., Lazetic, S., Young, N.T., Bell, J.I., Phillips, J.H., *et al.* (1998). HLA-E binds to natural killer cell receptors CD94/NKG2A, B and C. *Nature* 391, 795-799.

Breitkreutz, I., Raab, M.S., Vallet, S., Hideshima, T., Raje, N., Mitsiades, C., Chauhan, D., Okawa, Y., Munshi, N.C., Richardson, P.G., *et al.* (2008). Lenalidomide inhibits osteoclastogenesis, survival factors and bone-remodeling markers in multiple myeloma. *Leukemia* 22, 1925-1932.

Brody, J., and Advani, R. (2006). Treatment of mantle cell lymphoma: current approach and future directions. *Critical reviews in oncology/hematology* 58, 257-265.

Brune, M., Castaigne, S., Catalano, J., Gehlsen, K., Ho, A.D., Hofmann, W.K., Hogge, D.E., Nilsson, B., Or, R., Romero, A.I., *et al.* (2006). Improved leukemia-free survival after

postconsolidation immunotherapy with histamine dihydrochloride and interleukin-2 in acute myeloid leukemia: results of a randomized phase 3 trial. *Blood* 108, 88-96.

Bryceson, Y.T., March, M.E., Ljunggren, H.G., and Long, E.O. (2006). Synergy among receptors on resting NK cells for the activation of natural cytotoxicity and cytokine secretion. *Blood* 107, 159-166.

Burnet, F.M. (1957). Cancer-a biological approach. *brit med j* 1, 841-847.

Caccamo, N., Battistini, L., Bonneville, M., Poccia, F., Fournie, J.J., Meraviglia, S., Borsellino, G., Kroczyk, R.A., La Mendola, C., Scotet, E., *et al.* (2006). CXCR5 identifies a subset of Vgamma9Vdelta2 T cells which secrete IL-4 and IL-10 and help B cells for antibody production. *J Immunol* 177, 5290-5295.

Cantoni, C., Biassoni, R., Pende, D., Sivori, S., Accame, L., Pareti, L., Semenzato, G., Moretta, L., Moretta, A., and Bottino, C. (1998). The activating form of CD94 receptor complex: CD94 covalently associates with the Kp39 protein that represents the product of the NKG2-C gene. *European journal of immunology* 28, 327-338.

Cao, E., Ramagopal, U.A., Fedorov, A., Fedorov, E., Yan, Q., Lary, J.W., Cole, J.L., Nathenson, S.G., and Almo, S.C. (2006). NTB-A receptor crystal structure: insights into homophilic interactions in the signaling lymphocytic activation molecule receptor family. *Immunity* 25, 559-570.

Capietto, A.H., Keirallah, S., Gross, E., Dauguet, N., Laprevotte, E., Jean, C., Gertner-Dardenne, J., Bezombes, C., Quillet-Mary, A., Poupot, M., *et al.* (2010). Emerging concepts for the treatment of hematological malignancies with therapeutic monoclonal antibodies. *Current drug targets* 11, 790-800.

Cartron, G., Watier, H., Golay, J., and Solal-Celigny, P. (2004). From the bench to the bedside: ways to improve rituximab efficacy. *Blood* 104, 2635-2642.

Casanova, J.L., and Abel, L. (2004). The human model: a genetic dissection of immunity to infection in natural conditions. *Nature reviews* 4, 55-66.

Catenacci, D.V., and Schiller, G.J. (2005). Myelodysplastic syndromes: a comprehensive review. *Blood reviews* 19, 301-319.

Cedar, H., and Bergman, Y. (2009). Linking DNA methylation and histone modification: patterns and paradigms. *Nat Rev Genet* 10, 295-304.

Champsaur, M., Beilke, J.N., Ogasawara, K., Koszinowski, U.H., Jonjic, S., and Lanier, L.L. (2010). Intact NKG2D-Independent Function of NK Cells Chronically Stimulated with the NKG2D Ligand Rae-1. *J Immunol*.

Chan, A., Hong, D.L., Atzberger, A., Kollnberger, S., Filer, A.D., Buckley, C.D., McMichael, A., Enver, T., and Bowness, P. (2007). CD56bright human NK cells differentiate into CD56dim cells: role of contact with peripheral fibroblasts. *J Immunol* 179, 89-94.

Chan, A.C., Neeson, P., Leeansyah, E., Tainton, K., Quach, H., Prince, H.M., Godfrey, D.I., Ritchie, D., and Berzins, S.P. (2010). Testing the NKT cell hypothesis in lenalidomide-treated myelodysplastic syndrome patients. *Leukemia* 24, 592-600.

- Chanan-Khan, A., Miller, K.C., Musial, L., Lawrence, D., Padmanabhan, S., Takeshita, K., Porter, C.W., Goodrich, D.W., Bernstein, Z.P., Wallace, P., *et al.* (2006). Clinical efficacy of lenalidomide in patients with relapsed or refractory chronic lymphocytic leukemia: results of a phase II study. *J Clin Oncol* 24, 5343-5349.
- Chang, D.H., Liu, N., Klimek, V., Hassoun, H., Mazumder, A., Nimer, S.D., Jagannath, S., and Dhodapkar, M.V. (2006). Enhancement of ligand-dependent activation of human natural killer T cells by lenalidomide: therapeutic implications. *Blood* 108, 618-621.
- Charbonnier, A., Gaugler, B., Sainty, D., Lafage-Pochitaloff, M., and Olive, D. (1999). Human acute myeloblastic leukemia cells differentiate in vitro into mature dendritic cells and induce the differentiation of cytotoxic T cells against autologous leukemias. *European journal of immunology* 29, 2567-2578.
- Choudhury, B.A., Liang, J.C., Thomas, E.K., Flores-Romo, L., Xie, Q.S., Agusala, K., Sutaria, S., Sinha, I., Champlin, R.E., and Claxton, D.F. (1999). Dendritic cells derived in vitro from acute myelogenous leukemia cells stimulate autologous, antileukemic T-cell responses. *Blood* 93, 780-786.
- Clayton, A., Mitchell, J.P., Court, J., Linnane, S., Mason, M.D., and Tabi, Z. (2008). Human tumor-derived exosomes down-modulate NKG2D expression. *J Immunol* 180, 7249-7258.
- Cleary, M.L. (2009). Regulating the leukaemia stem cell. *Best practice & research* 22, 483-487.
- Clemenceau, B., Vivien, R., Berthome, M., Robillard, N., Garand, R., Gallot, G., Vollant, S., and Vie, H. (2008). Effector memory alpha beta T lymphocytes can express Fc gamma RIIIa and mediate antibody-dependent cellular cytotoxicity. *J Immunol* 180, 5327-5334.
- Colonna, M., Navarro, F., Bellon, T., Llano, M., Garcia, P., Samaridis, J., Angman, L., Cella, M., and Lopez-Botet, M. (1997). A common inhibitory receptor for major histocompatibility complex class I molecules on human lymphoid and myelomonocytic cells. *The Journal of experimental medicine* 186, 1809-1818.
- Constant, P., Davodeau, F., Peyrat, M.A., Poquet, Y., Puzo, G., Bonneville, M., and Fournie, J.J. (1994). Stimulation of human gamma delta T cells by nonpeptidic mycobacterial ligands. *Science (New York, NY)* 264, 267-270.
- Cooley, S., McCullar, V., Wangen, R., Bergemann, T.L., Spellman, S., Weisdorf, D.J., and Miller, J.S. (2005). KIR reconstitution is altered by T cells in the graft and correlates with clinical outcomes after unrelated donor transplantation. *Blood* 106, 4370-4376.
- Cooper, M.A., Fehniger, T.A., and Caligiuri, M.A. (2001). The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends in immunology* 22, 633-640.
- Corral, L.G., Haslett, P.A., Muller, G.W., Chen, R., Wong, L.M., Ocampo, C.J., Patterson, R.T., Stirling, D.I., and Kaplan, G. (1999). Differential cytokine modulation and T cell activation by two distinct classes of thalidomide analogues that are potent inhibitors of TNF-alpha. *J Immunol* 163, 380-386.
- Costello, R.T., Sivori, S., Marcenaro, E., Lafage-Pochitaloff, M., Mozziconacci, M.J., Reviron, D., Gastaut, J.A., Pende, D., Olive, D., and Moretta, A. (2002). Defective expression

and function of natural killer cell-triggering receptors in patients with acute myeloid leukemia. *Blood* 99, 3661-3667.

Cozzio, A., Passegue, E., Ayton, P.M., Karsunky, H., Cleary, M.L., and Weissman, I.L. (2003). Similar MLL-associated leukemias arising from self-renewing stem cells and short-lived myeloid progenitors. *Genes & development* 17, 3029-3035.

Crowe, N.Y., Smyth, M.J., and Godfrey, D.I. (2002). A critical role for natural killer T cells in immunosurveillance of methylcholanthrene-induced sarcomas. *The Journal of experimental medicine* 196, 119-127.

D'Amato, R.J., Loughnan, M.S., Flynn, E., and Folkman, J. (1994). Thalidomide is an inhibitor of angiogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91, 4082-4085.

Darmon, A.J., Nicholson, D.W., and Bleackley, R.C. (1995). Activation of the apoptotic protease CPP32 by cytotoxic T-cell-derived granzyme B. *Nature* 377, 446-448.

Das, H., Groh, V., Kuijl, C., Sugita, M., Morita, C.T., Spies, T., and Bukowski, J.F. (2001). MICA engagement by human Vgamma2Vdelta2 T cells enhances their antigen-dependent effector function. *Immunity* 15, 83-93.

Davies, F.E., Raje, N., Hideshima, T., Lentzsch, S., Young, G., Tai, Y.T., Lin, B., Podar, K., Gupta, D., Chauhan, D., *et al.* (2001). Thalidomide and immunomodulatory derivatives augment natural killer cell cytotoxicity in multiple myeloma. *Blood* 98, 210-216.

De Angulo, G., Yuen, C., Palla, S.L., Anderson, P.M., and Zweidler-McKay, P.A. (2008). Absolute lymphocyte count is a novel prognostic indicator in ALL and AML: implications for risk stratification and future studies. *Cancer* 112, 407-415.

De Matteo, M., Brunetti, A.E., Maiorano, E., Cafforio, P., Dammacco, F., and Silvestris, F. (2010). Constitutive down-regulation of Osterix in osteoblasts from myeloma patients: in vitro effect of Bortezomib and Lenalidomide. *Leukemia research* 34, 243-249.

De Rosa, S.C., Andrus, J.P., Perfetto, S.P., Mantovani, J.J., Herzenberg, L.A., Herzenberg, L.A., and Roederer, M. (2004). Ontogeny of gamma delta T cells in humans. *J Immunol* 172, 1637-1645.

Denniss, F.A., Breslin, A., Ingram, W., Hardwick, N.R., Mufti, G.J., and Guinn, B.A. (2007). The leukaemia-associated antigen, SSX2IP, is expressed during mitosis on the surface of myeloid leukaemia cells. *British journal of haematology* 138, 668-669.

Deol, A., and Lum, L.G. (2010). Role of donor lymphocyte infusions in relapsed hematological malignancies after stem cell transplantation revisited. *Cancer treatment reviews*.

Derre, L., Corvaisier, M., Pandolfino, M.C., Diez, E., Jotereau, F., and Gervois, N. (2002). Expression of CD94/NKG2-A on human T lymphocytes is induced by IL-12: implications for adoptive immunotherapy. *J Immunol* 168, 4864-4870.

Deusch, K., Luling, F., Reich, K., Classen, M., Wagner, H., and Pfeffer, K. (1991). A major fraction of human intraepithelial lymphocytes simultaneously expresses the gamma/delta T

cell receptor, the CD8 accessory molecule and preferentially uses the V delta 1 gene segment. *European journal of immunology* 21, 1053-1059.

Devilder, M.C., Maillet, S., Bouyge-Moreau, I., Donnadieu, E., Bonneville, M., and Scotet, E. (2006). Potentiation of antigen-stimulated V gamma 9V delta 2 T cell cytokine production by immature dendritic cells (DC) and reciprocal effect on DC maturation. *J Immunol* 176, 1386-1393.

Di Santo, J.P. (2008). Natural killer cells: diversity in search of a niche. *Nature immunology* 9, 473-475.

Dick, J.E. (2008). Stem cell concepts renew cancer research. *Blood* 112, 4793-4807.

Dieli, F., Poccia, F., Lipp, M., Sireci, G., Caccamo, N., Di Sano, C., and Salerno, A. (2003). Differentiation of effector/memory Vdelta2 T cells and migratory routes in lymph nodes or inflammatory sites. *The Journal of experimental medicine* 198, 391-397.

Dieli, F., Troye-Blomberg, M., Ivanyi, J., Fournie, J.J., Krensky, A.M., Bonneville, M., Peyrat, M.A., Caccamo, N., Sireci, G., and Salerno, A. (2001). Granulysin-dependent killing of intracellular and extracellular *Mycobacterium tuberculosis* by Vgamma9/Vdelta2 T lymphocytes. *The Journal of infectious diseases* 184, 1082-1085.

Diermayr, S., Himmelreich, H., Durovic, B., Mathys-Schneeberger, A., Siegler, U., Langenkamp, U., Hofsteenge, J., Gratwohl, A., Tichelli, A., Paluszewska, M., *et al.* (2008). NKG2D ligand expression in AML increases in response to HDAC inhibitor valproic acid and contributes to allorecognition by NK-cell lines with single KIR-HLA class I specificities. *Blood* 111, 1428-1436.

Dimopoulos, M., Spencer, A., Attal, M., Prince, H.M., Harousseau, J.L., Dmoszynska, A., San Miguel, J., Hellmann, A., Facon, T., Foa, R., *et al.* (2007). Lenalidomide plus dexamethasone for relapsed or refractory multiple myeloma. *The New England journal of medicine* 357, 2123-2132.

Dimopoulos, M.A., Chen, C., Spencer, A., Niesvizky, R., Attal, M., Stadtmauer, E.A., Petrucci, M.T., Yu, Z., Olesnyckyj, M., Zeldis, J.B., *et al.* (2009). Long-term follow-up on overall survival from the MM-009 and MM-010 phase III trials of lenalidomide plus dexamethasone in patients with relapsed or refractory multiple myeloma. *Leukemia* 23, 2147-2152.

Dimopoulos, M.A., Kastiris, E., and Rajkumar, S.V. (2008). Treatment of plasma cell dyscrasias with lenalidomide. *Leukemia* 22, 1343-1353.

Dispenzieri, A., Lacy, M.Q., Zeldenrust, S.R., Hayman, S.R., Kumar, S.K., Geyer, S.M., Lust, J.A., Alred, J.B., Witzig, T.E., Rajkumar, S.V., *et al.* (2007). The activity of lenalidomide with or without dexamethasone in patients with primary systemic amyloidosis. *Blood* 109, 465-470.

Dohner, H., Estey, E.H., Amadori, S., Appelbaum, F.R., Buchner, T., Burnett, A.K., Dombret, H., Fenau, P., Grimwade, D., Larson, R.A., *et al.* (2010). Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood* 115, 453-474.

- Dolcetti, R. (2007). B lymphocytes and Epstein-Barr virus: the lesson of post-transplant lymphoproliferative disorders. *Autoimmunity reviews* 7, 96-101.
- Dolstra, H., Fredrix, H., van der Meer, A., de Witte, T., Figdor, C., and van de Wiel-van Kemenade, E. (2001). TCR gamma delta cytotoxic T lymphocytes expressing the killer cell-inhibitory receptor p58.2 (CD158b) selectively lyse acute myeloid leukemia cells. *Bone marrow transplantation* 27, 1087-1093.
- Dredge, K., Horsfall, R., Robinson, S.P., Zhang, L.H., Lu, L., Tang, Y., Shirley, M.A., Muller, G., Schafer, P., Stirling, D., *et al.* (2005). Orally administered lenalidomide (CC-5013) is anti-angiogenic in vivo and inhibits endothelial cell migration and Akt phosphorylation in vitro. *Microvascular research* 69, 56-63.
- Dredge, K., Marriott, J.B., Macdonald, C.D., Man, H.W., Chen, R., Muller, G.W., Stirling, D., and Dalglish, A.G. (2002). Novel thalidomide analogues display anti-angiogenic activity independently of immunomodulatory effects. *British journal of cancer* 87, 1166-1172.
- Dulphy, N., Haas, P., Busson, M., Belhadj, S., Peffault de Latour, R., Robin, M., Carmagnat, M., Loiseau, P., Tamouza, R., Scieux, C., *et al.* (2008). An unusual CD56(bright) CD16(low) NK cell subset dominates the early posttransplant period following HLA-matched hematopoietic stem cell transplantation. *J Immunol* 181, 2227-2237.
- Dunn, G.P., Bruce, A.T., Ikeda, H., Old, L.J., and Schreiber, R.D. (2002). Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nature immunology* 3, 991-998.
- Dunn, G.P., Koebel, C.M., and Schreiber, R.D. (2006). Interferons, immunity and cancer immunoediting. *Nature reviews* 6, 836-848.
- Dunn, G.P., Old, L.J., and Schreiber, R.D. (2004a). The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Immunity* 21, 137-148.
- Dunn, G.P., Old, L.J., and Schreiber, R.D. (2004b). The three Es of cancer immunoediting. *Annual review of immunology* 22, 329-360.
- Ebert, B.L., Galili, N., Tamayo, P., Bosco, J., Mak, R., Pretz, J., Tanguturi, S., Ladd-Acosta, C., Stone, R., Golub, T.R., *et al.* (2008a). An erythroid differentiation signature predicts response to lenalidomide in myelodysplastic syndrome. *PLoS medicine* 5, e35.
- Ebert, B.L., Pretz, J., Bosco, J., Chang, C.Y., Tamayo, P., Galili, N., Raza, A., Root, D.E., Attar, E., Ellis, S.R., *et al.* (2008b). Identification of RPS14 as a 5q- syndrome gene by RNA interference screen. *Nature* 451, 335-339.
- Ehrlich, P. (1909). Ueber den jetzigen stand der Karzinomforschung. *Ned Tijdschr Geneeskd* 5, 273-290.
- Espinosa, E., Belmont, C., Pont, F., Luciani, B., Poupot, R., Romagne, F., Brailly, H., Bonneville, M., and Fournie, J.J. (2001). Chemical synthesis and biological activity of bromohydrin pyrophosphate, a potent stimulator of human gamma delta T cells. *The Journal of biological chemistry* 276, 18337-18344.

- Faccio, R., Takeshita, S., Zallone, A., Ross, F.P., and Teitelbaum, S.L. (2003). c-Fms and the alphavbeta3 integrin collaborate during osteoclast differentiation. *The Journal of clinical investigation* *111*, 749-758.
- Fan, Z., Beresford, P.J., Oh, D.Y., Zhang, D., and Lieberman, J. (2003). Tumor suppressor NM23-H1 is a granzyme A-activated DNase during CTL-mediated apoptosis, and the nucleosome assembly protein SET is its inhibitor. *Cell* *112*, 659-672.
- Faure, M., and Long, E.O. (2002). KIR2DL4 (CD158d), an NK cell-activating receptor with inhibitory potential. *J Immunol* *168*, 6208-6214.
- Fauriat, C., Just-Landi, S., Mallet, F., Arnoulet, C., Sainty, D., Olive, D., and Costello, R.T. (2007). Deficient expression of NCR in NK cells from acute myeloid leukemia: Evolution during leukemia treatment and impact of leukemia cells in NCRdull phenotype induction. *Blood* *109*, 323-330.
- Favier, B., Lemaout, J., Lesport, E., and Carosella, E.D. (2010). ILT2/HLA-G interaction impairs NK-cell functions through the inhibition of the late but not the early events of the NK-cell activating synapse. *Faseb J* *24*, 689-699.
- Fehniger, T.A., Byrd, J.C., Marcucci, G., Abboud, C.N., Kefauver, C., Payton, J.E., Vij, R., and Blum, W. (2009). Single-agent lenalidomide induces complete remission of acute myeloid leukemia in patients with isolated trisomy 13. *Blood* *113*, 1002-1005.
- Fehniger, T.A., Cooper, M.A., Nuovo, G.J., Cella, M., Facchetti, F., Colonna, M., and Caligiuri, M.A. (2003). CD56bright natural killer cells are present in human lymph nodes and are activated by T cell-derived IL-2: a potential new link between adaptive and innate immunity. *Blood* *101*, 3052-3057.
- Fehniger, T.A., Shah, M.H., Turner, M.J., VanDeusen, J.B., Whitman, S.P., Cooper, M.A., Suzuki, K., Wechser, M., Goodsaid, F., and Caligiuri, M.A. (1999). Differential cytokine and chemokine gene expression by human NK cells following activation with IL-18 or IL-15 in combination with IL-12: implications for the innate immune response. *J Immunol* *162*, 4511-4520.
- Feldman, E., Kalaycio, M., Weiner, G., Frankel, S., Schulman, P., Schwartzberg, L., Jurcic, J., Velez-Garcia, E., Seiter, K., Scheinberg, D., *et al.* (2003). Treatment of relapsed or refractory acute myeloid leukemia with humanized anti-CD33 monoclonal antibody HuM195. *Leukemia* *17*, 314-318.
- Feldman, E.J., Brandwein, J., Stone, R., Kalaycio, M., Moore, J., O'Connor, J., Wedel, N., Roboz, G.J., Miller, C., Chopra, R., *et al.* (2005). Phase III randomized multicenter study of a humanized anti-CD33 monoclonal antibody, lintuzumab, in combination with chemotherapy, versus chemotherapy alone in patients with refractory or first-relapsed acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol* *23*, 4110-4116.
- Ferlazzo, G., Tsang, M.L., Moretta, L., Melioli, G., Steinman, R.M., and Munz, C. (2002). Human dendritic cells activate resting natural killer (NK) cells and are recognized via the NKp30 receptor by activated NK cells. *The Journal of experimental medicine* *195*, 343-351.
- Ferrajoli, A., Lee, B.N., Schlette, E.J., O'Brien, S.M., Gao, H., Wen, S., Wierda, W.G., Estrov, Z., Faderl, S., Cohen, E.N., *et al.* (2008). Lenalidomide induces complete and partial

remissions in patients with relapsed and refractory chronic lymphocytic leukemia. *Blood* *111*, 5291-5297.

Ferrini, S., Cambiaggi, A., Meazza, R., Sforzini, S., Marciano, S., Mingari, M.C., and Moretta, L. (1994). T cell clones expressing the natural killer cell-related p58 receptor molecule display heterogeneity in phenotypic properties and p58 function. *European journal of immunology* *24*, 2294-2298.

Figdor, C.G., de Vries, I.J., Lesterhuis, W.J., and Melief, C.J. (2004). Dendritic cell immunotherapy: mapping the way. *Nature medicine* *10*, 475-480.

Fisch, P., Malkovsky, M., Kovats, S., Sturm, E., Braakman, E., Klein, B.S., Voss, S.D., Morrissey, L.W., DeMars, R., Welch, W.J., *et al.* (1990). Recognition by human V gamma 9/V delta 2 T cells of a GroEL homolog on Daudi Burkitt's lymphoma cells. *Science (New York, NY)* *250*, 1269-1273.

Fooksman, D.R., Vardhana, S., Vasiliver-Shamis, G., Liese, J., Blair, D.A., Waite, J., Sacristan, C., Victora, G.D., Zanin-Zhorov, A., and Dustin, M.L. (2010). Functional anatomy of T cell activation and synapse formation. *Annual review of immunology* *28*, 79-105.

Framson, P.E., and Sage, E.H. (2004). SPARC and tumor growth: where the seed meets the soil? *Journal of cellular biochemistry* *92*, 679-690.

Freud, A.G., Becknell, B., Roychowdhury, S., Mao, H.C., Ferketich, A.K., Nuovo, G.J., Hughes, T.L., Marburger, T.B., Sung, J., Baiocchi, R.A., *et al.* (2005). A human CD34(+) subset resides in lymph nodes and differentiates into CD56bright natural killer cells. *Immunity* *22*, 295-304.

Gamen, S., Hanson, D.A., Kaspar, A., Naval, J., Krensky, A.M., and Anel, A. (1998). Granulysin-induced apoptosis. I. Involvement of at least two distinct pathways. *J Immunol* *161*, 1758-1764.

Gao, Y., Yang, W., Pan, M., Scully, E., Girardi, M., Augenlicht, L.H., Craft, J., and Yin, Z. (2003). Gamma delta T cells provide an early source of interferon gamma in tumor immunity. *The Journal of experimental medicine* *198*, 433-442.

Gardiner, C.M. (2008). Killer cell immunoglobulin-like receptors on NK cells: the how, where and why. *International journal of immunogenetics* *35*, 1-8.

Gertner-Dardenne, J., Bonnafous, C., Bezombes, C., Capietto, A.H., Scaglione, V., Ingoure, S., Cendron, D., Gross, E., Lepage, J.F., Quillet-Mary, A., *et al.* (2009). Bromohydrin pyrophosphate enhances antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity induced by therapeutic antibodies. *Blood* *113*, 4875-4884.

Ghia, P., Ferreri, A.M., and Caligaris-Cappio, F. (2007). Chronic lymphocytic leukemia. *Critical reviews in oncology/hematology* *64*, 234-246.

Giagounidis, A.A., Germing, U., and Aul, C. (2006). Biological and prognostic significance of chromosome 5q deletions in myeloid malignancies. *Clin Cancer Res* *12*, 5-10.

- Gill, S., Olson, J.A., and Negrin, R.S. (2009). Natural killer cells in allogeneic transplantation: effect on engraftment, graft-versus-tumor, and graft-versus-host responses. *Biol Blood Marrow Transplant* 15, 765-776.
- Gilliland, D.G. (2001). Hematologic malignancies. *Current opinion in hematology* 8, 189-191.
- Girardi, M., Glusac, E., Filler, R.B., Roberts, S.J., Propperova, I., Lewis, J., Tigelaar, R.E., and Hayday, A.C. (2003). The distinct contributions of murine T cell receptor (TCR)gammadelta+ and TCRalphabeta+ T cells to different stages of chemically induced skin cancer. *The Journal of experimental medicine* 198, 747-755.
- Gober, H.J., Kistowska, M., Angman, L., Jeno, P., Mori, L., and De Libero, G. (2003). Human T cell receptor gammadelta cells recognize endogenous mevalonate metabolites in tumor cells. *The Journal of experimental medicine* 197, 163-168.
- Goldstone, A.H., Burnett, A.K., Wheatley, K., Smith, A.G., Hutchinson, R.M., and Clark, R.E. (2001). Attempts to improve treatment outcomes in acute myeloid leukemia (AML) in older patients: the results of the United Kingdom Medical Research Council AML11 trial. *Blood* 98, 1302-1311.
- Gorgun, G., Holderried, T.A., Zahrieh, D., Neuberg, D., and Gribben, J.G. (2005). Chronic lymphocytic leukemia cells induce changes in gene expression of CD4 and CD8 T cells. *The Journal of clinical investigation* 115, 1797-1805.
- Graf, C., Heidel, F., Tenzer, S., Radsak, M.P., Solem, F.K., Britten, C.M., Huber, C., Fischer, T., and Wolfel, T. (2007). A neoepitope generated by an FLT3 internal tandem duplication (FLT3-ITD) is recognized by leukemia-reactive autologous CD8+ T cells. *Blood* 109, 2985-2988.
- Greiner, J., Bullinger, L., Guinn, B.A., Dohner, H., and Schmitt, M. (2008). Leukemia-associated antigens are critical for the proliferation of acute myeloid leukemia cells. *Clin Cancer Res* 14, 7161-7166.
- Greiner, J., Dohner, H., and Schmitt, M. (2006a). Cancer vaccines for patients with acute myeloid leukemia--definition of leukemia-associated antigens and current clinical protocols targeting these antigens. *Haematologica* 91, 1653-1661.
- Greiner, J., Li, L., Ringhoffer, M., Barth, T.F., Giannopoulos, K., Guillaume, P., Ritter, G., Wiesneth, M., Dohner, H., and Schmitt, M. (2005). Identification and characterization of epitopes of the receptor for hyaluronic acid-mediated motility (RHAMM/CD168) recognized by CD8+ T cells of HLA-A2-positive patients with acute myeloid leukemia. *Blood* 106, 938-945.
- Greiner, J., Schmitt, M., Li, L., Giannopoulos, K., Bosch, K., Schmitt, A., Dohner, K., Schlenk, R.F., Pollack, J.R., Dohner, H., *et al.* (2006b). Expression of tumor-associated antigens in acute myeloid leukemia: Implications for specific immunotherapeutic approaches. *Blood* 108, 4109-4117.
- Groh, V., Rhinehart, R., Randolph-Habecker, J., Topp, M.S., Riddell, S.R., and Spies, T. (2001). Costimulation of CD8alphabeta T cells by NKG2D via engagement by MIC induced on virus-infected cells. *Nature immunology* 2, 255-260.

- Groh, V., Wu, J., Yee, C., and Spies, T. (2002). Tumour-derived soluble MIC ligands impair expression of NKG2D and T-cell activation. *Nature* *419*, 734-738.
- Group, C.T.C. (1997). Interferon alfa versus chemotherapy for chronic myeloid leukemia: a meta-analysis of seven randomized trials: Chronic Myeloid Leukemia Trialists' Collaborative Group. *Journal of the National Cancer Institute* *89*, 1616-1620.
- Guermontprez, P., Valladeau, J., Zitvogel, L., Thery, C., and Amigorena, S. (2002). Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. *Annual review of immunology* *20*, 621-667.
- Guinn, B., Greiner, J., Schmitt, M., and Mills, K.I. (2009). Elevated expression of the leukemia-associated antigen SSX2IP predicts survival in acute myeloid leukemia patients who lack detectable cytogenetic rearrangements. *Blood* *113*, 1203-1204.
- Gupta, D., Treon, S.P., Shima, Y., Hideshima, T., Podar, K., Tai, Y.T., Lin, B., Lentzsch, S., Davies, F.E., Chauhan, D., *et al.* (2001). Adherence of multiple myeloma cells to bone marrow stromal cells upregulates vascular endothelial growth factor secretion: therapeutic applications. *Leukemia* *15*, 1950-1961.
- Habermann, T.M., Lossos, I.S., Justice, G., Vose, J.M., Wiernik, P.H., McBride, K., Wride, K., Ervin-Haynes, A., Takeshita, K., Pietronigro, D., *et al.* (2009). Lenalidomide oral monotherapy produces a high response rate in patients with relapsed or refractory mantle cell lymphoma. *British journal of haematology* *145*, 344-349.
- Halary, F., Peyrat, M.A., Champagne, E., Lopez-Botet, M., Moretta, A., Moretta, L., Vie, H., Fournie, J.J., and Bonneville, M. (1997). Control of self-reactive cytotoxic T lymphocytes expressing gamma delta T cell receptors by natural killer inhibitory receptors. *European journal of immunology* *27*, 2812-2821.
- Hall, C.L., Yang, B., Yang, X., Zhang, S., Turley, M., Samuel, S., Lange, L.A., Wang, C., Curpen, G.D., Savani, R.C., *et al.* (1995). Overexpression of the hyaluronan receptor RHAMM is transforming and is also required for H-ras transformation. *Cell* *82*, 19-26.
- Haslett, P.A., Corral, L.G., Albert, M., and Kaplan, G. (1998). Thalidomide costimulates primary human T lymphocytes, preferentially inducing proliferation, cytokine production, and cytotoxic responses in the CD8+ subset. *The Journal of experimental medicine* *187*, 1885-1892.
- Hayashi, T., Hideshima, T., Akiyama, M., Podar, K., Yasui, H., Raje, N., Kumar, S., Chauhan, D., Treon, S.P., Richardson, P., *et al.* (2005). Molecular mechanisms whereby immunomodulatory drugs activate natural killer cells: clinical application. *British journal of haematology* *128*, 192-203.
- Hayday, A.C. (2000). [gamma][delta] cells: a right time and a right place for a conserved third way of protection. *Annual review of immunology* *18*, 975-1026.
- Hideshima, T., Chauhan, D., Schlossman, R., Richardson, P., and Anderson, K.C. (2001). The role of tumor necrosis factor alpha in the pathophysiology of human multiple myeloma: therapeutic applications. *Oncogene* *20*, 4519-4527.

- Hintz, M., Reichenberg, A., Altincicek, B., Bahr, U., Gschwind, R.M., Kollas, A.K., Beck, E., Wiesner, J., Eberl, M., and Jomaa, H. (2001). Identification of (E)-4-hydroxy-3-methyl-but-2-enyl pyrophosphate as a major activator for human gammadelta T cells in *Escherichia coli*. *FEBS letters* 509, 317-322.
- Horowitz, M.M., Gale, R.P., Sondel, P.M., Goldman, J.M., Kersey, J., Kolb, H.J., Rimm, A.A., Ringden, O., Rozman, C., Speck, B., *et al.* (1990). Graft-versus-leukemia reactions after bone marrow transplantation. *Blood* 75, 555-562.
- Houtenbos, I., Westers, T.M., Ossenkoppele, G.J., and van de Loosdrecht, A.A. (2006). Leukemia-derived dendritic cells: towards clinical vaccination protocols in acute myeloid leukemia. *Haematologica* 91, 348-355.
- Huntington, N.D., Legrand, N., Alves, N.L., Jaron, B., Weijer, K., Plet, A., Corcuff, E., Mortier, E., Jacques, Y., Spits, H., *et al.* (2009). IL-15 trans-presentation promotes human NK cell development and differentiation in vivo. *The Journal of experimental medicine* 206, 25-34.
- Hussein, K., and Tefferi, A. (2009). Lenalidomide-induced durable hematological and cytogenetic remission in del(5q)-associated de novo acute myeloid leukemia. *Leukemia research* 33, e132-133.
- Ikehara, S., Pahwa, R.N., Fernandes, G., Hansen, C.T., and Good, R.A. (1984). Functional T cells in athymic nude mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 81, 886-888.
- Ishikawa, F., Yoshida, S., Saito, Y., Hijikata, A., Kitamura, H., Tanaka, S., Nakamura, R., Tanaka, T., Tomiyama, H., Saito, N., *et al.* (2007). Chemotherapy-resistant human AML stem cells home to and engraft within the bone-marrow endosteal region. *Nature biotechnology* 25, 1315-1321.
- Jabri, B., Selby, J.M., Negulescu, H., Lee, L., Roberts, A.I., Beavis, A., Lopez-Botet, M., Ebert, E.C., and Winchester, R.J. (2002). TCR specificity dictates CD94/NKG2A expression by human CTL. *Immunity* 17, 487-499.
- Jameson, S.C. (2002). Maintaining the norm: T-cell homeostasis. *Nature reviews* 2, 547-556.
- Jin, L., Hope, K.J., Zhai, Q., Smadja-Joffe, F., and Dick, J.E. (2006). Targeting of CD44 eradicates human acute myeloid leukemic stem cells. *Nature medicine* 12, 1167-1174.
- Joncker, N.T., Fernandez, N.C., Treiner, E., Vivier, E., and Raulet, D.H. (2009). NK cell responsiveness is tuned commensurate with the number of inhibitory receptors for self-MHC class I: the rheostat model. *J Immunol* 182, 4572-4580.
- Jonsson, A.H., and Yokoyama, W.M. (2009). Natural killer cell tolerance licensing and other mechanisms. *Advances in immunology* 101, 27-79.
- Karre, K. (2008). Natural killer cell recognition of missing self. *Nature immunology* 9, 477-480.

- Karre, K., Ljunggren, H.G., Piontek, G., and Kiessling, R. (1986). Selective rejection of H-2-deficient lymphoma variants suggests alternative immune defence strategy. *Nature* 319, 675-678.
- Keilholz, U., Letsch, A., Busse, A., Asemissen, A.M., Bauer, S., Blau, I.W., Hofmann, W.K., Uharek, L., Thiel, E., and Scheibenbogen, C. (2009). A clinical and immunologic phase 2 trial of Wilms tumor gene product 1 (WT1) peptide vaccination in patients with AML and MDS. *Blood* 113, 6541-6548.
- Kelly, J.M., Waterhouse, N.J., Cretney, E., Browne, K.A., Ellis, S., Trapani, J.A., and Smyth, M.J. (2004). Granzyme M mediates a novel form of perforin-dependent cell death. *The Journal of biological chemistry* 279, 22236-22242.
- Kennedy, R., and Celis, E. (2008). Multiple roles for CD4+ T cells in anti-tumor immune responses. *Immunological reviews* 222, 129-144.
- Kiladjian, J.J., Bourgeois, E., Lobe, I., Braun, T., Visentin, G., Bourhis, J.H., Fenaux, P., Chouaib, S., and Caignard, A. (2006). Cytolytic function and survival of natural killer cells are severely altered in myelodysplastic syndromes. *Leukemia* 20, 463-470.
- Kim, S., Poursine-Laurent, J., Truscott, S.M., Lybarger, L., Song, Y.J., Yang, L., French, A.R., Sunwoo, J.B., Lemieux, S., Hansen, T.H., *et al.* (2005). Licensing of natural killer cells by host major histocompatibility complex class I molecules. *Nature* 436, 709-713.
- Koebel, C.M., Vermi, W., Swann, J.B., Zerafa, N., Rodig, S.J., Old, L.J., Smyth, M.J., and Schreiber, R.D. (2007). Adaptive immunity maintains occult cancer in an equilibrium state. *Nature* 450, 903-907.
- Krammer, P.H. (2000). CD95's deadly mission in the immune system. *Nature* 407, 789-795.
- Krause, D.S., and Van Etten, R.A. (2007). Right on target: eradicating leukemic stem cells. *Trends in molecular medicine* 13, 470-481.
- Krivtsov, A.V., Twomey, D., Feng, Z., Stubbs, M.C., Wang, Y., Faber, J., Levine, J.E., Wang, J., Hahn, W.C., Gilliland, D.G., *et al.* (2006). Transformation from committed progenitor to leukaemia stem cell initiated by MLL-AF9. *Nature* 442, 818-822.
- Krug, U., Lubbert, M., and Buchner, T. (2010). Maintenance therapy in acute myeloid leukemia revisited: will new agents rekindle an old interest? *Current opinion in hematology* 17, 85-90.
- Kuendgen, A., and Germing, U. (2009). Emerging treatment strategies for acute myeloid leukemia (AML) in the elderly. *Cancer treatment reviews* 35, 97-120.
- Kumar, S., Chen, M.G., Gastineau, D.A., Gertz, M.A., Inwards, D.J., Lacy, M.Q., Tefferi, A., and Litzow, M.R. (2001). Effect of slow lymphocyte recovery and type of graft-versus-host disease prophylaxis on relapse after allogeneic bone marrow transplantation for acute myelogenous leukemia. *Bone marrow transplantation* 28, 951-956.
- Kunzmann, V., Bauer, E., and Wilhelm, M. (1999). Gamma/delta T-cell stimulation by pamidronate. *The New England journal of medicine* 340, 737-738.

- Lafont, V., Liautard, J., Liautard, J.P., and Favero, J. (2001). Production of TNF-alpha by human V gamma 9V delta 2 T cells via engagement of Fc gamma RIIIA, the low affinity type 3 receptor for the Fc portion of IgG, expressed upon TCR activation by nonpeptidic antigen. *J Immunol* *166*, 7190-7199.
- Lancet, J.E., List, A.F., and Moscinski, L.C. (2007). Treatment of deletion 5q acute myeloid leukemia with lenalidomide. *Leukemia* *21*, 586-588.
- Lanier, L.L. (2008). Up on the tightrope: natural killer cell activation and inhibition. *Nature immunology* *9*, 495-502.
- Lapidot, T., Sirard, C., Vormoor, J., Murdoch, B., Hoang, T., Caceres-Cortes, J., Minden, M., Paterson, B., Caligiuri, M.A., and Dick, J.E. (1994). A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature* *367*, 645-648.
- Le Bouteiller, P., Barakonyi, A., Giustiniani, J., Lenfant, F., Marie-Cardine, A., Aguerre-Girr, M., Rabot, M., Hilgert, I., Mami-Chouaib, F., Tabiasco, J., *et al.* (2002). Engagement of CD160 receptor by HLA-C is a triggering mechanism used by circulating natural killer (NK) cells to mediate cytotoxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *99*, 16963-16968.
- Le Dieu, R., Taussig, D.C., Ramsay, A.G., Mitter, R., Miraki-Moud, F., Fatah, R., Lee, A.M., Lister, T.A., and Gribben, J.G. (2009). Peripheral blood T cells in acute myeloid leukemia (AML) patients at diagnosis have abnormal phenotype and genotype and form defective immune synapses with AML blasts. *Blood* *114*, 3909-3916.
- LeBlanc, R., Hideshima, T., Catley, L.P., Shringarpure, R., Burger, R., Mitsiades, N., Mitsiades, C., Cheema, P., Chauhan, D., Richardson, P.G., *et al.* (2004). Immunomodulatory drug costimulates T cells via the B7-CD28 pathway. *Blood* *103*, 1787-1790.
- Lee, J.C., Lee, K.M., Kim, D.W., and Heo, D.S. (2004a). Elevated TGF-beta1 secretion and down-modulation of NKG2D underlies impaired NK cytotoxicity in cancer patients. *J Immunol* *172*, 7335-7340.
- Lee, J.J., Kook, H., Park, M.S., Nam, J.H., Choi, B.H., Song, W.H., Park, K.S., Lee, I.K., Chung, I.J., Hwang, T.J., *et al.* (2004b). Immunotherapy using autologous monocyte-derived dendritic cells pulsed with leukemic cell lysates for acute myeloid leukemia relapse after autologous peripheral blood stem cell transplantation. *Journal of clinical apheresis* *19*, 66-70.
- Lentzsch, S., LeBlanc, R., Podar, K., Davies, F., Lin, B., Hideshima, T., Catley, L., Stirling, D.I., and Anderson, K.C. (2003). Immunomodulatory analogs of thalidomide inhibit growth of Hs Sultan cells and angiogenesis in vivo. *Leukemia* *17*, 41-44.
- Lenz, G., and Staudt, L.M. (2010). Aggressive lymphomas. *The New England journal of medicine* *362*, 1417-1429.
- Li, L., Giannopoulos, K., Reinhardt, P., Tabarkiewicz, J., Schmitt, A., Greiner, J., Rolinski, J., Hus, I., Dmoszynska, A., Wiesneth, M., *et al.* (2006). Immunotherapy for patients with acute myeloid leukemia using autologous dendritic cells generated from leukemic blasts. *International journal of oncology* *28*, 855-861.

- Lieberman, J. (2003). The ABCs of granule-mediated cytotoxicity: new weapons in the arsenal. *Nature reviews* 3, 361-370.
- Lin, T.S. (2008). Lenalidomide: what is the right dose in CLL? *Blood* 111, 5268.
- Linenberger, M.L. (2005). CD33-directed therapy with gemtuzumab ozogamicin in acute myeloid leukemia: progress in understanding cytotoxicity and potential mechanisms of drug resistance. *Leukemia* 19, 176-182.
- List, A. (2009). Lenalidomide--a transforming therapeutic agent in myelodysplastic syndromes. *Clinical lymphoma & myeloma* 9 *Suppl* 3, S302-304.
- List, A., Dewald, G., Bennett, J., Giagounidis, A., Raza, A., Feldman, E., Powell, B., Greenberg, P., Thomas, D., Stone, R., *et al.* (2006a). Lenalidomide in the myelodysplastic syndrome with chromosome 5q deletion. *The New England journal of medicine* 355, 1456-1465.
- List, A., Kurtin, S., Roe, D.J., Buresh, A., Mahadevan, D., Fuchs, D., Rimsza, L., Heaton, R., Knight, R., and Zeldis, J.B. (2005). Efficacy of lenalidomide in myelodysplastic syndromes. *The New England journal of medicine* 352, 549-557.
- List, A.F., Baker, A.F., Green, S., and Bellamy, W. (2006b). Lenalidomide: targeted anemia therapy for myelodysplastic syndromes. *Cancer Control* 13 *Suppl*, 4-11.
- Liu Yin, J.A. (2002). Minimal residual disease in acute myeloid leukaemia. *Best practice & research* 15, 119-135.
- Ljunggren, H.G., and Karre, K. (1985). Host resistance directed selectively against H-2-deficient lymphoma variants. Analysis of the mechanism. *The Journal of experimental medicine* 162, 1745-1759.
- MacKie, R.M., Reid, R., and Junor, B. (2003). Fatal melanoma transferred in a donated kidney 16 years after melanoma surgery. *The New England journal of medicine* 348, 567-568.
- Maloney, D.G., Grillo-Lopez, A.J., Bodkin, D.J., White, C.A., Liles, T.M., Royston, I., Varns, C., Rosenberg, J., and Levy, R. (1997a). IDEC-C2B8: results of a phase I multiple-dose trial in patients with relapsed non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol* 15, 3266-3274.
- Maloney, D.G., Grillo-Lopez, A.J., White, C.A., Bodkin, D., Schilder, R.J., Neidhart, J.A., Janakiraman, N., Foon, K.A., Liles, T.M., Dallaire, B.K., *et al.* (1997b). IDEC-C2B8 (Rituximab) anti-CD20 monoclonal antibody therapy in patients with relapsed low-grade non-Hodgkin's lymphoma. *Blood* 90, 2188-2195.
- Mandelboim, O., Lieberman, N., Lev, M., Paul, L., Arnon, T.I., Bushkin, Y., Davis, D.M., Strominger, J.L., Yewdell, J.W., and Porgador, A. (2001). Recognition of haemagglutinins on virus-infected cells by NKp46 activates lysis by human NK cells. *Nature* 409, 1055-1060.
- Matsumoto, T., and Abe, M. (2006). Bone destruction in multiple myeloma. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1068, 319-326.
- Matsunaga, T., Fukai, F., Miura, S., Nakane, Y., Owaki, T., Kodama, H., Tanaka, M., Nagaya, T., Takimoto, R., Takayama, T., *et al.* (2008). Combination therapy of an anticancer

drug with the FNIII14 peptide of fibronectin effectively overcomes cell adhesion-mediated drug resistance of acute myelogenous leukemia. *Leukemia* 22, 353-360.

Matsunaga, T., Takemoto, N., Sato, T., Takimoto, R., Tanaka, I., Fujimi, A., Akiyama, T., Kuroda, H., Kawano, Y., Kobune, M., *et al.* (2003). Interaction between leukemic-cell VLA-4 and stromal fibronectin is a decisive factor for minimal residual disease of acute myelogenous leukemia. *Nature medicine* 9, 1158-1165.

McLaughlin, P., Grillo-Lopez, A.J., Link, B.K., Levy, R., Czuczman, M.S., Williams, M.E., Heyman, M.R., Bence-Bruckler, I., White, C.A., Cabanillas, F., *et al.* (1998). Rituximab chimeric anti-CD20 monoclonal antibody therapy for relapsed indolent lymphoma: half of patients respond to a four-dose treatment program. *J Clin Oncol* 16, 2825-2833.

Medawar, P.B. (1944). The behaviour and fate of skin autografts and skin homografts in rabbits: A report to the War Wounds Committee of the Medical Research Council. *Journal of anatomy* 78, 176-199.

Meijer, E., and Sonneveld, P. (2009). Hematology: Lenalidomide plus dexamethasone is effective in multiple myeloma. *Nat Rev Clin Oncol* 6, 247-248.

Menier, C., Rouas-Freiss, N., Favier, B., LeMaoult, J., Moreau, P., and Carosella, E.D. (2010). Recent advances on the non-classical major histocompatibility complex class I HLA-G molecule. *Tissue antigens* 75, 201-206.

Mesa, R.A., Tefferi, A., Li, C.Y., and Steensma, D.P. (2006). Hematologic and cytogenetic response to lenalidomide monotherapy in acute myeloid leukemia arising from JAK2(V617F) positive, del(5)(q13q33) myelodysplastic syndrome. *Leukemia* 20, 2063-2064.

Meshinchi, S., and Appelbaum, F.R. (2009). Structural and functional alterations of FLT3 in acute myeloid leukemia. *Clin Cancer Res* 15, 4263-4269.

Metkar, S.S., Wang, B., Aguilar-Santelises, M., Raja, S.M., Uhlin-Hansen, L., Podack, E., Trapani, J.A., and Froelich, C.J. (2002). Cytotoxic cell granule-mediated apoptosis: perforin delivers granzyme B-serglycin complexes into target cells without plasma membrane pore formation. *Immunity* 16, 417-428.

Miller, J.S., Cooley, S., Parham, P., Farag, S.S., Verneris, M.R., McQueen, K.L., Guethlein, L.A., Trachtenberg, E.A., Haagenson, M., Horowitz, M.M., *et al.* (2007). Missing KIR ligands are associated with less relapse and increased graft-versus-host disease (GVHD) following unrelated donor allogeneic HCT. *Blood* 109, 5058-5061.

Miller, J.S., Soignier, Y., Panoskaltis-Mortari, A., McNearney, S.A., Yun, G.H., Fautsch, S.K., McKenna, D., Le, C., Defor, T.E., Burns, L.J., *et al.* (2005). Successful adoptive transfer and in vivo expansion of human haploidentical NK cells in patients with cancer. *Blood* 105, 3051-3057.

Mingari, M.C., Ponte, M., Bertone, S., Schiavetti, F., Vitale, C., Bellomo, R., Moretta, A., and Moretta, L. (1998). HLA class I-specific inhibitory receptors in human T lymphocytes: interleukin 15-induced expression of CD94/NKG2A in superantigen- or alloantigen-activated CD8+ T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 1172-1177.

- Mingari, M.C., Vitale, C., Cambiaggi, A., Schiavetti, F., Melioli, G., Ferrini, S., and Poggi, A. (1995). Cytolytic T lymphocytes displaying natural killer (NK)-like activity: expression of NK-related functional receptors for HLA class I molecules (p58 and CD94) and inhibitory effect on the TCR-mediated target cell lysis or lymphokine production. *International immunology* 7, 697-703.
- Mingari, M.C., Vitale, C., Cantoni, C., Bellomo, R., Ponte, M., Schiavetti, F., Bertone, S., Moretta, A., and Moretta, L. (1997). Interleukin-15-induced maturation of human natural killer cells from early thymic precursors: selective expression of CD94/NKG2-A as the only HLA class I-specific inhibitory receptor. *European journal of immunology* 27, 1374-1380.
- Mitsiades, N., Mitsiades, C.S., Poulaki, V., Chauhan, D., Richardson, P.G., Hideshima, T., Munshi, N.C., Treon, S.P., and Anderson, K.C. (2002). Apoptotic signaling induced by immunomodulatory thalidomide analogs in human multiple myeloma cells: therapeutic implications. *Blood* 99, 4525-4530.
- Miyasaka, M., and Tanaka, T. (2004). Lymphocyte trafficking across high endothelial venules: dogmas and enigmas. *Nature reviews* 4, 360-370.
- Mocikat, R., Braumuller, H., Gumy, A., Egeter, O., Ziegler, H., Reusch, U., Bubeck, A., Louis, J., Mailhammer, R., Riethmuller, G., *et al.* (2003). Natural killer cells activated by MHC class I(low) targets prime dendritic cells to induce protective CD8 T cell responses. *Immunity* 19, 561-569.
- Moretta, A., Bottino, C., Vitale, M., Pende, D., Cantoni, C., Mingari, M.C., Biassoni, R., and Moretta, L. (2001). Activating receptors and coreceptors involved in human natural killer cell-mediated cytotoxicity. *Annual review of immunology* 19, 197-223.
- Moretta, L., and Moretta, A. (2004). Unravelling natural killer cell function: triggering and inhibitory human NK receptors. *The EMBO journal* 23, 255-259.
- Motyka, B., Korbitt, G., Pinkoski, M.J., Heibin, J.A., Caputo, A., Hobman, M., Barry, M., Shostak, I., Sawchuk, T., Holmes, C.F., *et al.* (2000). Mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor is a death receptor for granzyme B during cytotoxic T cell-induced apoptosis. *Cell* 103, 491-500.
- Moutouh-de Parseval, L.A., Weiss, L., DeLap, R.J., Knight, R.D., and Zeldis, J.B. (2007). Tumor lysis syndrome/tumor flare reaction in lenalidomide-treated chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol* 25, 5047.
- Muller, G.W., Chen, R., Huang, S.Y., Corral, L.G., Wong, L.M., Patterson, R.T., Chen, Y., Kaplan, G., and Stirling, D.I. (1999). Amino-substituted thalidomide analogs: potent inhibitors of TNF-alpha production. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* 9, 1625-1630.
- Munemasa, S., Sakai, A., Kuroda, Y., Okikawa, Y., Katayama, Y., Asaoku, H., Kubo, T., Shimose, S., and Kimura, A. (2008). Osteoprogenitor differentiation is not affected by immunomodulatory thalidomide analogs but is promoted by low bortezomib concentration, while both agents suppress osteoclast differentiation. *International journal of oncology* 33, 129-136.
- Nervi, B., Ramirez, P., Rettig, M.P., Uy, G.L., Holt, M.S., Ritchey, J.K., Prior, J.L., Piwnicka-Worms, D., Bridger, G., Ley, T.J., *et al.* (2009). Chemosensitization of acute myeloid

leukemia (AML) following mobilization by the CXCR4 antagonist AMD3100. *Blood* *113*, 6206-6214.

Nguyen, S., Dhedin, N., Vernant, J.P., Kuentz, M., Al Jijakli, A., Rouas-Freiss, N., Carosella, E.D., Boudifa, A., Debre, P., and Vieillard, V. (2005). NK-cell reconstitution after haploidentical hematopoietic stem-cell transplantations: immaturity of NK cells and inhibitory effect of NKG2A override GvL effect. *Blood* *105*, 4135-4142.

Nimmerjahn, F., and Ravetch, J.V. (2008). Fcγ receptors as regulators of immune responses. *Nature reviews* *8*, 34-47.

Nowbakht, P., Ionescu, M.C., Rohner, A., Kalberer, C.P., Rossy, E., Mori, L., Cosman, D., De Libero, G., and Wodnar-Filipowicz, A. (2005). Ligands for natural killer cell-activating receptors are expressed upon the maturation of normal myelomonocytic cells but at low levels in acute myeloid leukemias. *Blood* *105*, 3615-3622.

Oka, Y., Tsuboi, A., Taguchi, T., Osaki, T., Kyo, T., Nakajima, H., Elisseeva, O.A., Oji, Y., Kawakami, M., Ikegame, K., *et al.* (2004). Induction of WT1 (Wilms' tumor gene)-specific cytotoxic T lymphocytes by WT1 peptide vaccine and the resultant cancer regression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *101*, 13885-13890.

Old, L.J., and Boyse, E.A. (1964). Immunology of Experimental Tumors. *Annual review of medicine* *15*, 167-186.

Oppenheim, D.E., Roberts, S.J., Clarke, S.L., Filler, R., Lewis, J.M., Tigelaar, R.E., Girardi, M., and Hayday, A.C. (2005). Sustained localized expression of ligand for the activating NKG2D receptor impairs natural cytotoxicity in vivo and reduces tumor immunosurveillance. *Nature immunology* *6*, 928-937.

Orange, J.S. (2008). Formation and function of the lytic NK-cell immunological synapse. *Nature reviews* *8*, 713-725.

Parham, P. (2005). MHC class I molecules and KIRs in human history, health and survival. *Nature reviews* *5*, 201-214.

Parham, P., and McQueen, K.L. (2003). Alloreactive killer cells: hindrance and help for haematopoietic transplants. *Nature reviews* *3*, 108-122.

Passegue, E., Jamieson, C.H., Ailles, L.E., and Weissman, I.L. (2003). Normal and leukemic hematopoiesis: are leukemias a stem cell disorder or a reacquisition of stem cell characteristics? *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *100 Suppl 1*, 11842-11849.

Pautas, C., Merabet, F., Thomas, X., Raffoux, E., Gardin, C., Corm, S., Bourhis, J.H., Reman, O., Turlure, P., Contentin, N., *et al.* (2010). Randomized study of intensified anthracycline doses for induction and recombinant interleukin-2 for maintenance in patients with acute myeloid leukemia age 50 to 70 years: results of the ALFA-9801 study. *J Clin Oncol* *28*, 808-814.

Pavlovsky, C., Kantarjian, H., and Cortes, J.E. (2009). First-line therapy for chronic myeloid leukemia: Past, present, and future. *American journal of hematology* *84*, 287-293.

- Payvandi, F., Wu, L., Haley, M., Schafer, P.H., Zhang, L.H., Chen, R.S., Muller, G.W., and Stirling, D.I. (2004). Immunomodulatory drugs inhibit expression of cyclooxygenase-2 from TNF-alpha, IL-1beta, and LPS-stimulated human PBMC in a partially IL-10-dependent manner. *Cellular immunology* 230, 81-88.
- Pellagatti, A., Jadersten, M., Forsblom, A.M., Cattan, H., Christensson, B., Emanuelsson, E.K., Merup, M., Nilsson, L., Samuelsson, J., Sander, B., *et al.* (2007). Lenalidomide inhibits the malignant clone and up-regulates the SPARC gene mapping to the commonly deleted region in 5q- syndrome patients. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 11406-11411.
- Penarrubia, M.J., Silvestre, L.A., Conde, J., Cantalapiedra, A., and Garcia Frade, L.J. (2009). Hematologic and cytogenetic response to lenalidomide in de novo acute myeloid leukemia with chromosome 5q deletion. *Leukemia research* 33, e8-9.
- Pende, D., Bottino, C., Castriconi, R., Cantoni, C., Marcenaro, S., Rivera, P., Spaggiari, G.M., Dondero, A., Carnemolla, B., Reymond, N., *et al.* (2005a). PVR (CD155) and Nectin-2 (CD112) as ligands of the human DNAM-1 (CD226) activating receptor: involvement in tumor cell lysis. *Molecular immunology* 42, 463-469.
- Pende, D., Parolini, S., Pessino, A., Sivori, S., Augugliaro, R., Morelli, L., Marcenaro, E., Accame, L., Malaspina, A., Biassoni, R., *et al.* (1999). Identification and molecular characterization of NKp30, a novel triggering receptor involved in natural cytotoxicity mediated by human natural killer cells. *The Journal of experimental medicine* 190, 1505-1516.
- Pende, D., Spaggiari, G.M., Marcenaro, S., Martini, S., Rivera, P., Capobianco, A., Falco, M., Lanino, E., Pierri, I., Zambello, R., *et al.* (2005b). Analysis of the receptor-ligand interactions in the natural killer-mediated lysis of freshly isolated myeloid or lymphoblastic leukemias: evidence for the involvement of the Poliovirus receptor (CD155) and Nectin-2 (CD112). *Blood* 105, 2066-2073.
- Piloto, O., Levis, M., Huso, D., Li, Y., Li, H., Wang, M.N., Bassi, R., Balderes, P., Ludwig, D.L., Witte, L., *et al.* (2005). Inhibitory anti-FLT3 antibodies are capable of mediating antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity and reducing engraftment of acute myelogenous leukemia blasts in nonobese diabetic/severe combined immunodeficient mice. *Cancer research* 65, 1514-1522.
- Pinkoski, M.J., Hobman, M., Heibein, J.A., Tomaselli, K., Li, F., Seth, P., Froelich, C.J., and Bleackley, R.C. (1998). Entry and trafficking of granzyme B in target cells during granzyme B-perforin-mediated apoptosis. *Blood* 92, 1044-1054.
- Pittari, G., Fregni, G., Roguet, L., Garcia, A., Vataire, A.L., Wittnebel, S., Amsellem, S., Chouaib, S., Bourhis, J.H., and Caignard, A. (2009). Early evaluation of natural killer activity in post-transplant acute myeloid leukemia patients. *Bone marrow transplantation*.
- Poggi, A., Catellani, S., Garuti, A., Pierri, I., Gobbi, M., and Zocchi, M.R. (2009). Effective in vivo induction of NKG2D ligands in acute myeloid leukaemias by all-trans-retinoic acid or sodium valproate. *Leukemia* 23, 641-648.

- Poli, A., Michel, T., Theresine, M., Andres, E., Hentges, F., and Zimmer, J. (2009). CD56bright natural killer (NK) cells: an important NK cell subset. *Immunology* 126, 458-465.
- Poquet, Y., Constant, P., Halary, F., Peyrat, M.A., Gilleron, M., Davodeau, F., Bonneville, M., and Fournie, J.J. (1996). A novel nucleotide-containing antigen for human blood gamma delta T lymphocytes. *European journal of immunology* 26, 2344-2349.
- Porrata, L.F., Gertz, M.A., Inwards, D.J., Litzow, M.R., Lacy, M.Q., Tefferi, A., Gastineau, D.A., Dispenzieri, A., Ansell, S.M., Micallef, I.N., *et al.* (2001). Early lymphocyte recovery predicts superior survival after autologous hematopoietic stem cell transplantation in multiple myeloma or non-Hodgkin lymphoma. *Blood* 98, 579-585.
- Porrata, L.F., Inwards, D.J., Ansell, S.M., Micallef, I.N., Johnston, P.B., Gastineau, D.A., Litzow, M.R., Winters, J.L., and Markovic, S.N. (2008). Early lymphocyte recovery predicts superior survival after autologous stem cell transplantation in non-Hodgkin lymphoma: a prospective study. *Biol Blood Marrow Transplant* 14, 807-816.
- Porrata, L.F., Inwards, D.J., Micallef, I.N., Ansell, S.M., Geyer, S.M., and Markovic, S.N. (2002a). Early lymphocyte recovery post-autologous haematopoietic stem cell transplantation is associated with better survival in Hodgkin's disease. *British journal of haematology* 117, 629-633.
- Porrata, L.F., Litzow, M.R., Tefferi, A., Letendre, L., Kumar, S., Geyer, S.M., and Markovic, S.N. (2002b). Early lymphocyte recovery is a predictive factor for prolonged survival after autologous hematopoietic stem cell transplantation for acute myelogenous leukemia. *Leukemia* 16, 1311-1318.
- Poupot, M., and Fournie, J.J. (2004). Non-peptide antigens activating human Vgamma9/Vdelta2 T lymphocytes. *Immunology letters* 95, 129-138.
- Powles, R., Singhal, S., Treleaven, J., Kulkarni, S., Horton, C., and Mehta, J. (1998). Identification of patients who may benefit from prophylactic immunotherapy after bone marrow transplantation for acute myeloid leukemia on the basis of lymphocyte recovery early after transplantation. *Blood* 91, 3481-3486.
- Quach, H., Ritchie, D., Stewart, A.K., Neeson, P., Harrison, S., Smyth, M.J., and Prince, H.M. (2010). Mechanism of action of immunomodulatory drugs (IMiDS) in multiple myeloma. *Leukemia* 24, 22-32.
- Rajagopalan, S., Bryceson, Y.T., Kuppusamy, S.P., Geraghty, D.E., van der Meer, A., Joosten, I., and Long, E.O. (2006). Activation of NK cells by an endocytosed receptor for soluble HLA-G. *PLoS Biol* 4, e9.
- Rajkumar, S.V., Jacobus, S., Callander, N.S., Fonseca, R., Vesole, D.H., Williams, M.E., Abonour, R., Siegel, D.S., Katz, M., and Greipp, P.R. (2010). Lenalidomide plus high-dose dexamethasone versus lenalidomide plus low-dose dexamethasone as initial therapy for newly diagnosed multiple myeloma: an open-label randomised controlled trial. *The lancet oncology* 11, 29-37.
- Ramsay, A.G., Clear, A.J., Kelly, G., Fatah, R., Matthews, J., Macdougall, F., Lister, T.A., Lee, A.M., Calaminici, M., and Gribben, J.G. (2009). Follicular lymphoma cells induce T-cell

immunological synapse dysfunction that can be repaired with lenalidomide: implications for the tumor microenvironment and immunotherapy. *Blood*.

Ramsay, A.G., Johnson, A.J., Lee, A.M., Gorgun, G., Le Dieu, R., Blum, W., Byrd, J.C., and Gribben, J.G. (2008). Chronic lymphocytic leukemia T cells show impaired immunological synapse formation that can be reversed with an immunomodulating drug. *The Journal of clinical investigation* *118*, 2427-2437.

Raulet, D.H. (2003). Roles of the NKG2D immunoreceptor and its ligands. *Nature reviews* *3*, 781-790.

Raulet, D.H., and Guerra, N. (2009). Oncogenic stress sensed by the immune system: role of natural killer cell receptors. *Nature reviews* *9*, 568-580.

Raulet, D.H., and Vance, R.E. (2006). Self-tolerance of natural killer cells. *Nature reviews* *6*, 520-531.

Ravandi, F., and O'Brien, S. (2006). Alemtuzumab in CLL and other lymphoid neoplasms. *Cancer investigation* *24*, 718-725.

Raza, A., Reeves, J.A., Feldman, E.J., Dewald, G.W., Bennett, J.M., Deeg, H.J., Dreisbach, L., Schiffer, C.A., Stone, R.M., Greenberg, P.L., *et al.* (2008). Phase 2 study of lenalidomide in transfusion-dependent, low-risk, and intermediate-1 risk myelodysplastic syndromes with karyotypes other than deletion 5q. *Blood* *111*, 86-93.

Renneville, A., Roumier, C., Biggio, V., Nibourel, O., Boissel, N., Fenaux, P., and Preudhomme, C. (2008). Cooperating gene mutations in acute myeloid leukemia: a review of the literature. *Leukemia* *22*, 915-931.

Rey, J., Veuillen, C., Vey, N., Bouabdallah, R., and Olive, D. (2009). Natural killer and gammadelta T cells in haematological malignancies: enhancing the immune effectors. *Trends in molecular medicine*.

Rezvani, K., Grube, M., Brenchley, J.M., Sconocchia, G., Fujiwara, H., Price, D.A., Gostick, E., Yamada, K., Melenhorst, J., Childs, R., *et al.* (2003). Functional leukemia-associated antigen-specific memory CD8⁺ T cells exist in healthy individuals and in patients with chronic myelogenous leukemia before and after stem cell transplantation. *Blood* *102*, 2892-2900.

Rezvani, K., Yong, A.S., Mielke, S., Savani, B.N., Musse, L., Superata, J., Jafarpour, B., Boss, C., and Barrett, A.J. (2008). Leukemia-associated antigen-specific T-cell responses following combined PR1 and WT1 peptide vaccination in patients with myeloid malignancies. *Blood* *111*, 236-242.

Rezvani, K., Yong, A.S., Tawab, A., Jafarpour, B., Eniafe, R., Mielke, S., Savani, B.N., Keyvanfar, K., Li, Y., Kurlander, R., *et al.* (2009). Ex vivo characterization of polyclonal memory CD8⁺ T-cell responses to PRAME-specific peptides in patients with acute lymphoblastic leukemia and acute and chronic myeloid leukemia. *Blood* *113*, 2245-2255.

Richardson, P., Jagannath, S., Hussein, M., Berenson, J., Singhal, S., Irwin, D., Williams, S.F., Bensinger, W., Badros, A.Z., Vescio, R., *et al.* (2009). Safety and efficacy of single-

agent lenalidomide in patients with relapsed and refractory multiple myeloma. *Blood* *114*, 772-778.

Richardson, P.G., Schlossman, R.L., Weller, E., Hideshima, T., Mitsiades, C., Davies, F., LeBlanc, R., Catley, L.P., Doss, D., Kelly, K., *et al.* (2002). Immunomodulatory drug CC-5013 overcomes drug resistance and is well tolerated in patients with relapsed multiple myeloma. *Blood* *100*, 3063-3067.

Rincon-Orozco, B., Kunzmann, V., Wrobel, P., Kabelitz, D., Steinle, A., and Herrmann, T. (2005). Activation of V gamma 9V delta 2 T cells by NKG2D. *J Immunol* *175*, 2144-2151.

Roberts, A.I., Lee, L., Schwarz, E., Groh, V., Spies, T., Ebert, E.C., and Jabri, B. (2001). NKG2D receptors induced by IL-15 costimulate CD28-negative effector CTL in the tissue microenvironment. *J Immunol* *167*, 5527-5530.

Rohner, A., Langenkamp, U., Siegler, U., Kalberer, C.P., and Wodnar-Filipowicz, A. (2007). Differentiation-promoting drugs up-regulate NKG2D ligand expression and enhance the susceptibility of acute myeloid leukemia cells to natural killer cell-mediated lysis. *Leukemia research* *31*, 1393-1402.

Romagnani, C., Juelke, K., Falco, M., Morandi, B., D'Agostino, A., Costa, R., Ratto, G., Forte, G., Carrega, P., Lui, G., *et al.* (2007). CD56brightCD16- killer Ig-like receptor- NK cells display longer telomeres and acquire features of CD56dim NK cells upon activation. *J Immunol* *178*, 4947-4955.

Romagne, F., Andre, P., Spee, P., Zahn, S., Anfossi, N., Gauthier, L., Capanni, M., Ruggeri, L., Benson, D.M., Jr., Blaser, B.W., *et al.* (2009). Preclinical characterization of 1-7F9, a novel human anti-KIR receptor therapeutic antibody that augments natural killer-mediated killing of tumor cells. *Blood* *114*, 2667-2677.

Romero, A.I., Thoren, F.B., Aurelius, J., Askarieh, G., Brune, M., and Hellstrand, K. (2009). Post-consolidation immunotherapy with histamine dihydrochloride and interleukin-2 in AML. *Scandinavian journal of immunology* *70*, 194-205.

Roth, C., Carlyle, J.R., Takizawa, H., and Raulet, D.H. (2000). Clonal acquisition of inhibitory Ly49 receptors on developing NK cells is successively restricted and regulated by stromal class I MHC. *Immunity* *13*, 143-153.

Rudolph, M.G., Stanfield, R.L., and Wilson, I.A. (2006). How TCRs bind MHCs, peptides, and coreceptors. *Annual review of immunology* *24*, 419-466.

Ruggeri, L., Capanni, M., Casucci, M., Volpi, I., Tosti, A., Perruccio, K., Urbani, E., Negrin, R.S., Martelli, M.F., and Velardi, A. (1999). Role of natural killer cell alloreactivity in HLA-mismatched hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* *94*, 333-339.

Ruggeri, L., Capanni, M., Urbani, E., Perruccio, K., Shlomchik, W.D., Tosti, A., Posati, S., Rogaia, D., Frassoni, F., Aversa, F., *et al.* (2002). Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants. *Science (New York, NY)* *295*, 2097-2100.

Ruggeri, L., Mancusi, A., Capanni, M., Urbani, E., Carotti, A., Aloisi, T., Stern, M., Pende, D., Perruccio, K., Burchielli, E., *et al.* (2007). Donor natural killer cell allorecognition of

missing self in haploidentical hematopoietic transplantation for acute myeloid leukemia: challenging its predictive value. *Blood* *110*, 433-440.

Saito, Y., Uchida, N., Tanaka, S., Suzuki, N., Tomizawa-Murasawa, M., Sone, A., Najima, Y., Takagi, S., Aoki, Y., Wake, A., *et al.* (2010). Induction of cell cycle entry eliminates human leukemia stem cells in a mouse model of AML. *Nature biotechnology* *28*, 275-280.

Salih, H.R., Antropius, H., Gieseke, F., Lutz, S.Z., Kanz, L., Rammensee, H.G., and Steinle, A. (2003). Functional expression and release of ligands for the activating immunoreceptor NKG2D in leukemia. *Blood* *102*, 1389-1396.

Salih, H.R., Rammensee, H.G., and Steinle, A. (2002). Cutting edge: down-regulation of MICA on human tumors by proteolytic shedding. *J Immunol* *169*, 4098-4102.

Sampaio, E.P., Sarno, E.N., Galilly, R., Cohn, Z.A., and Kaplan, G. (1991). Thalidomide selectively inhibits tumor necrosis factor alpha production by stimulated human monocytes. *The Journal of experimental medicine* *173*, 699-703.

Sanchorawala, V., Wright, D.G., Rosenzweig, M., Finn, K.T., Fennessey, S., Zeldis, J.B., Skinner, M., and Seldin, D.C. (2007). Lenalidomide and dexamethasone in the treatment of AL amyloidosis: results of a phase 2 trial. *Blood* *109*, 492-496.

Savani, B.N., Mielke, S., Adams, S., Uribe, M., Rezvani, K., Yong, A.S., Zeilah, J., Kurlander, R., Srinivasan, R., Childs, R., *et al.* (2007a). Rapid natural killer cell recovery determines outcome after T-cell-depleted HLA-identical stem cell transplantation in patients with myeloid leukemias but not with acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* *21*, 2145-2152.

Savani, B.N., Mielke, S., Rezvani, K., Montero, A., Yong, A.S., Wish, L., Superata, J., Kurlander, R., Singh, A., Childs, R., *et al.* (2007b). Absolute lymphocyte count on day 30 is a surrogate for robust hematopoietic recovery and strongly predicts outcome after T cell-depleted allogeneic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* *13*, 1216-1223.

Savani, B.N., Rezvani, K., Mielke, S., Montero, A., Kurlander, R., Carter, C.S., Leitman, S., Read, E.J., Childs, R., and Barrett, A.J. (2006). Factors associated with early molecular remission after T cell-depleted allogeneic stem cell transplantation for chronic myelogenous leukemia. *Blood* *107*, 1688-1695.

Savoldo, B., Goss, J.A., Hammer, M.M., Zhang, L., Lopez, T., Gee, A.P., Lin, Y.F., Quiros-Tejeira, R.E., Reinke, P., Schubert, S., *et al.* (2006). Treatment of solid organ transplant recipients with autologous Epstein Barr virus-specific cytotoxic T lymphocytes (CTLs). *Blood* *108*, 2942-2949.

Sayers, T.J., Brooks, A.D., Ward, J.M., Hoshino, T., Bere, W.E., Wiegand, G.W., Kelly, J.M., and Smyth, M.J. (2001). The restricted expression of granzyme M in human lymphocytes. *J Immunol* *166*, 765-771.

Scheibenbogen, C., Letsch, A., Thiel, E., Schmitt, A., Mailaender, V., Baerwolf, S., Nagorsen, D., and Keilholz, U. (2002). CD8 T-cell responses to Wilms tumor gene product WT1 and proteinase 3 in patients with acute myeloid leukemia. *Blood* *100*, 2132-2137.

Schmitt, M., Schmitt, A., Rojewski, M.T., Chen, J., Giannopoulos, K., Fei, F., Yu, Y., Gotz, M., Heyduk, M., Ritter, G., *et al.* (2008). RHAMM-R3 peptide vaccination in patients with

acute myeloid leukemia, myelodysplastic syndrome, and multiple myeloma elicits immunologic and clinical responses. *Blood* *111*, 1357-1365.

Schulze, A., Schirutschke, H., Oelschlagel, U., Schmitz, M., Fussel, M., Wassmuth, R., Ehniger, G., Bornhauser, M., and Platzbecker, U. (2008). Altered phenotype of natural killer cell subsets after haploidentical stem cell transplantation. *Experimental hematology* *36*, 378-389.

Schwartz, R.H. (2003). T cell anergy. *Annual review of immunology* *21*, 305-334.

Sekeres, M.A., Maciejewski, J.P., Giagounidis, A.A., Wride, K., Knight, R., Raza, A., and List, A.F. (2008). Relationship of treatment-related cytopenias and response to lenalidomide in patients with lower-risk myelodysplastic syndromes. *J Clin Oncol* *26*, 5943-5949.

Shankaran, V., Ikeda, H., Bruce, A.T., White, J.M., Swanson, P.E., Old, L.J., and Schreiber, R.D. (2001). IFN γ and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature* *410*, 1107-1111.

Sharpe, A.H., and Freeman, G.J. (2002). The B7-CD28 superfamily. *Nature reviews* *2*, 116-126.

Shilling, H.G., McQueen, K.L., Cheng, N.W., Shizuru, J.A., Negrin, R.S., and Parham, P. (2003). Reconstitution of NK cell receptor repertoire following HLA-matched hematopoietic cell transplantation. *Blood* *101*, 3730-3740.

Shilling, H.G., Young, N., Guethlein, L.A., Cheng, N.W., Gardiner, C.M., Tyan, D., and Parham, P. (2002). Genetic control of human NK cell repertoire. *J Immunol* *169*, 239-247.

Sievers, E.L., Larson, R.A., Stadtmauer, E.A., Estey, E., Lowenberg, B., Dombret, H., Karanes, C., Theobald, M., Bennett, J.M., Sherman, M.L., *et al.* (2001). Efficacy and safety of gemtuzumab ozogamicin in patients with CD33-positive acute myeloid leukemia in first relapse. *J Clin Oncol* *19*, 3244-3254.

Sivori, S., Pende, D., Bottino, C., Marcenaro, E., Pessino, A., Biassoni, R., Moretta, L., and Moretta, A. (1999). NKp46 is the major triggering receptor involved in the natural cytotoxicity of fresh or cultured human NK cells. Correlation between surface density of NKp46 and natural cytotoxicity against autologous, allogeneic or xenogeneic target cells. *European journal of immunology* *29*, 1656-1666.

Sivori, S., Vitale, M., Morelli, L., Sanseverino, L., Augugliaro, R., Bottino, C., Moretta, L., and Moretta, A. (1997). p46, a novel natural killer cell-specific surface molecule that mediates cell activation. *The Journal of experimental medicine* *186*, 1129-1136.

Smyth, M.J., Cretney, E., Kelly, J.M., Westwood, J.A., Street, S.E., Yagita, H., Takeda, K., van Dommelen, S.L., Degli-Esposti, M.A., and Hayakawa, Y. (2005). Activation of NK cell cytotoxicity. *Molecular immunology* *42*, 501-510.

Smyth, M.J., Crowe, N.Y., and Godfrey, D.I. (2001). NK cells and NKT cells collaborate in host protection from methylcholanthrene-induced fibrosarcoma. *International immunology* *13*, 459-463.

- Smyth, M.J., Thia, K.Y., Street, S.E., Cretney, E., Trapani, J.A., Taniguchi, M., Kawano, T., Pelikan, S.B., Crowe, N.Y., and Godfrey, D.I. (2000a). Differential tumor surveillance by natural killer (NK) and NKT cells. *The Journal of experimental medicine* *191*, 661-668.
- Smyth, M.J., Thia, K.Y., Street, S.E., MacGregor, D., Godfrey, D.I., and Trapani, J.A. (2000b). Perforin-mediated cytotoxicity is critical for surveillance of spontaneous lymphoma. *The Journal of experimental medicine* *192*, 755-760.
- Soiffer, R.J. (2008). Donor lymphocyte infusions for acute myeloid leukaemia. *Best practice & research* *21*, 455-466.
- Stasi, R., Evangelista, M.L., Buccisano, F., Venditti, A., and Amadori, S. (2008). Gemtuzumab ozogamicin in the treatment of acute myeloid leukemia. *Cancer treatment reviews* *34*, 49-60.
- Stenger, S., Hanson, D.A., Teitelbaum, R., Dewan, P., Niazi, K.R., Froelich, C.J., Ganz, T., Thoma-Uszynski, S., Melian, A., Bogdan, C., *et al.* (1998). An antimicrobial activity of cytolytic T cells mediated by granulysin. *Science (New York, NY)* *282*, 121-125.
- Stewart, C.A., Laugier-Anfossi, F., Vely, F., Saulquin, X., Riedmuller, J., Tisserant, A., Gauthier, L., Romagne, F., Ferracci, G., Arosa, F.A., *et al.* (2005). Recognition of peptide-MHC class I complexes by activating killer immunoglobulin-like receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *102*, 13224-13229.
- Storek, J., Geddes, M., Khan, F., Huard, B., Helg, C., Chalandon, Y., Passweg, J., and Roosnek, E. (2008). Reconstitution of the immune system after hematopoietic stem cell transplantation in humans. *Seminars in immunopathology* *30*, 425-437.
- Stutman, O. (1974). Tumor development after 3-methylcholanthrene in immunologically deficient athymic-nude mice. *Science (New York, NY)* *183*, 534-536.
- Takeda, K., Smyth, M.J., Cretney, E., Hayakawa, Y., Kayagaki, N., Yagita, H., and Okumura, K. (2002). Critical role for tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in immune surveillance against tumor development. *The Journal of experimental medicine* *195*, 161-169.
- Tallman, M.S., Gilliland, D.G., and Rowe, J.M. (2005). Drug therapy for acute myeloid leukemia. *Blood* *106*, 1154-1163.
- Tanaka, Y., Morita, C.T., Tanaka, Y., Nieves, E., Brenner, M.B., and Bloom, B.R. (1995). Natural and synthetic non-peptide antigens recognized by human gamma delta T cells. *Nature* *375*, 155-158.
- Taussig, D.C., Miraki-Moud, F., Anjos-Afonso, F., Pearce, D.J., Allen, K., Ridler, C., Lillington, D., Oakervee, H., Cavenagh, J., Agrawal, S.G., *et al.* (2008). Anti-CD38 antibody-mediated clearance of human repopulating cells masks the heterogeneity of leukemia-initiating cells. *Blood* *112*, 568-575.
- Taussig, D.C., Pearce, D.J., Simpson, C., Rohatiner, A.Z., Lister, T.A., Kelly, G., Luongo, J.L., Danet-Desnoyers, G.A., and Bonnet, D. (2005). Hematopoietic stem cells express multiple myeloid markers: implications for the origin and targeted therapy of acute myeloid leukemia. *Blood* *106*, 4086-4092.

- Terpos, E., Dimopoulos, M.A., and Sezer, O. (2007). The effect of novel anti-myeloma agents on bone metabolism of patients with multiple myeloma. *Leukemia* 21, 1875-1884.
- Thedre, A., Sabourin, C., Gertner, J., Devilder, M.C., Allain-Maillet, S., Fournie, J.J., Scotet, E., and Bonneville, M. (2007). Self/non-self discrimination by human gamma delta T cells: simple solutions for a complex issue? *Immunological reviews* 215, 123-135.
- Thomas, L. (1959). Discussion. In *Cellular and Humoral Aspects of the hypersensitive states*, HS Lawrence, ed (New York: Hoeber-Harper), 529-532.
- Thomas, L. (1982). On immunosurveillance in human cancer. *The Yale journal of biology and medicine* 55, 329-333.
- Thompson, K., and Rogers, M.J. (2004). Statins prevent bisphosphonate-induced gamma,delta-T-cell proliferation and activation in vitro. *J Bone Miner Res* 19, 278-288.
- Tokuyama, H., Hagi, T., Mattarollo, S.R., Morley, J., Wang, Q., Fai-So, H., Moriyasu, F., Nieda, M., and Nicol, A.J. (2008). V gamma 9 V delta 2 T cell cytotoxicity against tumor cells is enhanced by monoclonal antibody drugs--rituximab and trastuzumab. *International journal of cancer* 122, 2526-2534.
- Treon, S.P., Soumerai, J.D., Branagan, A.R., Hunter, Z.R., Patterson, C.J., Ioakimidis, L., Chu, L., Musto, P., Baron, A.D., Nunnink, J.C., *et al.* (2009). Lenalidomide and rituximab in Waldenstrom's macroglobulinemia. *Clin Cancer Res* 15, 355-360.
- Trichet, V., Benezech, C., Dousset, C., Gesnel, M.C., Bonneville, M., and Breathnach, R. (2006). Complex interplay of activating and inhibitory signals received by Vgamma9Vdelta2 T cells revealed by target cell beta2-microglobulin knockdown. *J Immunol* 177, 6129-6136.
- Triplett, B.M., Horwitz, E.M., Iyengar, R., Turner, V., Holladay, M.S., Gan, K., Behm, F.G., and Leung, W. (2009). Effects of activating NK cell receptor expression and NK cell reconstitution on the outcomes of unrelated donor hematopoietic cell transplantation for hematologic malignancies. *Leukemia* 23, 1278-1287.
- Vago, L., Perna, S.K., Zanussi, M., Mazzi, B., Barlassina, C., Stanghellini, M.T., Perrelli, N.F., Cosentino, C., Torri, F., Angius, A., *et al.* (2009). Loss of mismatched HLA in leukemia after stem-cell transplantation. *The New England journal of medicine* 361, 478-488.
- Vardiman, J.W., Thiele, J., Arber, D.A., Brunning, R.D., Borowitz, M.J., Porwit, A., Harris, N.L., Le Beau, M.M., Hellstrom-Lindberg, E., Tefferi, A., *et al.* (2009). The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood* 114, 937-951.
- Vely, F., Peyrat, M., Couedel, C., Morcet, J., Halary, F., Davodeau, F., Romagne, F., Scotet, E., Saulquin, X., Houssaint, E., *et al.* (2001). Regulation of inhibitory and activating killer-cell Ig-like receptor expression occurs in T cells after termination of TCR rearrangements. *J Immunol* 166, 2487-2494.
- Verhelle, D., Corral, L.G., Wong, K., Mueller, J.H., Moutouh-de Parseval, L., Jensen-Pergakes, K., Schafer, P.H., Chen, R., Glezer, E., Ferguson, G.D., *et al.* (2007). Lenalidomide and CC-4047 inhibit the proliferation of malignant B cells while expanding normal CD34+ progenitor cells. *Cancer research* 67, 746-755.

- Verheyden, S., and Demanet, C. (2008). NK cell receptors and their ligands in leukemia. *Leukemia* 22, 249-257.
- Viey, E., Fromont, G., Escudier, B., Morel, Y., Da Rocha, S., Chouaib, S., and Caignard, A. (2005). Phosphostim-activated gamma delta T cells kill autologous metastatic renal cell carcinoma. *J Immunol* 174, 1338-1347.
- Vitale, M., Bottino, C., Sivori, S., Sanseverino, L., Castriconi, R., Marcenaro, E., Augugliaro, R., Moretta, L., and Moretta, A. (1998). NKp44, a novel triggering surface molecule specifically expressed by activated natural killer cells, is involved in non-major histocompatibility complex-restricted tumor cell lysis. *The Journal of experimental medicine* 187, 2065-2072.
- Vitale, M., Della Chiesa, M., Carlomagno, S., Pende, D., Arico, M., Moretta, L., and Moretta, A. (2005). NK-dependent DC maturation is mediated by TNFalpha and IFNgamma released upon engagement of the NKp30 triggering receptor. *Blood* 106, 566-571.
- Vitale, M., Falco, M., Castriconi, R., Parolini, S., Zambello, R., Semenzato, G., Biassoni, R., Bottino, C., Moretta, L., and Moretta, A. (2001). Identification of NKp80, a novel triggering molecule expressed by human NK cells. *European journal of immunology* 31, 233-242.
- Vitolo, U., Ferreri, A.J., and Montoto, S. (2008). Follicular lymphomas. *Critical reviews in oncology/hematology* 66, 248-261.
- Voskoboinik, I., Smyth, M.J., and Trapani, J.A. (2006). Perforin-mediated target-cell death and immune homeostasis. *Nature reviews* 6, 940-952.
- Waldhauer, I., Goehlsdorf, D., Gieseke, F., Weinschenk, T., Wittenbrink, M., Ludwig, A., Stevanovic, S., Rammensee, H.G., and Steinle, A. (2008). Tumor-associated MICA is shed by ADAM proteases. *Cancer research* 68, 6368-6376.
- Walzer, T., Dalod, M., Robbins, S.H., Zitvogel, L., and Vivier, E. (2005). Natural-killer cells and dendritic cells: "l'union fait la force". *Blood* 106, 2252-2258.
- Walzer, T., Jaeger, S., Chaix, J., and Vivier, E. (2007). Natural killer cells: from CD3(-)NKp46(+) to post-genomics meta-analyses. *Current opinion in immunology* 19, 365-372.
- Wang, D., Wang, H., Brown, J., Daikoku, T., Ning, W., Shi, Q., Richmond, A., Strieter, R., Dey, S.K., and DuBois, R.N. (2006). CXCL1 induced by prostaglandin E2 promotes angiogenesis in colorectal cancer. *The Journal of experimental medicine* 203, 941-951.
- Weber, D.M., Chen, C., Niesvizky, R., Wang, M., Belch, A., Stadtmauer, E.A., Siegel, D., Borrello, I., Rajkumar, S.V., Chanan-Khan, A.A., *et al.* (2007). Lenalidomide plus dexamethasone for relapsed multiple myeloma in North America. *The New England journal of medicine* 357, 2133-2142.
- Wei, S., Chen, X., Rocha, K., Epling-Burnette, P.K., Djeu, J.Y., Liu, Q., Byrd, J., Sokol, L., Lawrence, N., Pireddu, R., *et al.* (2009). A critical role for phosphatase haploinsufficiency in the selective suppression of deletion 5q MDS by lenalidomide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, 12974-12979.

- Welte, S., Kuttruff, S., Waldhauer, I., and Steinle, A. (2006). Mutual activation of natural killer cells and monocytes mediated by NKp80-AICL interaction. *Nature immunology* *7*, 1334-1342.
- Wiernik, P.H. (2008). Treatment of Hematologic Neoplasms with New Immunomodulatory Drugs (IMiDs). *Curr Treat Options Oncol*.
- Wilhelm, M., Kunzmann, V., Eckstein, S., Reimer, P., Weissinger, F., Ruediger, T., and Tony, H.P. (2003). Gammadelta T cells for immune therapy of patients with lymphoid malignancies. *Blood* *102*, 200-206.
- Willemze, R., Rodrigues, C.A., Labopin, M., Sanz, G., Michel, G., Socie, G., Rio, B., Sirvent, A., Renaud, M., Madero, L., *et al.* (2009). KIR-ligand incompatibility in the graft-versus-host direction improves outcomes after umbilical cord blood transplantation for acute leukemia. *Leukemia* *23*, 492-500.
- Williams, M.A., and Bevan, M.J. (2007). Effector and memory CTL differentiation. *Annual review of immunology* *25*, 171-192.
- Wilson, N.S., Dixit, V., and Ashkenazi, A. (2009). Death receptor signal transducers: nodes of coordination in immune signaling networks. *Nature immunology* *10*, 348-355.
- Witzig, T.E., Wiernik, P.H., Moore, T., Reeder, C., Cole, C., Justice, G., Kaplan, H., Voralia, M., Pietronigro, D., Takeshita, K., *et al.* (2009). Lenalidomide oral monotherapy produces durable responses in relapsed or refractory indolent non-Hodgkin's Lymphoma. *J Clin Oncol* *27*, 5404-5409.
- Wu, L., Adams, M., Carter, T., Chen, R., Muller, G., Stirling, D., Schafer, P., and Bartlett, J.B. (2008). lenalidomide enhances natural killer cell and monocyte-mediated antibody-dependent cellular cytotoxicity of rituximab-treated CD20+ tumor cells. *Clin Cancer Res* *14*, 4650-4657.
- Yin, T., and Li, L. (2006). The stem cell niches in bone. *The Journal of clinical investigation* *116*, 1195-1201.
- Yokoyama, W.M., and Kim, S. (2006). Licensing of natural killer cells by self-major histocompatibility complex class I. *Immunological reviews* *214*, 143-154.
- Yokoyama, W.M., and Plougastel, B.F. (2003). Immune functions encoded by the natural killer gene complex. *Nature reviews* *3*, 304-316.
- Zangari M, T.G., Seldis J, and al., (2001). Results of phase I study of CC-5013 for the treatment of multiple myeloma (MM) in patients who relapse after high-dose chemotherapy (HDCT). *Blood* *98*, 775a (abstract).
- Zeng, Z., Shi, Y.X., Samudio, I.J., Wang, R.Y., Ling, X., Frolova, O., Levis, M., Rubin, J.B., Negrin, R.R., Estey, E.H., *et al.* (2008). Targeting the leukemia microenvironment by CXCR4 inhibition overcomes resistance to kinase inhibitors and chemotherapy in AML. *Blood*.

TITLE:

Immunomodulatory role of Lenalidomide on human Natural Killer cells.

Study of cytotoxic lymphoid effectors on acute myeloid leukemia patients in 1st complete remission.

ABSTRACT:

Most Acute Myeloide Leukemia (AML) patients achieve complete remission after induction chemotherapy (1st CR). Nevertheless, persistence of resistant tumor cells to treatments and immune response is associated with high risk of relapse. Our works highlight a pre-eminence and persistence of immature CD56^{bright} NK cells in patients at 1st CR. Thus, every agent or protocol dedicated to improve reconstitution or to potentiate cytotoxic functions of NK cells would be beneficial.

Thus, we have chosen to evaluate the role of Lenalidomide upon NK cells of healthy donors. Our works show, for the first time, a direct but complexe effect on NK cells. Indeed, Lenalidomide upregulates the CD56 expression but decreases IFN- γ production, two opposite effects with respect to the classical description of CD56^{bright} NK cell population. The upregulation of CD56 do not augur a beneficial effect on NK cells of AML patients in 1st CR. Moreover, the modulation of expression of various lytic receptors has no impact on NK cell cytotoxic functions. However, the decrease of IFN- γ expression could be beneficial as it upregulates MHC-I expression on AML leukemic cells and inhibit NK cell cytotoxic activity.

The wide range of Lenalidomide actions on tumoral microenvironment is a strong support to pursue the study of its effects on AML.

AUTEUR : Nicolas DAUGUET

TITRE: Rôle immunomodulateur du Lenalidomide sur les cellules Natural Killer humaines. Etude des effecteurs lymphoïdes cytotoxiques chez les patients atteints de leucémies aiguës myéloïdes en 1^{ère} rémission complète.

DIRECTEURS DE THESE : Pr Rémy Poupot, **CO-DIRECTEUR** : Dr Mary Poupot

LIEU ET DATE DE SOUTENANCE : Toulouse, hôpital Purpan, amphithéâtre Ducuing.
Le 20 septembre 2010

RESUME :

La plupart des patients atteints de leucémies aiguës myéloïdes (LAM) sont en rémission complète après la chimiothérapie d'induction (1^{ère} RC). Or, la persistance de cellules cancéreuses résistantes aux traitements et à la réponse immunitaire engendre de nombreuses rechutes. Nos travaux montrent la prééminence et la persistance de cellules NK CD56^{bright} immatures chez ces patients en 1^{ère} RC. Ainsi, tout agent ou tout protocole favorisant la reconstitution ou potentialisant les fonctions cytotoxiques des cellules NK pourrait être bénéfique.

Nous avons ainsi choisi d'évaluer le rôle du Lenalidomide sur les cellules NK de donneurs sains. Nos travaux montrent, pour la 1^{ère} fois, un effet direct mais cependant complexe sur les cellules NK. En effet, le Lenalidomide augmente l'expression du CD56 mais diminue la production d'IFN- γ , deux effets qui s'opposent au regard de la description classique des cellules NK CD56^{bright}. L'augmentation du CD56 ne présagerait pas d'un effet bénéfique sur les cellules NK des patients LAM en 1^{ère} RC. De plus, la modulation de l'expression de divers récepteurs de lyse n'a pas d'impact sur les fonctions cytotoxiques de ces effecteurs. Cependant, la diminution de l'expression de l'IFN- γ pourrait être bénéfique car ce dernier favorise l'expression des molécules du CMH-I par les cellules leucémiques de LAM et inhibant ainsi l'activité cytotoxique des cellules NK.

Les nombreuses actions du Lenalidomide sur le microenvironnement tumoral encouragent à poursuivre l'étude de ces effets dans les LAM.

MOTS-CLES : cellules Natural Killer, leucémies aiguës myéloïdes, immunomodulation, Lenalidomide, microenvironnement.

DISCIPLINE ADMINISTRATIVE : Immunologie

LABORATOIRE DE RATTACHEMENT : INSERM U563, CHU Purpan, BP 3028, 31024 TOULOUSE CEDEX 3, équipe Jean-Jacques Fournié, « Immunité innée, hémopathies malignes & thérapies anti-cancéreuses »