

Université de Montréal

**La différenciation in vitro des cellules dendritiques  
plasmacytoïdes à partir de cellules CD34+ de sang de  
cordon, un outil thérapeutique pour augmenter l'activité  
antitumorale des cellules NK**

par

Yildian Diaz Rodriguez

Département de Microbiologie, Infectiologie et Microbiologie  
Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté Médecine  
en vue de l'obtention du grade de Magister Scientiæ (M.Sc)  
option Microbiologie et Immunologie

Août 2016

© Yildian Diaz Rodriguez, 2016

## Résumé

L'immunothérapie basée dans l'utilisation des cellules NK pour le traitement de différents types de cancers humains est une stratégie très prometteuse. Les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC) activées permettent de stimuler les cellules NK pour augmenter leurs propriétés anti-tumorales. Les cellules NK activées par les pDC sont capables de développer in vitro et in vivo une forte réponse cytotoxique contre différentes lignées de leucémie lymphoblastiques pre-B. En revanche, les faibles quantités de pDC obtenues à partir du sang périphérique limitent leur l'utilisation en clinique. L'expansion et la différenciation des pDC in vitro à partir des progéniteurs hématopoïétiques CD34, permet d'obtenir des pDC humaines en grande quantité. Récemment il a été démontré que l'utilisation des antagonistes du récepteur de l'aryl hydroxycarbonyl (AhR) augmente le nombre des pDC générées in vitro. Cependant, la capacité à activer les cellules NK des pDC différenciées in vitro en présence d'antagonistes de l'AhR n'a pas encore été étudiée. Dans cette étude, nous montrons que les pDC obtenues in vitro ont une expression de molécules d'activation et une sécrétion de IFN $\gamma$  plus faibles que celles des pDC du sang périphérique, mais que leur capacité à stimuler des cellules NK est similaire. Ces résultats ouvrent donc la voie à l'utilisation des pDC générées in vitro comme agent immuno-therapeutique visant à stimuler les fonctions anti-tumorales des cellules NK.

Mots-clé : Immunothérapie, cellules NK, cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC); expansion et différenciation in vitro des précurseurs hématopoïétiques, antagonistes du AhR

## **Abstract**

NK cells immunotherapy is a promising treatment for different human cancers. An effective approach to stimulate NK cells has been the use of activated plasmacytoid dendritic cells (pDC). NK cell activated by pDC develops a strong cytotoxic response against pre-B acute lymphoblastic leukemia (ALL) cell lines *in vitro* and *in vivo*. However, the use of pDC in the clinic has limitations because of its low frequency. One suitable strategy is the differentiation of CD34+ progenitors using different cytokines and chemokines. Recently, it has been demonstrated that antagonists of aryl hydroxyl receptor (AhR) increase the number of pDC obtained after culture of CD34+ cells. Nevertheless, the ability of these *in vitro* differentiated pDC to induce NK cells activation has not been well documented. In this study, it was showed that activated *in vitro* differentiated pDC present different characteristics than adult pDC, like a lower expression of activation markers and IFN $\alpha$  secretion, but their capacity to stimulate NK cells was similar to that observed in adult pDC. In addition, NK cells activated by *in vitro* differentiated pDC showed a strong cytotoxicity against the pre-B ALL cell line REH suggesting its effectiveness to treat ALL patients.

**Keywords** : Immunotherapy, NK cells, plasmacytoid dendritic cells; *in vitro* expansion and differentiation of hematopoietic cells; AHR antagonists

# Table des matières

|  |     |
|--|-----|
| Résumé.....  | i   |
| Abstract.....  | ii  |
| Liste des tableaux.....  | v   |
| Liste des figures.....   | vi  |
| Liste des sigles et abréviations.....                                | vii |
| Remerciements.....   | x   |
| INTRODUCTION.....  | 1   |
| Chapitre 1. Les cellules NK.....                                     | 2   |
| 1.1 Morphologie et localisation des cellules NK.....                 | 2   |
| 1.2 Classification, développement et maturation des cellules NK..... | 2   |
| 1.3 Les récepteurs des cellules NK.....                              | 5   |
| 1.4 Les fonctions des cellules NK.....                               | 8   |
| 1.5 Les cellules NK et le cancer.....                                | 9   |
| Chapitre 2. Les cellules dendritiques plasmacytoïdes.....            | 13  |
| 2.1 Distribution, morphologie et phénotype des cellules pDC.....     | 13  |
| 2.2 Développement des cellules pDC.....                              | 14  |
| 2.3 Activation des cellules pDC.....                                 | 14  |
| 2.4 Les fonctions des cellules pDC.....                              | 16  |
| 2.5 Les cellules pDC et le cancer.....                               | 17  |
| 2.6 Production des cellules pDC in vitro.....                        | 19  |
| MATÉRIELS ET MÉTHODE.....  | 21  |
| Matériels et Méthode.....  | 22  |
| RÉSULTATS.....   | 23  |
| Résultats.....   | 24  |
| ARTICLE.....   | 25  |
| Abstract.....  | 27  |
| Introduction.....  | 28  |
| Materials and Methods.....   | 30  |
| Results.....   | 34  |

|                       |    |
|-----------------------|----|
| Discussion.....       | 40 |
| CONCLUSION.....       | 46 |
| Conclusion.....       | 47 |
| BIBLIOGRAPHIE : ..... | 49 |

|

## **Liste des tableaux**

**Tableau I-** Les récepteurs activateurs et inhibiteurs exprimés chez les cellules NK

## Liste des figures

Figure 1- Mécanismes cytotoxiques des cellules NK

Figure 2. Développement de sous-populations des cellules NK

Figure 3- Les cellules pDC dans l'inhibition ou la promotion de la tumeur

### ARTICLE :

Figure 1- AHR antagonists increase in vitro differentiation of pDC from CD34+ progenitors

Figure 2- Differentiation of pDC in the presence of AHR antagonists increase their functional activities after TLR stimulation

Figure 3- IvD-pDC produce lower amount of IFN- $\alpha$  than peripheral blood pDC, but produce comparable amounts of IFN- $\lambda$

Figure 4- IFN- $\alpha$  signaling is required for NK cell stimulation by ivD-pDC

Figure 5- TLR-7 and TLR-9 ligands are equally efficient to stimulate ivD-pDC and to increase NK cell lytic functions

## Liste des sigles et abréviations

### A

ADCC : Cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps

ADN : Acide désoxyribonucléique

AhR : Récepteur de l'aryl hydrocarbon (« Aryl hydrocarbon receptor »)

ALL: Acute lymphoblastic leukemia

### C

CD : Classe (synonyme : marqueur) de différenciation

CMH : Complexe majeur d'histocompatibilité

### D

DAMP : patrons moléculaires associés au danger (« Danger-Associated Molecular Patterns »)

### F

FAS-L : Ligand du fragment inducteur d'apoptose

FLT3-L : Fms-like tyrosine kinase 3 ligand

### G

GFP: Green fluorescence protein

GMP : Good Manufacturing Practice. En français BPF: Bonnes pratiques de fabrication

GvL : Graft versus leukemia. En français : Effet greffon versus leucémie

### H

HSP : Protéines de « shock » thermique (« Heat Shock Proteins »)

HLA : Antigène de leucocytes humains (« Human Leucocyte Antigen »)

HEVs : High endothelial venules

### I

ILCs : cellules lymphoïdes innées (« Innate Lymphoid Cells »)

IFN : Interféron

IFNR : Récepteur d'IFN

IL : Interleukine

ITIM : Immune tyrosine-based inhibitory motifs

ILT7 : Immunoglobulin superfamily receptor immunoglobulin-like transcript 7



ivD-pDC: *in vitro* differentiated pDC

## **K**

KIR : Killer immunoglobulin-like receptors

## **L**

LAL : Lléucémie aigüe lymphoïde

LPS : Lipopolysacharides

## **M**

M-CSF : Macrophage colony stimulating factor

mDC : Cellules dendritiques myéloïdes

## **N**

NK : natural killer

NDV : Newcastle disease virus

NCRs : les récepteurs de cytotoxicité naturelle (« natural cytotoxicity receptor »)

## **P**

PAMP : motifs structuraux bien conservés présents dans les pathogènes microbiens (« Pathogen-Associated Microbial Patterns »)

pDC : Cellules dendritiques plasmacytoïdes

PBMC : Cellules mononuclées du sang périphérique (« Peripheral Blood Mononuclear Cells »)

PB pDC: pDC isolated from peripheral blood

PGN : Peptidoglicans

## **S**

SCF : Facteur de cellules souches (« Stem Cell Factor »)

SR1 : Stem Regenin 1

## **T**

TCSH : Transplantation des cellules souches hématopoïétiques

TLR : Récepteurs de type Toll-like

TPO: Thrombopoietin

TRAIL : Ligand induisant l'apoptose apparenté au facteur de nécrose tumorale (« tumor-necrosis-factor related apoptosis inducing ligand »)

TNF : Facteur de nécrose tumorale (Tumor Necrosis Factor)

*À tous ceux pour qui ce travail signifie un espoir de vie*

## Remerciements

J'aimerais adresser mes remerciements aux personnes qui m'ont aidé dans la réalisation de ce mémoire.

D'abord, j'aimerais remercier mon directeur de recherche Dr. Michel Duval pour m'avoir donné l'opportunité de travailler dans son laboratoire. Pendant ce temps j'ai beaucoup apprécié votre confiance en moi, votre aide et vos conseils.

Sabine, un immense merci pour être là pour me guider, me donner ton avis et répondre à toutes mes questions. Je voudrais aussi te remercier de m'avoir transmis ton expertise et de m'avoir donné la confiance qui m'a permis de m'intégrer au laboratoire et développer mon sens critique. Merci pour ta patience et ton aide avec le français.

Paulo, merci d'être toujours là pour m'aider avec les différents appareils du laboratoire et du centre de recherche, pour ton aide informatique et tes conseils.

Assila et Louise, je tiens à vous remercier pour votre collaboration et votre aide pendant ces deux années.

À ma famille : mon mari, ma fille et mes parents de me soutenir et m'encourager dans mes propos. Merci d'être toujours là pour moi !

J'adresse mes sincères remerciements à Yves-Line Delva, Caroline Tra et Marie St-Jacques, infirmières du Centre de Recherche sans qui ma recherche n'aurait pu se réaliser.

Je souhaite remercier tous les donateurs qui ont volontairement contribué à cette recherche.

Finalement, j'aimerais remercier la Fondation du CHU Sainte-Justine et le FRQS pour la bourse qu'ils m'ont été octroyée.

# **INTRODUCTION**

## **Chapitre 1. Les cellules NK**

Les cellules natural killer (NK) sont les lymphocytes du système immunitaire inné. Ils possèdent la capacité de lyser des cellules infectées ou tumorales en l'absence d'immunisation spécifique préalable. À la différence des lymphocytes T et B, les cellules NK n'expriment pas des récepteurs spécifiques aux antigènes générés par des réarrangements des gènes somatiques. Cependant, des données récentes ont montré que les cellules NK possèdent certaines propriétés propres aux cellules du système immunitaire adaptatif. En effet, il a été observé que certaines sous-populations de cellules NK spécifiques se répandent en réponse à certains pathogènes, générant une mémoire à long terme et une réponse secondaire plus puissante après une deuxième rencontre avec le pathogène (Sun, Beilke et al. 2009).

### **1.1 Morphologie et localisation des cellules NK**

Les cellules NK possèdent une morphologie de grands lymphocytes granuleux. Leur grande taille (9-12  $\mu\text{m}$ ) est due à la présence de granules lytiques dans leur cytoplasme (Homberg 1999). Les cellules NK circulent dans le sang périphérique où elles représentent le 5 à 15 % des lymphocytes. Elles sont aussi présentes dans la rate, le foie, les poumons et dans la moelle osseuse. La présence des cellules NK dans les ganglions lymphatiques est limitée, cependant, ces cellules NK jouent un rôle important dans l'activation des cellules T de type 1 car elles vont interagir avec les cellules dendritiques pour aider dans ce processus (Fehniger, Cooper et al. 2003, Martin-Fontecha, Thomsen et al. 2004).

### **1.2 Classification, développement et maturation des cellules NK**

Les cellules NK appartiennent au groupe 1 des cellules lymphoïdes innées (ILCs « Innate Lymphoid Cells ») en raison de leur capacité à sécréter de l'IFN $\gamma$ . Les ICL du groupe 1 se distinguent également par l'absence de sécrétion de cytokines de type 2 (interleukine (IL) -4 et IL-13), d'IL-17 ou d'IL-22 (Spits, Artis et al. 2013). Les NK humaines sont définies par la présence du marqueur CD56<sup>+</sup> et l'absence des marqueurs lymphocytaires CD3, CD19 et du marqueur monocytaire CD14.

On distingue deux sous-populations de cellules NK en fonction du niveau d'expression du

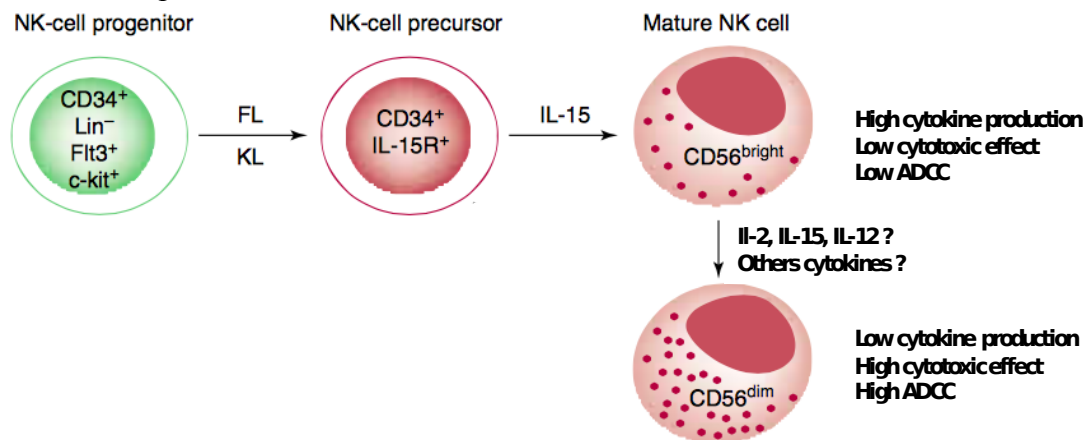
marqueur CD56 : les cellules NK CD56<sup>bright</sup> ou CD56<sup>dim</sup>.

- Les cellules CD56<sup>bright</sup> sont présentes dans les tissus lymphoïdes secondaires. Ces cellules sont parfois considérées comme immatures car elles ont une capacité cytotoxique limitée. Ces cellules sont le plus efficaces dans la production de cytokines comme l'IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , GM-CSF, IL-10 et l'IL-13. Dépendamment de la stimulation les CD56<sup>bright</sup> peuvent produire entre 20 et 30 fois plus de IFN $\gamma$  que les CD56<sup>dim</sup>. Ces cellules ont un rôle unique dans la réponse immune où elles sont la principale source de cytokines régulatrices du système immunitaire
- Les cellules NK CD56<sup>dim</sup> se trouvent principalement dans le foie et dans le sang, où elles représentent 90% des cellules NK. Les cellules CD56<sup>dim</sup> sont définies comme des cellules NK matures cytotoxiques qui possèdent plus des perforines, granzymes et granules cytotoxiques que les CD56<sup>bright</sup>. Comme ces cellules possèdent une haute expression de CD16 elles sont aussi des médiateurs très efficaces de la cytotoxicité dépendante d'anticorps. Même si les CD56<sup>bright</sup> sont de meilleures productrices de cytokines, les cellules CD56<sup>dim</sup> peuvent, après la reconnaissance de la cible, produire une quantité significative de cytokines et plus rapidement que les cellules CD56<sup>bright</sup>.

Le développement des cellules NK arrive dans la moelle osseuse à partir des cellules souches hématopoïétiques. Elles sont issues de la différenciation des progéniteurs lymphoïdes communs, à partir desquels se différencient les lymphocytes T et B et les ILC (Rosmaraki, Douagi et al. 2001). Au cours de leur développement, les cellules NK sont éduquées (ou licenciées) afin de pouvoir distinguer les cellules normales et les cellules anormales (infectées ou tumorales). Pendant ce processus d'éducation, certains des récepteurs présents à la surface des cellules NK apprennent à reconnaître les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (CMH classe I). Cette interaction permet aux cellules NK de reconnaître les cellules saines, qui expriment les molécules du CMH de classe I, des cellules infectées par des virus ou tumorales, qui vont réduire ou perdre l'expression de ces molécules (Geiger and Sun 2016) (Orr and Lanier 2010)

Pendant leur développement, les cellules NK interagissent avec les cellules stromales de la moelle osseuse et différents facteurs solubles qui vont guider leur maturation et leur

différenciation. Plusieurs études *in vitro* et *in vivo* ont montré que l'IL-15 est essentielle pour le développement des cellules NK. Dans une première étape les cellules CD34<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup> qui réponds aux facteur de croissance Ft3L et KL vont former les precursuers des cellules NK, CD34<sup>+</sup>IL15R<sup>+</sup>. Ensuite, la présence d'IL-15 guide les cellules pre-NK dans la formation des cellules NK mature CD56<sup>bright</sup> (Fig.2). Néanmoins, ces cellules n'expriment pas la molécule CD16, sont CD94<sup>+</sup> NKG2A<sup>+</sup> et seulement le 1-8% de cellules vont exprimer les KIRs (Mrozek, Anderson et al. 1996) (Yu, Fehniger et al. 1998). La formation des cellules CD56<sup>dim</sup> à partir des cellules CD56<sup>bright</sup> a été démontré par différents études. Romagnani et all ont démontré que les cellules CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>-</sup>KIR<sup>-</sup> peuvent être différencié dans CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup>KIR<sup>+</sup> à partir de différents stimulus présentes dans les organes lymphoïdes (Lanier, Le et al. 1986) (Romagnani, Juelke et al. 2007) (Chan, Hong et al. 2007). La stimulation avec IL-2 ou IL-15 augmente l'expression de CD16 et KIR, pourtant que la stimulation avec IL-12 est moins efficient pour augmenter l'expression de ces deux molécules. Le fait que l'expression de KIR sur les cellules CD56<sup>dim</sup> ne disparaît pas, même dans la présence de plusieurs stimulus, et que ces cellules montrent une faible capacité de prolifération suggère que la présence de KIR représente un état de maturation plus avancé.



**Figure 3. Developement de sous-populations des cellules NK.** Le développement des cellules NK peut être divisé dans deux étapes. La première est la formation des cellules pre-NK (CD34<sup>+</sup>IL-15R<sup>+</sup>) à partir des précurseur CD34<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup> par la présence de Flt3L (FL) et c-kit ligand (KL). Ensuite, la présence d'IL-15 favorise la formation de cellules NK matures CD56<sup>bright</sup>. Différentes cytokines pourraient participer dans la différenciation de CD56<sup>bright</sup> à CD56<sup>dim</sup>. Adapté de Cooper, M.A 2001 (Cooper, Fehniger et al. 2001)

### 1.3 Les récepteurs des cellules NK

Les fonctions cytotoxiques des cellules NK sont contrôlées par des signaux inhibiteurs et des signaux activateurs qui leur permettent de discriminer une cellule saine d'une cellule infectée ou tumorale (Tableau I). La balance de ces différents signaux va déterminer la réponse des cellules NK vis-à-vis de leurs cibles. De plus, la présence de cytokines pro-inflammatoires dans l'environnement ainsi que l'interaction des cellules NK avec des cellules dendritiques activées augmente les fonctions effectrices des cellules NK (Gerosa, Gobbi et al. 2005, Ferlazzo and Morandi 2014).

**Tableau I. Les récepteurs activateurs et inhibiteurs exprimés chez les cellules NK**

| Récepteurs                                |       | Ligands                       |
|---|-------|-------------------------------|
| <b>Activateurs</b>                        |       |                               |
| NKG2D                                     |       | MICA/B, ULBPs                 |
| CD16 (FcyRIIIa)                           |       | Fragment Fc des anticorps     |
| DNAM-1                                    |       | Nectin-2 (CD112), PVR (CD155) |
| Natural Cytotoxicity Receptors<br><br>NCR | NKp30 | B7-H6                         |
|   | NKp44 | NKp44L                        |
|   | NKp46 | Héparine sulfate              |
| <b>Inhibiteurs</b>                        |       |                               |
| KIR3DL2                                   |       | HLA-A3, HLA-A11               |
| KIR2DL2/3                                 |       | HLA-C1                        |
| KIR2DL1                                   |       | HLA-C2                        |
| KIR3DL1                                   |       | HLA-Bw4                       |
| NKG2A/CD94                                |       | HLA-E                         |
| TIGIT                                     |       | CD155                         |
| CD96                                      |       | CD155                         |

#### 1.3.1 Les récepteurs activateurs

Les récepteurs tels que NKG2D, DNAM1 et les récepteurs de cytotoxicité naturelle (NCRs - "natural cytotoxicity receptor") détectent la présence de ligands exprimés par les cellules transformées ou infectées (molécules de stress) (Moretta, Bottino et al. 2001). Ces récepteurs



sont couplés à des molécules de signalisation qui conduisent à l'activation des cellules NK et le relargage des granules cytotoxiques (Long, Kim et al. 2013). Le relargage des granules cytotoxiques induit la lyse des cellules cibles.

- Le récepteur de lectine-like de type C NKG2D reconnaît les ligands MICA/B et ULBPs (UL16 binding proteins). NKG2D joue un rôle très important dans la réponse des cellules NK contre les cellules tumorales (Moretta, Bottino et al. 2001).
- Le DNAM-1 détecte la présence de Nectin-2 et du récepteur au Poliovirus (PVR) (CD112 et CD155 respectivement) qui sont exprimés par certaines cellules cancéreuses (Tahara-Hanaoka, Shibuya et al. 2006) ou par des cellules en stress (Sakisaka and Takai 2004, Chan, Smyth et al. 2014).
- Les NCRs, comme NKp30, NKp44 and NKp46, sont également des récepteurs activateurs qui sont exprimés par les cellules NK qui jouent un rôle important dans l'activité anti-tumorale des cellules NK. Il a été démontré que l'expression des ligands de NKp30 (B7-H6) et NKp44 (NKp44L) par certains types de cancer corrèle avec la sensibilité à la lyse par des cellules NK (Byrd, Hoffmann et al. 2007).

### **1.3.2 La cytotoxicité dépendante des anticorps (ADCC)**

L'activité cytotoxique des cellules NK est également associée au mécanisme de cytotoxicité cellulaire dépendant d'anticorps (ADCC - Antibody-Dependent Cell-mediated Cytotoxicity). En effet, les cellules NK expriment le récepteur au fragment Fc des immunoglobulines, CD16, qui permet la reconnaissance de la portion invariante des anticorps qui opsonisent les cellules cibles (Clynes, Towers et al. 2000).

### **1.3.3 Les récepteurs aux pathogènes**

Les cellules NK expriment plusieurs récepteurs de type Toll-like (TLR) (Adib-Conquy, Scott-Algara et al. 2014), qui vont reconnaître des motifs structuraux bien conservés présents dans les pathogènes microbiens (PAMP - Pathogen-Associated Microbial Patterns) ou des patrons moléculaires associés au danger (DAMP - Danger-Associated Molecular Patterns). Les PAMP et les DAMP sont libérés par les cellules nécrotiques ou mortes. Les PAMP incluent les

lipopolysaccharides (LPS), les peptidoglycans (PGN), l'ADN bactérien (ADN riche en motif CpG) ou l'ARN double brin. Les DAMP sont des protéines intracellulaires comme les protéines de « shock » thermique (HSP - « Heat Shock Proteins) et aussi des fragments de la membrane extracellulaire. Ces molécules libérées par les cellules cancéreuses ou infectées par des virus, activent les fonctions cytotoxiques cellules NK et la production d'IFN- $\gamma$ . Néanmoins, ce processus est beaucoup plus efficace si des cellules dendritiques se trouvent dans l'environnement des cellules NK, ce qui suggère que le rôle des TLR dans les NK est indirect (Gerosa, Gobbi et al. 2005, Hart, Athie-Morales et al. 2005)

### **1.3.4 Les récepteurs inhibiteurs**

Les principaux récepteurs inhibiteurs des cellules NK sont les récepteurs de la famille “Killer immunoglobulin-like receptors” (KIR). Les KIR reconnaissent les molécules du CMH de type I. Chaque membre de la famille des KIR reconnaît un sous-groupe différent du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de type I, les antigènes de leucocytes humains (HLA) (HLA-A3/11, HLA-Bw4 et HLA-C1/2, Tableau I). L'interaction des KIR inhibiteurs avec les molécules du CMH induit un signal inhibiteur à la cellule NK par l'intermédiaire de molécules possédant des motifs ITIM (“immune tyrosine-based inhibitory motifs”). En revanche, lorsque les KIR ne trouvent pas leurs ligands à la surface de la cellule cible, cette inhibition n'existe pas et l'activation des cellules NK est favorisée.

Autre récepteur inhibiteur exprimé par les cellules NK appartient à la superfamille de lectines de type C, le récepteur CD94/NKG2A. Ce récepteur possède une forte affinité par les molécules HLA-E.

TIGIT et CD96 sont des récepteurs inhibiteurs présentes dans les cellules NK et les lymphocytes T. Ces deux récepteurs vont reconnaître la molécule CD155 qui est surexprimée dans plusieurs lignées tumorales et tumeurs primaires (Sloan, Eustace et al. 2004). TIGIT a été impliqué dans la réduction de la production de cytokines comme dans la diminution de la cytotoxicité des cellules NK (Stanietsky, Rovis et al. 2013) (Stanietsky, Simic et al. 2009). CD96 a un rôle important dans la surveillance immunologique et dans l'inhibition de la sécrétion de cytokines, spécifiquement l'IFN $\gamma$  (Chan, Martinet et al. 2014, Blake, Stannard et al. 2016).

## 1.4 Les fonctions des cellules NK

Les principales fonctions des cellules NK sont la reconnaissance et l'élimination des cellules transformées ou infectées, la sécrétion des cytokines et chemokines pro-inflammatoires et la co-stimulation d'autres cellules du système immunitaire adaptatif.

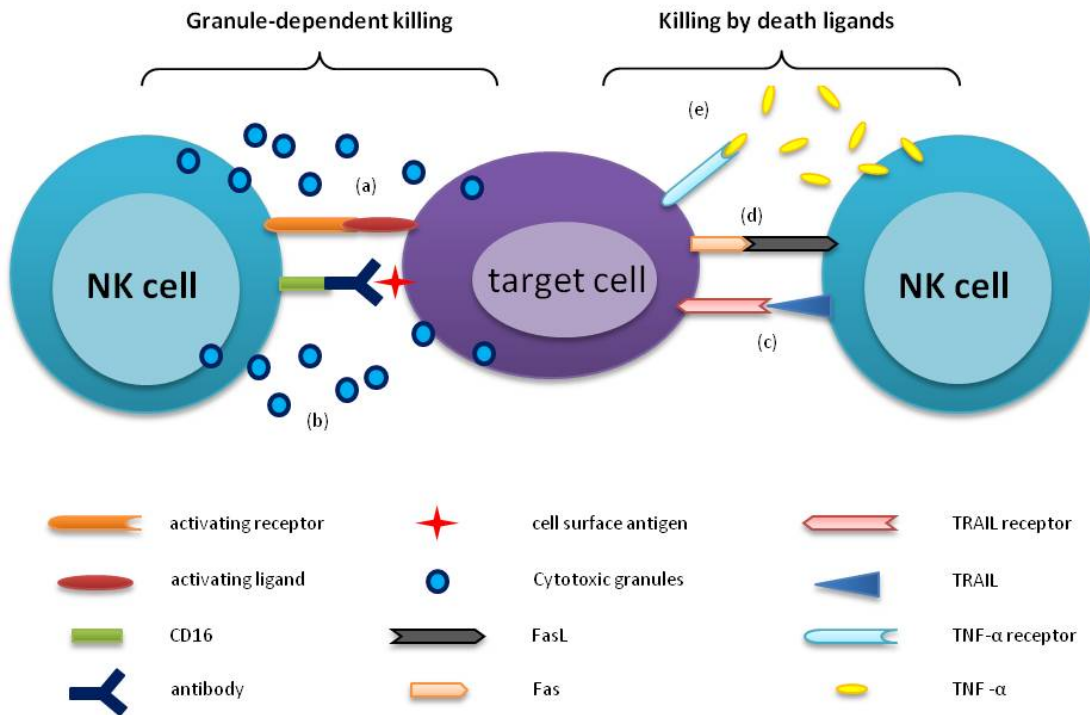
Les cellules NK, à différence des cellules T et B, ne nécessitent pas d'étapes de présentation des antigènes spécifiques, de prolifération, ni de différenciation pour exercer leur activité cytotoxique vis-à-vis des cellules cibles.

Le relargage des granules cytotoxiques est le mécanisme le plus utilisé par les cellules NK pour tuer les cellules tumorales ou infectées par des virus. Ce relargage est induit par l'interaction majoritaire des récepteurs activateurs avec leurs ligands ce qui balance la réponse vers l'activation des cellules NK. Les granules cytotoxiques contiennent des perforines et des granzymes qui sont être libérés au site de la synapse immunologique entre la cellule NK et la cible. Les perforines vont former des pores dans la membrane de la cible permettant aux granzymes et à d'autres molécules d'entrer dans la cellule pour induire l'apoptose (Mace, Dongre et al. 2014).

Les cellules NK peuvent également lyser leur cible via l'expression à leur surface des ligands des récepteurs de mort comme le ligand du fragment inducteur d'apoptose (FAS-L) et le ligand induisant l'apoptose apparenté au facteur de nécrose tumoral (TRAIL). L'interaction des ligands et de leurs récepteurs exprimés par la cible induit l'apoptose de celle-ci (Figure 1). L'expression de FAS-L et de TRAIL par les cellules NK n'est pas constitutive. Cette expression est induite suite à leur stimulation par des cytokines telles que l'IFN- $\alpha$  et l'IL-15 (Tsutsui, Nakanishi et al. 1996, Nguyen, Salazar-Mather et al. 2002), par certaines cibles, comme les cellules tumorales (Mori, Jewett et al. 1997) ou par les ligands du récepteur Fc $\gamma$ RIIIA (Eischen, Schilling et al. 1996). Les cellules NK sécrètent également des formes solubles de ces ligands.

En plus de leurs propriétés cytotoxiques, les cellules NK régulent également la réponse immunitaire grâce à leur capacité à produire différentes cytokines et chemokines (Lodoen and Lanier 2006). Après la reconnaissance de leur cible, les cellules NK sécrètent des cytokines et chemokines pro-inflammatoires comme l'IFN- $\gamma$ , le facteur de nécrose tumorale (TNF)- $\alpha$ , CCL3 (MIP-1 $\alpha$ ), CCL4 (MIP-1 $\beta$ ) et CCL5 (RANTES) (Fauriat, Long et al. 2010). Ces

molécules vont permettre le recrutement et l'activation des macrophages et des cellules dendritiques et vont déterminer le type de réponse adaptative (réponse Th1, Th2 ou Treg). L'IFN- $\gamma$  produit par les cellules NK activées joue un rôle direct dans le contrôle de la réplication virale en cas d'infection. Il joue également un rôle important dans le contrôle de la prolifération des cellules cancéreuses (Ikeda, Old et al. 2002).



**Figure 3. Mécanismes cytotoxiques des cellules NK.** Les différentes stratégies utilisées par les cellules NK pour tuer ces cibles sont illustrées. Le premier mécanisme est le relargage des granules cytotoxiques. Ce relargage est induit par l'interaction des a) récepteurs activateurs ou b) du récepteur au fragment Fc $\gamma$  (CD16). Les granules cytotoxiques contenant perforine et granzyme B sont libérés au site de la synapse par exocytose. Le deuxième mécanisme est la mort par interaction avec les ligands des récepteurs de mort. Dans ce cas l'apoptose est déclenchée après la activation des récepteurs de mort dans la cellule cible par c) TRAIL ou d) FasL ou e) la sécrétion de TNF $\alpha$ . Adapté de Teufert 2015 (Teufert 2015)

### 1.5 Les cellules NK et le cancer

Les cellules cancéreuses sont caractérisées par une prolifération non régulée. Cette prolifération est souvent causée par des mutations dans des proto-oncogènes qui contrôlent la

progression du cycle cellulaire ou par la perte de sensibilité aux signaux inhibiteurs de la prolifération (Hanahan and Weinberg 2000).

Le système immunitaire joue un rôle important dans la surveillance et l'élimination des cellules tumorales. Même si la plupart des études parlent de l'importance du système adaptatif dans cette surveillance, les cellules du système immunitaire inné jouent également un rôle important (Imai, Matsuyama et al. 2000, Carotta 2016). Spécifiquement, les cellules NK vont contribuer à (i) la reconnaissance des cellules tumorales et leur élimination, (ii) l'inhibition de la prolifération tumorale et de la dissémination de la tumeur. Cette surveillance est médiée par la capacité des cellules NK à développer une réponse cytotoxique, à sécréter des cytokines et à interagir avec les autres cellules du système immunitaire.

Plusieurs études ont démontré le rôle des cellules NK dans la régulation de la réponse anti-tumorale (Diefenbach, Jensen et al. 2001) (Belting, Homberg et al. 2015) (Lelaidier, Diaz-Rodriguez et al. 2015). Différentes études cliniques ont également montré une relation entre la présence des cellules NK dans les biopsies de tumeurs et un pronostic favorable (Coca, Perez-Piqueras et al. 1997) (Ishigami, Natsugoe et al. 2000) (Verma, Kaewkangsan et al. 2015). Les cellules NK ont la capacité de contrôler les cellules tumorales par interaction directe ou indirecte en augmentant l'activité des autres cellules du système immunitaire présentes dans le microenvironnement tumoral.

- Activité anti-tumorale directe des cellules NK. Les cellules tumorales sous-expriment fréquemment les molécules de CMH de type I pour échapper à la reconnaissance par les cellules T. Ces cellules sont alors des cibles privilégiées des cellules NK dont l'activité cytolytique n'est plus inhibée par les molécules du soi. De plus, les ligands des récepteurs activateurs NKG2D (MICA/B et ULBP) et DNAM-1 (CD112 et CD155) qui sont peu exprimés par des cellules saines, mais sont surexprimées par des cellules tumorales donnent un signal de danger pour les cellules NK (Bottino, Castriconi et al. 2003) (Masson, Jarry et al. 2001) (Sloan, Eustace et al. 2004) (Tahara-Hanaoka, Shibuya et al. 2004) (Castriconi, Dondero et al. 2004). Par exemple, Diefenbach et al a démontré que la sensibilisation des cellules NK par des ligands de NKG2D active les cellules NK ce qui permet l'élimination in vivo des cellules tumorales positives pour ces ligands (Diefenbach, Jensen et al. 2001). Autres auteurs ont aussi observé une activité antitumorale

contre les lymphomes par des cellules NK. Cette réponse était dépendant de la reconnaissance de ligands de NKG2D sur les cellules tumorales et de la capacité des NK de sécréter de l'IFN $\gamma$  (Belting, Homberg et al. 2015). Les récepteurs de cytotoxicité naturelle NKp46, NKp44 et NKp30 vont détecter la présence de différents ligands sur les cellules tumorales et jouent également un rôle dans la reconnaissance tumorale (Kruse, Matta et al. 2014). La reconnaissance des molécules liées au stress cellulaire, combinée à une diminution de l'expression des molécules du CMH induit l'activation des cellules NK et le relargage des granules cytotoxiques (Davis, Smyth et al. 2001) (Hayakawa, Kelly et al. 2002, Huergo-Zapico, Acebes-Huerta et al. 2014).

- Activité anti-tumorale directe nécessitant l'activation préalable des cellules NK. En réponse à la stimulation par les cytokines pro-inflammatoires, les cellules NK expriment TRAIL et FAS-L et peuvent induire l'apoptose des cellules tumorales via les récepteurs de mort cellulaire (Zamai, Ponti et al. 2007). Les cellules tumorales qui expriment les ligands de TRAIL, DR4 et DR5, sont sensibles à la mort induite par TRAIL (Ashkenazi, Pai et al. 1999) (Evdokiou, Bouralexis et al. 2002) (Kothny-Wilkes, Kulms et al. 1998) (Lundqvist, Abrams et al. 2006). Différent types de stimulation induisent une augmentation de l'expression de TRAIL par les cellules NK. C'est le cas de l'IL-12 et du  $\alpha$ -GalCer ( $\alpha$ -galactosylceramide) qui induisent une augmentation de la sécrétion d'IFN- $\gamma$  et de l'expression de TRAIL dans les cellules NK chez les souris. Cet effet est corrélé avec la mort des cellules tumorales. Ce bien connue que la stimulation des cellules NK avec de l'IFN- $\alpha$  active les cellules NK en induisant la sécrétion d'IFN- $\gamma$  et l'expression de TRAIL et FAS-L. Par exemple, dans notre laboratoire a été montré que la stimulation de cellules NK par les pDC activées, qui sécrètent de l'IFN- $\alpha$ , augmente la sécrétion d'IFN- $\gamma$  et l'expression de TRAIL dans les cellules NK, effet qui a est corrélé avec leur activité cytotoxique vis-à-vis des cellules leucémiques (Lelaidier, Diaz-Rodriguez et al. 2015). D'autres auteurs on montré que la stimulation de cellules NK avec l'INF- $\alpha$  augmente leur expression de Fas-L et leur sécrétion des cytokines ce qui est associé à l'augmentation de l'activité cytotoxique contre la ligné tumoral K562 (Liang, Wei et al. 2003)

- L'activité anti-tumorale indirecte des cellules NK est liée à leur capacité à sécréter des cytokines. Les cytokines telles que l'IFN- $\gamma$  et le TNF- $\alpha$ , les facteurs de croissance tels que le G-CSF et le GM-CSF, et les chemokines, produits par les cellules NK activées vont moduler l'activité d'autres cellules du système immunitaire tels que les cellules dendritiques et les lymphocytes T (Vivier, Raulet et al. 2011). L'IFN- $\gamma$  sécrété par les cellules NK est associé avec la survie de patients atteints de cancer gastro-intestinal (Menard, Blay et al. 2009). L'activité anti-tumorale de l'IFN- $\gamma$  est due en partie à sa capacité à induire l'expression des molécules du CMH de type I dans les cellules tumorales, ce qui les sensibilise à l'action cytotoxique des cellules T CD8<sup>+</sup> (Liao, Kaufmann et al. 2013). Des évidences récentes suggèrent que l'IFN- $\gamma$  sécrété par les cellules NK pourrait favoriser l'activité tumoricide des macrophages de type « M1 » (O'Sullivan, Saddawi-Konefka et al. 2012). Le TNF $\alpha$  peut avoir un effet direct dans les cellules tumorales car il active l'apoptose médiée par la caspase 8 (Peter and Krammer 2003). Les chemokines sécrétés par les NK tels que CCL3/MIP-1 $\alpha$  et CCL4/MIP-1 $\beta$ , vont recruter des cellules comme les neutrophiles, les macrophages et les cellules T dans les sites d'inflammation ce qui permet d'amplifier la réponse immunitaire (Maghazachi 2010)

En raison de l'ensemble de ces données de nouvelles immunothérapies basées sur l'activité anti-tumorale des cellules NK sont à l'étude et en développement clinique (Ames and Murphy 2014, Carotta 2016).

## **Chapitre 2. Les cellules dendritiques plasmacytoïdes**

Les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC) sont des cellules dendritiques spécialisées dans la production de grandes quantités d'IFN de type I (IFN- $\alpha$  et IFN- $\beta$ ) en réponse à une stimulation virale ou bactérienne. En raison de cette production d'IFN de type I, les pDC sont les activateurs naturels des fonctions des cellules NK et de l'immunité innée. Les pDC sont également des cellules présentatrices d'antigène, ce qui leur permet d'activer à la fois l'immunité innée et adaptative en réponse à une infection.

### **2.1 Distribution, morphologie et phénotype des cellules pDC**

Les pDC représentent approximativement 0.01-0.05 % des cellules mononuclées du sang périphérique (PBMC). Les pDC sont produites dans la moelle osseuse, à partir de précurseurs hématopoïétiques. Les pDC immatures qui sortent de la moelle osseuse vont circuler dans le sang à travers les HEVs (high endothelial venules) et elles arrivent aux organes lymphoïdes secondaires, spécifiquement aux endroits riches en cellules T (Penna, Sozzani et al. 2001, Sozzani, Vermi et al. 2010). En réponse aux chemokines, les pDC peuvent également migrer vers les tissus périphériques non lymphoïdes tels que les poumons et la peau. Différentes molécules sont impliquées dans la migration des cellules pDC comme CD62L, PSGL1 (P-selectin glycoprotein ligand 1),  $\beta$ 1 et  $\beta$ 2 intégrines, les récepteurs de chemokines CXCR3, CXCR4, CCR2, CCR5, CCR6, CCR7, CCR9 et CCR10 (Sozzani, Vermi et al. 2010).

Les pDC possèdent une taille intermédiaire entre les lymphocytes et les monocytes avec un noyau round ou ovoïde légèrement dentelé et excentré. Ces cellules n'expriment pas les différents marqueurs des lignées lymphoïdes et myéloïdes tels que CD3, CD19, CD14, CD16 and CD11c. Les pDC sont définies par les marqueurs CD123<sup>high</sup> (IL3-receptor  $\alpha$ ), BDCA2<sup>+</sup> (CD303) et BDCA4<sup>+</sup> (CD304). Elles possèdent aussi d'autres marqueurs comme ILT7 (immunoglobulin superfamily receptor immunoglobulin-like transcript 7) (Facchetti, Vermi et al. 2003), CD4, CD68 et ILT3.

Les pDC expriment les TLR 7 et 9 localisés dans les endosomes. Ces récepteurs reconnaissent spécifiquement l'ARN et l'ADN microbien. En réponse à la stimulation par des ligands des TLR, les pDC sont produisent de grandes quantités de cytokines (IFN de type I,



spécifiquement l'IFN- $\alpha$ , IL-6 et TNF- $\alpha$ ) et se transforment en cellules présentatrices d'antigène.

## 2.2 Développement des cellules pDC

Le développement et la régulation des pDC ne sont pas encore bien connus mais il est bien documenté que le facteur FLT3-L (Fms-like tyrosine kinase 3 ligand) est essentiel pour leur développement. Le récepteur de FLT3, est un récepteur du type tyrosine kinase qui est très exprimé par les progéniteurs hématopoïétiques. Il a été démontré chez la souris que la délétion du gène du *flt3-l* ou un traitement avec des inhibiteurs du *flt3* réduit grandement le nombre de pDC dans les organes lymphoïdes (Merad and Manz 2009). Une autre étude a démontré une augmentation du nombre de pDC humaines dans le sang, les tissus lymphoïdes et les poumons des souris humanisées après le traitement avec du FLT3-L (Pulendran, Lingappa et al. 1997, Pulendran, Smith et al. 1999, Maraskovsky, Daro et al. 2000). En plus de la signalisation à travers le récepteur FLT3, d'autres facteurs ont été identifiés dans le développement des pDC. C'est le cas du M-CSF (macrophage colony stimulating factor) car on trouve une diminution de nombre de pDC chez les souris déficientes pour le gène *csf1* qui code pour ce facteur (MacDonald, Rowe et al. 2005).

## 2.3 Activation des cellules pDC

Les pDC ont la capacité de détecter la présence des pathogènes grâce à des récepteurs TLR, une famille de récepteurs qui reconnaît des PAMPs, (Janeway and Medzhitov 2002) (Takeda, Kaisho et al. 2003). Les pDC expriment principalement le TLR7, qui reconnaît l'ARN viral simple brin et le TLR9, qui est spécifique par des séquences CpG hypométhylées de l'ADN bactérien ou viral (Krug, Towarowski et al. 2001, Hemmi, Kaisho et al. 2002). Cette reconnaissance entraîne l'activation des cellules pDC, ça veut dire, la sécrétion de plusieurs cytokines aussi comme l'expression de molécules co-stimulatrices telles que le CD80, CD86 et CD40 (Ahonen, Gibson et al. 1999, Hemmi, Kaisho et al. 2002, Ito, Amakawa et al. 2002). L'activation des cellules pDC entraîne principalement la sécrétion d'IFN- $\alpha$ , un IFN de type I. Les pDC peuvent produire entre 0.1 et 0.2 IU par million de cellules, 10 fois plus que la production d'IFN- $\alpha$  par les monocytes, ce qui fait de pDC la principale productrice de cette

cytokine (Fitzgerald-Bocarsly 1993). Par contre, la sécrétion d'autres cytokines ou l'expression de molécules d'activation des cellules pDC depends principalement du type d'activation. Par exemple, parmi les agonistes du TLR9 se trouvent les oligonucléotides synthétiques de type CpG (Krug, Luker et al. 2004) (Krug, Rothenfusser et al. 2001). Il existe différentes classes de CpG qui induisent des réponses différentes lorsqu'ils sont utilisés pour stimuler les pDC. Les CpG de classe A (D/2216 ODN) induisent une forte sécrétion d'IFN- $\alpha$  mais peu d'expression des molécules d'activation telles que CD80 et CD86 (Krug, Rothenfusser et al. 2001, Kerkmann, Rothenfusser et al. 2003). A l'inverse, la stimulation avec des CpG de classe B (K/2006 ODN) augmente fortement l'expression des molécules co-stimulatrices, des molécules impliquées dans la présentation antigénique, ainsi que la sécrétion d'IL-6 et TNF $\alpha$ , mais induit peu de production d'IFN- $\alpha$ . Ces différences sont reliées à une activation différente des voies de signalisation par les différentes classes de CpG. Le CpG-A active les pDC par la voie dépendant du récepteur d'IFN (IFNR) tandis que le CpG-B active une voie indépendante du IFNR (Kerkmann, Rothenfusser et al. 2003).

En plus, les ligands synthétiques du TLR7, comme le CL097, induit seulement des faibles niveaux d'IFN- $\alpha$  quand on compare avec une stimulation par le virus de la grippe (Di Domizio, Blum et al. 2009). D'autres agonistes du TLR7 comme l'imiquimod et le resiquimod ont montré aussi une activation des pDC mesurée par la sécrétion d'IFN- $\alpha$ , IFN- $\omega$ , TNF- $\alpha$  and IP-10 (Gibson, Lindh et al. 2002).

En plus, il a été montré récemment que les pDC activées produisent également des IFN- $\lambda$  (Iversen and Paludan 2010). Cette cytokine appartient aux IFN de type III et on distingue 4 isoformes, IFN- $\lambda$ 1, IFN- $\lambda$ 2, IFN- $\lambda$ 3 (connues comme IL-29, IL-28A, et IL-28B, respectivement) et IFN- $\lambda$ 4 (Kotenko, Gallagher et al. 2003, Sheppard, Kindsvogel et al. 2003, Jewell, Cline et al. 2010, Prokunina-Olsson, Muchmore et al. 2013). Les IFN- $\lambda$  utilisent la même voie d'activation que les IFN de type I mais leur récepteur est un hétérodimère composé par une chaîne d'IL28R et IL10R (Donnelly and Kotenko 2010). L'IL28R est exprimé par les pDC, les cellules B, les cellules épithéliales et les hépatocytes (Sheppard, Kindsvogel et al. 2003, Zhou, Hamming et al. 2007). Le rôle des IFN- $\lambda$  dans la régulation des fonctions anti-tumorales des cellules NK a récemment été mis en évidence *in vivo* (Souza-Fonseca-

Guimaraes, Young et al. 2015).

## **2.4 Les fonctions des cellules pDC**

La capacité des pDC à produire des cytokines, spécifiquement de grandes quantités d'IFN de type I comme l'IFN- $\alpha$ , leur permet de réguler l'inflammation et d'agir sur les fonctions des systèmes immunitaires inné et adaptatif. L'activation des pDC conduit directement ou indirectement à l'activation d'autres types cellulaires comme par exemple les monocytes, les cellules dendritiques myéloïdes (mDC), les cellules B, les cellules T et les cellules NK. Les IFN de type I sécrétés par les pDC contrôlent l'accumulation, la maturation et la production de cytokines des différentes sub-types de DC dans les organes lymphoïdes (Dalod, Salazar-Mather et al. 2002, Dalod, Hamilton et al. 2003).

La capacité de présentation des antigènes par les pDC a longtemps été l'objet de controverse. Des études récentes permettent d'affirmer que les pDC sont capables de présenter des antigènes exogènes aux cellules T CD8 (Tel, Blood 2013; Liu Plos One 2009). En l'absence de stimulation, les pDC possèdent une plus faible expression des molécules importantes dans l'apprêtement d'antigènes que les mDC (Fiebiger, Meraner et al. 2001), (Chehimi, Starr et al. 1989). En revanche, en réponse à une stimulation virale, les pDC augmentent leur expression des molécules co-stimulatrices et du CMH de type II (Cella, Facchetti et al. 2000). Il a été démontré que les pDC activées induisent la prolifération de cellules T CD8<sup>+</sup> et des cellules Th1 CD4<sup>+</sup> spécifiques pour antigènes du virus de la grippe (Fonteneau, Gilliet et al. 2003). En plus, les pDC activées par CpG augmentent l'expression de CXCR3 et CCR5 dans les cellules T activées ce qui polarise la réponse T vers une réponse Th1 (Langenkamp, Nagata et al. 2003). Il a été également démontré que l'IFN- $\alpha$  et l'IL-6 sécrétés par les pDC activées par le virus de la grippe, induisent la différenciation des lymphocytes B en cellules plasmiques (Jego, Palucka et al. 2003).

Les IFN de type I sécrétés par les pDC activées stimulent l'activité cytotoxique des cellules NK en même temps qu'ils protègent les cellules non infectées de l'action des cellules NK (Bandyopadhyay, Perussia et al. 1986, Gerosa, Gobbi et al. 2005). Nous avons montré au laboratoire que la stimulation *in vitro* des cellules NK par des pDC activées par le CpG,

augmente l'expression de molécules d'activation telles que le CD69 et induit une forte expression de TRAIL sur les cellules NK (Lelaidier, Diaz-Rodriguez et al. 2015). Nous avons également montré que cette forte expression de TRAIL permet de surmonter la résistance des cellules leucémiques et de les rendre sensibles à la lyse par les cellules NK. L'activation des cellules NK ne dépend pas du contact entre les pDC et les cellules NK, mais la présence d'IFN- $\alpha$ , sécrété par les pDC, est essentielle pour augmenter la capacité cytotoxique des cellules NK vis-à-vis des cellules leucémiques (Lelaidier, Diaz-Rodriguez et al. 2015).

## **2.5 Les cellules pDC et le cancer**

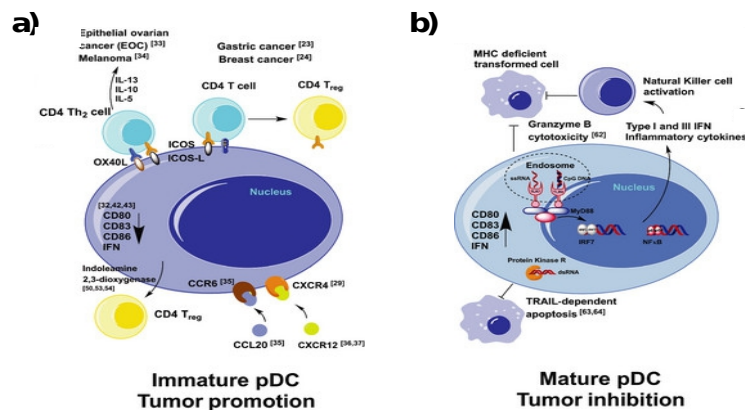
La présence des pDC immatures dans différents types de cancer comme le cancer de l'ovaire, du sein, de tête et du cou, le myélome et le mélanome, a été associée à la progression et à une diminution de la survie de patients. Des pDC obtenues à partir d'ascites de patients avec de cancer de l'ovaire, sont incapables d'activer des cellules T et vont stimuler la sécrétion de l'IL-10 par les cellules T régulatrices (Zou, Machelon et al. 2001). Les pDC qui se trouvent dans les ganglions proches de tumeurs solides vont favoriser un microenvironnement qui diminue la réponse T (Munn, Sharma et al. 2004). Dans le cas du mélanome, les pDC qui se trouvent dans la tumeur ne produisent pas d'IFN de type I et leur présence est associée à la progression de la maladie (Vermi, Bonecchi et al. 2003, Gerlini, Urso et al. 2007). Ces observations suggèrent que les pDC immatures que se trouvent dans les tumeurs solides induisent la prolifération des cellules T régulatrices qui vont inhiber la réponse anti-tumorale spécifique (Fig. 2a).

Cependant, les pDC peuvent également promouvoir la réponse anti-tumorale si elles sont stimulées via leurs TLR. L'utilisation d'agonistes des TLR pourrait être utile pour activer les pDC intra-tumorales et induire la production des IFN de type I (Fig. 2b). Cette activation des cellules pDC peut induire directement une activité antitumorale directe des pDC par la sécrétion des lysozyme ou granzyme B et l'expression de TRAIL (Chaperot, Blum et al. 2006). Une réponse anti-tumorale associée à l'activation des pDC a été observée après administration intra-tumorale de ligand du TLR7 dans une tumeur de sein murine (Le Mercier, Poujol et al. 2013). Dans un modèle de mélanome, l'activation de cellules pDC par

l'imiquimod (TLR7 agonist) induit l'activation des fonctions cytotoxiques dans les pDC ce qui inhibe le développement de la tumeur (Aspord, Tramcourt et al. 2014). En plus, les cellules pDC activées vont activer d'autres cellules qui vont ensuite être impliquées dans la réponse antitumorale. Par exemple, l'utilisation de pDC stimulées par un ligand du TLR dans un modèle murin de mélanome a permis d'induire une réponse anti-tumorale liée à l'activation des cellules NK (Liu, Lou et al. 2008). Une autre étude a démontré que l'injection de pDC qui présentent des peptides tumoraux a induit une réponse anti-tumorale de cellules T CD4+ et CD8+ chez des patients atteints de mélanome métastatique (Tel, Aarntzen et al. 2013).

L'ensemble de ces études démontrent que l'utilisation de pDC activées peut être une stratégie thérapeutique valable pour surmonter la tolérance immunitaire de certaines tumeurs et pour induire une réponse anti-tumorale effective.

Néanmoins, l'utilisation des pDC en clinique est limitée par le faible nombre de cellules disponibles à partir du sang périphérique. C'est pour cette raison que le développement de nouvelles stratégies pour augmenter la production de ces cellules est une priorité pour leur utilisation en immunothérapie.



**Figure 2. Les cellules pDC dans l'inhibition ou la promotion de la tumeur.** (a) Les mécanismes suggérés pour expliquer la dysfonction des pDC intra-tumorales: le recrutement de pDC immatures qui n'expriment pas des molécules co-stimulatrices et la sécrétion par la tumeur de facteurs immuno-supresseurs. De plus, ces pDC immatures induisent la tolérance des cellules T régulatrices, secrètent des cytokines anti-inflammatoires comme l'IL-13 et ne produisent pas d'IFN de type I. (b) L'activation des pDC à travers son TLR7 et 9 conduit à la sécrétion d'IFN de type I, d'autres cytokines pro-inflammatoires et aussi l'expression de molécules co-stimulatrices comme CD80, CD83 and CD86. Les pDC possèdent une activité tumorale directe par l'action de granzymes B et TRAIL et indirectement par l'activation des cellules NK par les IFN de type. Adapté de Lombardi, 2015 (Lombardi, Khaiboullina et al. 2015)

## 2.6 Production des cellules pDC *in vitro*

Les cellules pDC peuvent être purifiées directement du sang périphérique par sélection négative ou sélection positive. L'identification de deux marqueurs spécifiques pour les pDC, BDCA-2 et BDCA-4, ont facilité la purification de ces cellules à partir du sang périphérique. Cependant, les quantités de sang nécessaires à leur purification sont un frein au développement de leur utilisation en clinique.

L'expansion et la différenciation des pDC *in vitro* à partir des précurseurs hématopoïétiques (cellules CD34<sup>+</sup>) ont été développées récemment. Plusieurs facteurs de croissance et cytokines sont nécessaires pour différencier les précurseurs CD34<sup>+</sup> en pDC. L'utilisation de FLT3-L est essentielle pour la différenciation de pDC à partir de cellules souches hématopoïétiques (Blom, Ho et al. 2000) (Gilliet, Boonstra et al. 2002). L'addition de thrombopoïétine (TPO) en combinaison avec le FLT3-L augmente le nombre de pDC obtenues à partir des cellules CD34<sup>+</sup> (Chen, Antonenko et al. 2004). Le facteur de cellules souches (SCF « Stem Cell Factor ») est aussi essentiel pour préserver la viabilité des précurseurs. Le SCF en interaction avec d'autres cytokines, intervient dans le cycle cellulaire et prévient la mort par apoptose (Hassan and Zander 1996). La cytokine IL-7, qui est essentielle dans le développement des cellules T et B, joue aussi un rôle important dans le développement des cellules dendritiques. Chez la souris, il a été montré que l'IL-7 est nécessaire à la différenciation des précurseurs lymphoïdes et des pDC matures (Vogt, Link et al. 2009).

Par ailleurs, de récentes données ont démontré que le récepteur de l'aryl hydrocarbon (AhR « Aryl hydrocarbon receptor ») peut réguler la différenciation des cellules dendritiques. L'AhR joue un rôle important dans la régulation de la réponse cellulaire à différents stimulus exogènes et également à des ligands endogènes. L'utilisation *in vitro* des agonistes de l'AhR diminue la génération des pDC. Par contre, si un antagoniste de l'AhR, comme le CH223191, est présent dans la culture, le nombre de pDC augmente sans affecter la différenciation des cellules dendritiques conventionnelles. De plus, chez les souris déficientes pour le gène de l'*ahr* on observe une accumulation des pDC dans les organes lymphoïdes mais des quantités équivalentes d'IFN- $\alpha$  (Liu, Ramachandran et al. 2014). Ces résultats suggèrent une régulation négative de la part d'AhR dans le développement des pDC.

Finalemant, une étude avec des pDC humaines a démontré que l'utilisation de l'antagoniste du AhR Stem Regenin (SR1) augmente le nombre de pDC générées à partir des cellules CD34<sup>+</sup> (Thordardottir, Hangalapura et al. 2014). Les pDC obtenues *in vitro* montrent un phénotype comparable aux pDC du sang périphérique et ont la capacité de sécréter des cytokines pro-inflammatoires telles que l'IFN- $\alpha$ , l'IL-12 et l'TNF- $\alpha$ , en réponse à la stimulation avec des ligands du TLR. Finalemant, les auteurs démontrent la capacité de ces pDC générées *in vitro* à activer la réponse des cellules T (Thordardottir, Hangalapura et al. 2014).

La capacité des pDC générées *in vitro* à induire l'activation des cellules NK n'a cependant pas été explorée dans cette étude. De plus, la production des cytokines par les pDC générées *in vitro* n'a pas été comparée à celle des pDC du sang périphérique. Ces deux points seront explorés par notre étude.

## **MATÉRIELS ET MÉTHODE**



## **Matériels et Méthode**

La section Matériels et méthode est incluse dans l'article

## **RÉSULTATS**

## **Résultats**

La section Résultats est incluse dans l'article

# **ARTICLE**

# ***In vitro* differentiated plasmacytoid dendritic cells are a powerful immunotherapeutic tool to increase anti-tumor activity of NK cells**

Yildian Díaz-Rodríguez,<sup>1,2</sup> Paulo Cordeiro,<sup>1</sup> Assila Belounis,<sup>1,2</sup>

Sabine Herblot<sup>1,2,3</sup> and Michel Duval<sup>1,2,3</sup>

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

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

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

<sup>4</sup> *Département de Sciences Biomédicales, Université de Montréal, Québec, Canada.*

Corresponding author: Sabine Herblot, PhD

CHU Sainte-Justine

Centre de cancérologie Charles-Bruneau

3175, côte Sainte-Catherine

Montréal (Québec) H3T 1C5, Canada

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

Phone: 514-345-4931 Ext. 3910

Keywords: natural killer cells; plasmacytoid dendritic cells; in vitro expansion and differentiation of hematopoietic cells; AHR antagonists

## **Abstract**

Harnessing the immune system to fight cancer cells is a promising research avenue that has been shown to be efficient against chemotherapy refractory cancers. Natural killer (NK) cells are innate lymphocytes that recognize and kill cancer cells without prior sensitization. However, some cancer cells such as acute lymphoblastic leukemia may escape NK cell-mediated killing. To circumvent this resistance, we have developed an innovative approach based on NK cell stimulation with Toll-like receptor-activated plasmacytoid dendritic cells (pDC). To translate this approach into the clinic, high numbers of human pDC are required. We show here that *in vitro* differentiation of cord blood CD34<sup>+</sup> progenitors in the presence of aryl hydrocarbon-receptor antagonists gives rise to clinically relevant numbers of pDC. Importantly, blocking the aryl hydrocarbon-receptor pathway significantly increased the yield of pDC without compromising their capacity to stimulate NK cell cytolytic functions, as compared with peripheral blood pDC. Collectively, our results pave the way to clinical grade production of human pDC for innate immunotherapy against resistant cancers.

## Introduction

In the last decade, immunotherapy has been considered as a major breakthrough in the field of anti-cancer therapy, since this approach demonstrated its efficacy against chemotherapy refractory cancers. Although many efforts have focused on antigen-targeted approaches, harnessing innate immunity to fight cancer cells have also been proposed and natural killer (NK) cells are increasingly used to design anti-cancer immunotherapy (Vivier and Ugolini 2011, Miller 2013, Rezvani and Rouce 2015).

NK cells recognize and kill infected or transformed cells without prior sensitization (Vivier and Ugolini 2011). Their cytotoxicity activity against cancer cells is highly regulated by the balance between activating and inhibitory signals as well as their education in order to distinguish self and untransformed cells from cancer cells. Nonetheless, cancer cells can become resistant to NK cell-mediated lysis by down-regulating ligands for NK cell activating receptors. To circumvent this resistance, NK cell stimulation is often required to increase the cytotoxic functions of NK cells (Zwirner and Domaica 2010). Interleukin (IL)-2 and IL-15 are the most frequently used cytokines to increase NK cell lytic functions, but their use in clinics is associated with high toxicity and side effects that can dampen the efficacy of NK cell mediated cytotoxicity against cancer (Bluestone 2011, Koreth, Matsuoka et al. 2011). NK cell functions can also be stimulated by low doses of activated dendritic cells (Gerosa, Gobbi et al. 2005). In particular, plasmacytoid dendritic cells (pDC) are an attractive tool to stimulate NK cell functions since this specialized dendritic subset produces high amounts of type I Interferon (IFN) in response to stimulation. Although the role of IFN- $\alpha$  in NK cell stimulation has been well documented, we have recently demonstrated that activated pDC induce a unique NK cell phenotype that could not be reproduced by IFN- $\alpha$  alone (Lelaidier, Diaz-Rodriguez et al. 2015). Following co-culture with Toll-like receptor activated pDC, NK cells up-regulate the expression of TRAIL on their surface and TRAIL-induced apoptosis play a major role in the killing of pediatric acute lymphoblastic leukemia (ALL). We further showed that adoptive transfers of activated pDC are able to control the development of ALL in a preclinical mouse model of human leukemia (Lelaidier, Diaz-Rodriguez et al. 2015). These results therefore revealed the therapeutic potential of activated pDC for innate immune stimulation and cancer immunotherapy.

The principal limitation for the use of activated pDC in clinics is their low frequency in peripheral blood, precluding the isolation of sufficient amounts of cells for patient therapy. However, pDC could be expanded and differentiated *in vitro* from human hematopoietic precursors in presence of fms-like tyrosine kinase receptor 3 ligand (FLT3-L) and thrombopoietin (TPO) (Chen, Antonenko et al. 2004, Charrier, Cordeiro et al. 2014). In addition, recent reports have shown that aryl hydrocarbon receptor (AHR) antagonists favored the differentiation toward the dendritic pathway and increased the numbers of pDC generated from CD34<sup>+</sup> human progenitors (Thordardottir, Hangalapura et al. 2014). Nonetheless, the capacity of these *in vitro* differentiated pDC to increase NK cell functions remains to be determined. We, therefore, aimed to better characterize *in vitro* differentiated pDC obtained in presence of AHR antagonists and in particular, to test whether these pDC could be used to increase NK cell lytic functions against pediatric ALL. Collectively, our results demonstrate that despite phenotypic differences, *in vitro* differentiated pDC are as efficient as peripheral blood pDC to enhance NK cell anti-cancer functions, allowing for the design of novel NK cell-based immunotherapy.



## Materials and Methods

### Cell line

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

### In vitro pDC differentiation from cord blood CD34<sup>+</sup> cells

Human pDCs were expanded and differentiated from purified cord blood-CD34<sup>+</sup> progenitors as described (Charrier, Cordeiro et al. 2014). Briefly, cord blood units were obtained from the CHU Sainte-Justine Research Center cord blood bank with the approval from the Institutional Review Board. Mononuclear cells were isolated by gradient centrifugation using Ficoll-Paque Plus (GE Healthcare Bio-Science AB, Uppsala, Sweden) and CD34<sup>+</sup> cells were positively selected using magnetic beads (Miltenyi Biotec, San Diego, CA). Purified cells were seeded at  $0.2 \times 10^6$ /mL in serum-free expansion medium (StemSpan<sup>TM</sup> SFEM, StemCell Technologies, Vancouver, BC), complemented with recombinant human stem cell factor (10mg/mL), thrombopoietin (TPO) (50mg/mL), FLT3-Ligand (100 ng/mL) (all from R&D System, Minneapolis, MN or Miltenyi Biotec). When required, Ahr antagonists were added: CH223191 (1µM, Sigma, St-Louis, MO) or SR1 (1µM, Selleckchem, Houston, TX). Culture medium was refreshed every 2-3 days and after 7 days of culture, culture medium was replaced by StemSpan medium supplemented with human IL-7 (10 ng/mL, Cytheris, France), TPO, FLT3-L and CH223191 or SR1. Cultures were maintained for 14 days at 37°C in a humidified incubator with 5% CO<sub>2</sub>. *In vitro* differentiated pDC were then purified by flow cytometry after staining with mouse anti-human antibodies (HLA-DR-PE/Cy7 and CD123-APC, BD Biosciences, San Jose, CA) and exclusion of dead cells with Sytox Blue dye. Cell sorting was performed on a FACS Aria (BD Biosciences). Sorted pDC (HLA-DR<sup>+</sup>/CD123<sup>high</sup> Sytox<sup>neg</sup>) were then resuspended in RPMI1640 medium (Wisent) supplemented with 10% of heat-inactivated serum and used for NK cell stimulation experiments.

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

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

### **NK cell stimulation by activated pDC**

Purified NK cells were plated in a 96-well round bottom plate ( $2 \times 10^6$  cells/mL) and *in vitro* differentiated- or adult pDC were added in a NK:pDC ratio of 10:1. pDC were stimulated by adding a TLR-9 ligand (CpG-A ODN2216, 10 $\mu$ g/mL, Invivogen, San Diego, CA) or a TLR-7 ligand (Imiquimod, 0.8 $\mu$ g/mL, Sigma) and NK/pDC co-cultures were incubated overnight at 37°C and 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. Unstimulated NK cells or NK cells cultured with unstimulated pDC were used as negative controls. NK cells stimulated with IFN- $\alpha$  (1000 IU/mL) was used as positive control for each experiment. IFN- $\alpha$  signaling neutralization assays were performed by incubating NK cells and pDC with neutralizing antibodies (anti-IFN- $\alpha/\beta$  receptor chain2 and anti-IFN- $\alpha$ ) (20 $\mu$ g/mL, MMHAR-2 and MMHA-2 respectively, PBL Assay Science, Piscataway, NJ) for 30 min prior to the addition of TLR ligands or IFN- $\alpha$ . Blocking antibodies were kept in culture medium overnight.

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

NK cells activation was analyzed after overnight stimulation with IFN- $\alpha$  or activated pDC. Cells were harvested, washed and then stained with conjugated antibodies: APC-anti-human CD56, PE/Cy5-anti-human CD3 to define NK cell population (CD56<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup>) and FITC-anti-human CD69 and PE-anti-TRAIL. Activated pDC were labelled with anti-human CD123, anti-human HLA-DR, anti-human CD40 and anti-human CD86 (pDC were defined as HLA-DR<sup>+</sup>/CD123<sup>high</sup>). All conjugated antibodies were purchased from BD Biosciences or Biolegend.

Samples were analyzed in a LSR Fortessa cytometer (BD Biosciences, San Jose, CA) and data analysis was performed with FlowJo software version 10 (Tree Star, Ashland, OR).

### **NK cell cytotoxic assays**

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

### **IFN- $\alpha$ and IFN- $\gamma$ dosages using ELISA**

For IFN- $\alpha$  dosage, ivD-pDC or PB-pDC were stimulated with ODN CpG 2216 during 24h, in some wells not activated NK cells were added to the culture. For IFN- $\gamma$  dosage, NK cell were stimulated with IFN- $\alpha$  or CpG-activated pDC overnight. Culture supernatants were then collected and stored at -80°C. IFN- $\alpha$  and IFN- $\gamma$  quantification were performed by enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) following the manufacturer indications (PBL InterferonSource, Piscataway, NJ).

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

Purified peripheral blood pDC or ivD-pDC were stimulated with ODN CpG 2216 for 24h. Unstimulated and stimulated cells were harvested and total RNA contents were prepared using Qiagen RNeasy kit according to manufacturers' instructions. Quantitative RT-PCR were performed using QuantiTect Probe PCR Kit. Specific primers and FAM probes for b2microglobulin, IL-29 and IL-28A were purchased from ThermoFischer Scientific (Waltham, MA). For IL-28B, we used custom primers and FAM probe (Fw:CAAAGATGCCTTAGAAGAGTCG, Rv:TCCAGAACCTTCAGCGTCAG FAM probe: GCTGAAGGACTGCAAGTGCCG) (Egli, Santer et al. 2014).

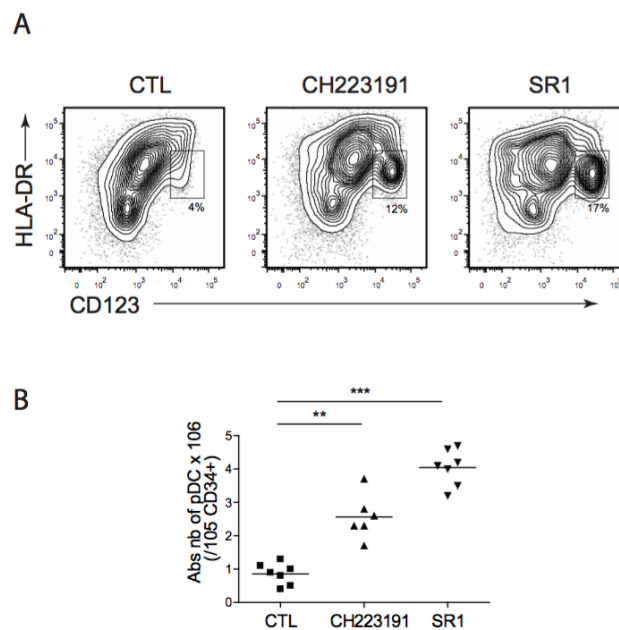
## **Statistics**

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

## Results

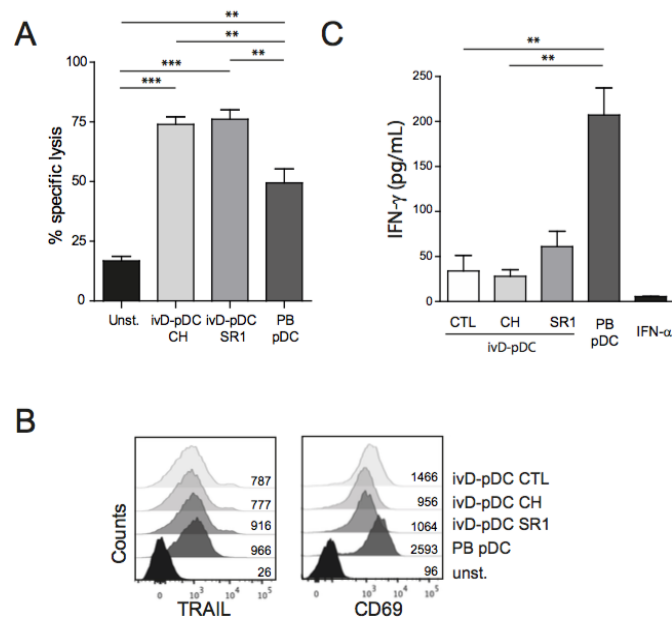
### AHR antagonists increase *in vitro* differentiation of functional plasmacytoid dendritic cells from CD34<sup>+</sup> progenitors

We and others have showed that *in vitro* culture of human CD34<sup>+</sup> progenitors, in presence of Flt3-L and TPO, give rise to fully differentiated pDC (Chen, Antonenko et al. 2004, Charrier, Cordeiro et al. 2012, Lelaidier, Diaz-Rodriguez et al. 2015). It has been further showed that the addition of AHR antagonists favored *in vitro* differentiation of dendritic cells (Liu, Ramachandran et al. 2014, Thordardottir, Hangalapura et al. 2014). Since the use of small molecules to induce differentiation programs may also interfere with the cellular functions of *in vitro* generated cells, we aimed to assess the functional properties of human *in vitro* differentiated pDC (ivD-pDC) obtained in the absence or in presence of AHR antagonists (CH223191 and StemRegenin-1 – SR1). Human CD34<sup>+</sup> progenitors were purified from cord blood samples and cultured for two weeks with or without AHR antagonists, as described previously (Lelaidier, Diaz-Rodriguez et al. 2015). According with previous results, the presence of AHR antagonists increased both percentages and absolute numbers of ivD-pDC in and SR1 was superior to CH223191 to induce pDC differentiation (Figure 1).



**Figure 1. AHR antagonists increase *in vitro* differentiation of pDC from CD34<sup>+</sup> progenitors.** CD34<sup>+</sup> cells isolated from cord blood were cultured with FLT3-ligand, TPO, SCF and AHR antagonists (CH223191 and SR1). Figure shows (A) percent and (B) total number of pDC (HLA-DR<sup>+</sup>CD123<sup>high</sup>) after 14 days of culture.

We next assessed the capacity of ivD-pDC to stimulate NK cell lytic function. IvD-pDC were sorted by flow cytometry according to their surface expression of HLA-DR and CD123. Sorted cells were co-cultured with purified peripheral blood NK cells in the presence of a TLR-9 ligand (A-CpG ODN). Cytotoxic assays against a pre-B ALL cell line using unstimulated NK cells or pDC-activated NK cells revealed that ivD-pDC obtained in the presence of AHR antagonists were able to increase NK cell lytic function to the same extent as activated pDC isolated from peripheral blood (PB pDC) (Figure 2A). This lytic activity was associated with the up-regulation of CD69 and TRAIL on NK cells cultured with activated ivD-pDC (Figure 2B), as we previously demonstrated that TRAIL plays an important role in pre-B ALL lysis by activated NK cells (Lelaidier, Diaz-Rodriguez et al. 2015). The production of IFN- $\gamma$  by NK cells stimulated with ivD-pDC was, however, 4-5 fold lower than by NK cells stimulated with pDC isolated from peripheral blood (Figure 2C). Taken together, these results indicate that ivD-pDC are as potent as peripheral blood pDC to induce NK cell lytic function, but induce less IFN- $\gamma$  production.

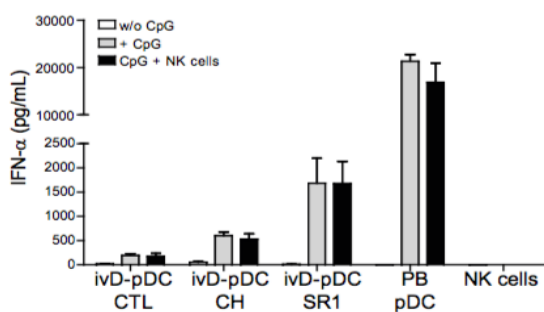


**Figure 2. Differentiation of pDC in the presence of AHR antagonists increase their functional activities after TLR stimulation.** pDC obtained from culture of CD34<sup>+</sup> progenitors with AHR antagonists (CH and SR1) and PB-pDC were isolated, stimulated with TLR-9 ligand (CpG-A ODN2216) and then co-cultured with isolated NK cells. A. Activated NK cells were co-cultured during 2h with target cells, REH-GFP, and specific lysis were analyzed by flow cytometry. B. Activation marker, CD69 and TRAIL, were analyzed by Flow cytometry in NK cells stimulated by TLR-9 activated pDC (ivD-pDC (CH and SR1) and PB-pDC). C. NK secretion of IFN- $\gamma$  were measured by ELISA in NK cells stimulated by TLR-9 activated pDC (ivD-pDC (CH and SR1) and PB-pDC). \*\*p<0.01, \*\*\* p<0.001

**IvD-pDC produce lower amount of IFN- $\alpha$  than peripheral blood pDC, but produce comparable amounts of IFN- $\lambda$**

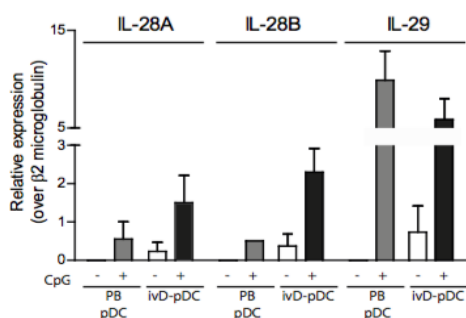
We next assessed the production of IFN- $\alpha$  in response to TLR-9 stimulation of ivD-pDC. We observed that although ivD-pDC produced appreciable amounts of IFN- $\alpha$  (up to 2000 pg/mL for 40 000 pDCs), these amounts were about 10 fold lower than IFN- $\alpha$  produced by freshly isolated pDC from peripheral blood (Figure 3A). The presence of NK cells in pDC culture did not increase the production of IFN- $\alpha$  by either ivD- or peripheral blood pDC. Of note, ivD-pDC obtained in presence of AHR antagonists produced higher amounts of IFN- $\alpha$  than ivD-pDC obtained in the absence of inhibitors, and SR-1 was superior to CH223191. These results indicate that the cytotoxic activity of pDC-activated NK cells against ALL cells (Figure 2A) does not correlate with the amount of IFN- $\alpha$  produced by activated pDC in NK/pDC co-culture. We next explored the production of IFN- $\lambda$  (IL-28A, IL-28B and IL-29) by activated ivD-pDC and found no significant differences between ivD-pDC and peripheral blood pDC (Figure 3B).

**A**



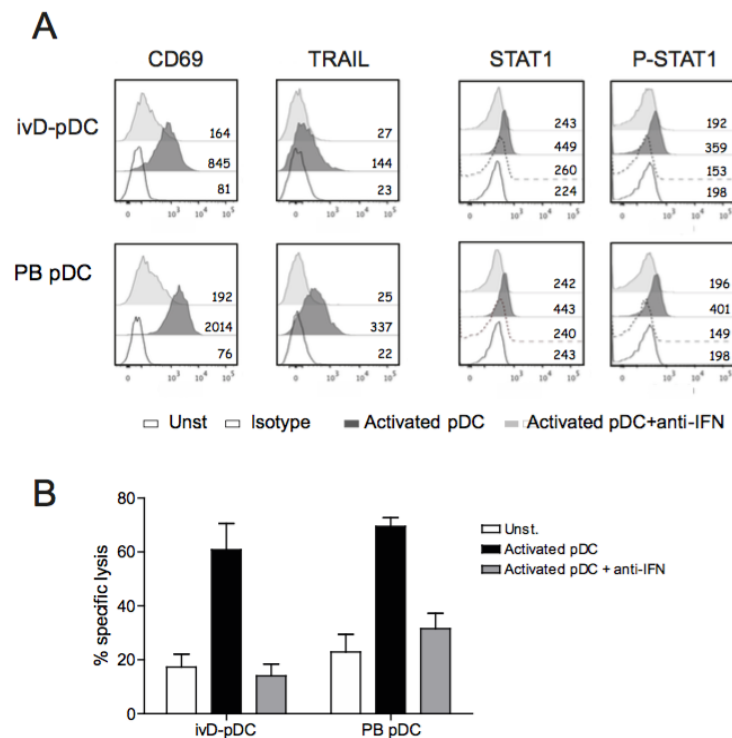
**Figure 3. IvD-pDC produce lower amount of IFN- $\alpha$  than peripheral blood pDC, but produce comparable amounts of IFN- $\lambda$ .** pDC obtained from culture of CD34+ progenitors with AHR antagonists (CH and SR1) and PB-pDC were isolated and stimulated with TLR-9 ligand (CpG-A ODN2216). A. IFN- $\alpha$  secreted by pDC was measured by ELISA. B. Relative expression of IL-28A, IL-28B and IL-29 were analyzed by RT-PCR.

**B**



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

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

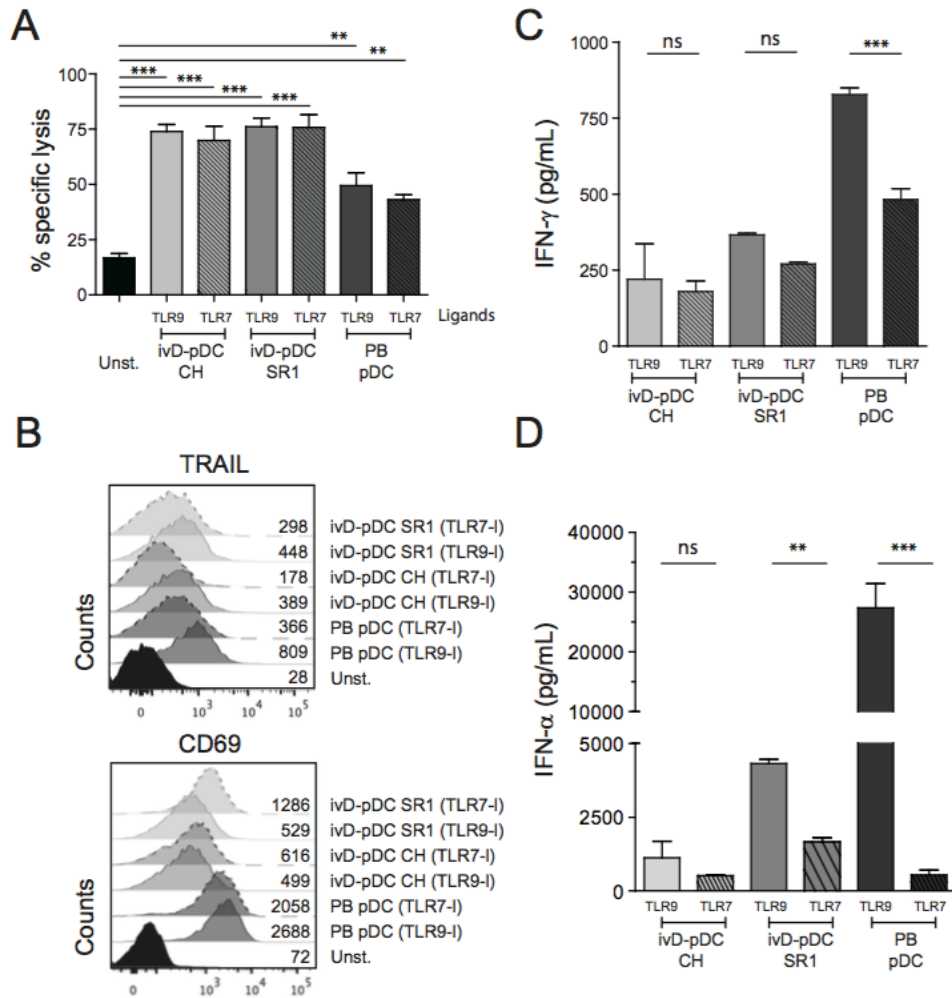


**Figure 4. IFN- $\alpha$  signaling is required for NK cell stimulation by ivD-pDC.** TLR-9 activated pDC were co-cultured with NK cells in the presence or absence of neutralizing antibodies (anti-IFN- $\alpha/\beta$  receptor chain2 and anti IFN- $\alpha$ ). A. NK activation marker (CD69 and TRAIL) and STAT phosphorylation were measured by flow cytometry. B. NK cell specific lysis of REH-GFP target cells



### **TLR-7 and TLR-9 ligands are equally efficient to stimulate ivD-pDC and to increase NK cell lytic functions**

We then explored whether similar NK cell lytic activity could be obtained following co-culture with ivD-pDC stimulated with TLR-7 or TLR-9 ligands. As assessed by cytotoxic assays against a pre-B ALL cell line, we did not observe any difference in the cytolytic activity of NK cells stimulated with TLR-7- or TLR-9-activated ivD-pDC or by TLR-7- or TLR-9-activated peripheral blood pDC (Figure 5A). However, TRAIL up-regulation was consistently lower on NK cells co-cultured with TLR-7-activated pDC, while CD69 up-regulation was higher on activated NK cells co-cultured with TLR-7-activated pDC (Figure 5B). Although, the production of IFN- $\gamma$  by activated NK cells was lower for NK cells co-cultured with TLR-7-activated peripheral blood pDC as compared with TLR-9-activated peripheral blood pDC, we did not observe this difference with ivD-pDC-stimulated NK cells (Figure 5C). Finally, we observed lower amounts of IFN- $\alpha$  produced by TLR-7-activated pDC than observed in TLR-9-activated pDC (Figure 5D). Taken together these results indicate that despite phenotypic differences between NK cells stimulated with TLR-7- or TLR-9-activated pDC, either TLR-7 and TLR-9 ligands could be used to stimulate ivD-pDC and increase NK cell lytic activity against ALL cells.



**Figure 5. TLR-7 and TLR-9 ligands are equally efficient to stimulate ivD-pDC and to increase NK cell lytic functions.** Iv-pDC stimulated with Imiquimod (TLR-7 ligand) or CpG-ODN2216 (TLR-9 ligand) were co-cultured with NK cells. NK cells specific lysis of REH-GFP cell line (A), activation markers (CD69 and TRAIL) (B), NK IFN $\gamma$  secretion (C) and stimulated pDC IFN $\alpha$  secretion (D) were measured. \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001

## Discussion

Our study reveals that TLR-activated ivD-pDC are as efficient as peripheral blood pDC to induce anti-leukemia activity of NK cells despite some phenotypic differences. Furthermore, clinically relevant numbers of ivD-pDC are obtained from cord blood CD34<sup>+</sup> progenitor cultures in the presence of AHR antagonists. These results open therefore new therapeutic options for anti-leukemia immunotherapy.

Despite many attempts to intensify therapy, the outcome for relapsed ALL has not significantly improved over the last 2 decades creating an urgent need for novel approaches to prevent relapse. The present therapy to cure relapsing ALL patients is hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) which combine the effects of conditioning, chemotherapy or radiotherapy, with the immunological reject of leukemia (GvL effect) (Pui and Evans 2006, Rocha, Kabbara et al. 2009, Ko, Ji et al. 2010, Locatelli, Schrappe et al. 2012, Ruggeri, Michel et al. 2012, Zhang, Davies et al. 2012). One of the most promising therapeutic avenue to prevent relapse is to re-enforce the GvL effect by harnessing donor-derived immune system. Since functional NK cells reappear 1 month after HSCT, these effectors are an attractive tool to fight residual leukemia early after transplant (Szabolcs and Niedzwiecki 2008, Beziat, Nguyen et al. 2009, Foley, Cooley et al. 2011, Charrier, Cordeiro et al. 2013). However, when no activated NK cells are used to kill ALL cell, no lysis is observed indicating that only pre-activated NK cells are able to overcome the ALL resistant to NK lysis. This observation suggest that post-transplant NK cell stimulation is required to increase the GvL effect and improve patient outcome. We have recently revealed that co-culture of resting NK cells with TLR-activated pDC induced a unique NK cell phenotype and improved NK cell-mediated killing of ALL cells. We further demonstrated that adoptive transfers of activated pDC controlled the development of human ALL in humanized mice (Lelaidier, Diaz-Rodriguez et al. 2015). These findings therefore open new therapeutic options for children with refractory ALL. However, the translation from humanized mice to patients requires large-scale production of human pDC.

pDC is a specialized DC subset present in peripheral blood and lymphoid organs that originates from hematopoietic stem cells via intermediate lymphoid or myeloid progenitors. The low frequency of pDC in the peripheral blood limits their direct purification from

volunteers for therapeutic use (Onai, Kurabayashi et al. 2013). That's why the development of a new method to efficiently generate large numbers of pDC from a limited number of CD34(+) progenitors need to be development. Recent knowledge on DC development and improvement of *in vitro* hematopoietic progenitor expansion techniques has enhanced the purification of human pDC.

The use of CD34+ progenitors from cord blood to differentiate into pDC has been assessed by us and others (Demoulin, Roncarati et al. 2012). CD34+ from cord blood has different advantage compare with peripheral blood a) high number of CD34+ cells which exceeds that of adult bone marrow, b) human stem cells (HSCs) present in cord blood are more primitive than their counterparts in bone marrow or peripheral blood with high proliferation rate (Hordyjewska, Popiolek et al. 2015), c) are easier to obtain and have no medical risk, d) do not require a perfect match which increase the chance to find a suitable donor, e) is associated with lower incidence of graft versus host disease (GvHD) and with lower risk of viral infections. For the differentiation of CD34+ preogenitors into pDC different molecules, as FLT3 and TPO, had shown to increase the number of these cells. (Maraskovsky, Daro et al. 2000, McKenna, Stocking et al. 2000, Pulendran, Banchereau et al. 2000, Waskow, Liu et al. 2008, Onai, Kurabayashi et al. 2013) (Blom, Ho et al. 2000). (Chen, Antonenko et al. 2004). Recently, the use of small molecules for the expansion of human hematopoietic progenitors has revealed that AHR inhibitors induces not only stem cell expansion but also favors dendritic differentiation and functions (Boitano, Wang et al. 2010, Thordardottir, Hangalapura et al. 2014). In this study, we showed that the addition of AHR inhibitors, SR1 or CH223191, to the CD34+ culture improved the quantity of pDC cells which will permit it use in patients. We therefore aimed to validate whether ivD-pDC expanded in these conditions display the same functional properties as peripheral blood pDC when activated with TLR agonist. Interestingly, we assessed for the first time their capacity to induce robust NK cell activation and NK cell mediated lysis of ALL cells. We report here that despite lower production of IFN- $\alpha$ , activated ivD-pDC are as efficient as peripheral blood pDC to induce NK cell activation and increase their cytotoxic activity against ALL cells. Our results are consistent with those reported by Thordardottir et al. showing that  $10^5$  iv-pDC produce about 2 ng of IFN- $\alpha$  (Thordardottir, Hangalapura et al. 2014). The fact that IFN- $\alpha$  stimulation of NK is essential

but not sufficient to activate NK suggest that other signals should be involved in the NK activation by pDC. We further show that TLR stimulation of ivD-pDC induced IL-28A/B and IL-29 production suggesting that IFN- $\lambda$  may participate to the pDC-induced NK cell stimulation. This result underscore the important role of IFN- $\lambda$  in NK cell anti-tumoral functions that has been recently uncovered by the study of IFN- $\lambda$  receptor knockout mice (Souza-Fonseca-Guimaraes, Young et al. 2015). Other authors has also reported that activation of pDC by their TLR7 and TLR9 stimulate the production of IFN- $\lambda$ . The IFN- $\lambda$  alters the expression of costimulatory molecules as CD80, CD83 and ICOS-L and stimulate the production of IL-13, IFN- $\gamma$  and IL-10 (Megjugorac, Gallagher et al. 2009). In addition, it was demonstrated that treatment of pDC with exogenous IFN- $\lambda$  increased expression of IFN- $\lambda$  and IFN- $\alpha$  which results in an inhibition of dexamethasone-induced apoptosis of pDC suggesting that IFN- $\lambda$  give an autocrine signal to strengthen the antiviral response of pDC (Yin, Dai et al. 2012). Further investigations are nonetheless required to define which are the mediators secreted by activated ivD-pDC that are responsible for increased NK cell cytotoxicity against ALL cells.

Collectively, our results open the way to clinical grade production of human pDC for therapeutic use. Our serum-free culture conditions will be easily compatible with GMP standards offering the opportunity to produce sufficient amounts of cells to infuse in patients. This novel immunotherapeutic approach, based on early post-transplant NK cell stimulation has the potential to eradicate the residual leukemic cells and prevent leukemia relapse of children with high risk leukemia as well as other types of cancers.

## REFERENCE

- Beziat, V., S. Nguyen, S. Lapusan, B. Hervier, N. Dhedin, D. Bories, M. Uzunov, A. Boudifa, H. Trebeden-Negre, F. Norol, Z. Marjanovic, J. P. Marie, J. P. Vernant, P. Debre, B. Rio and V. Vieillard (2009). "Fully functional NK cells after unrelated cord blood transplantation." Leukemia **23**(4): 721-728.
- Blom, B., S. Ho, S. Antonenko and Y. J. Liu (2000). "Generation of interferon alpha-producing dendritic cell (Pre-DC)2 from human CD34(+) hematopoietic stem cells." J Exp Med **192**(12): 1785-1796.
- Bluestone, J. A. (2011). "The yin and yang of interleukin-2-mediated immunotherapy." N Engl J Med **365**(22): 2129-2131.
- Boitano, A. E., J. Wang, R. Romeo, L. C. Bouchez, A. E. Parker, S. E. Sutton, J. R. Walker, C. A. Flaveny, G. H. Perdew, M. S. Denison, P. G. Schultz and M. P. Cooke (2010). "Aryl hydrocarbon receptor antagonists promote the expansion of human hematopoietic stem cells." Science **329**(5997): 1345-1348.
- Charrier, E., P. Cordeiro, R. M. Brito, M. Harnois, S. Mezziani, S. Herblot, F. Le Deist and M. Duval (2014). "Impaired interferon-alpha production by plasmacytoid dendritic cells after cord blood transplantation in children: implication for post-transplantation toll-like receptor ligand-based immunotherapy." Biol Blood Marrow Transplant **20**(10): 1501-1507.
- Charrier, E., P. Cordeiro, R. M. Brito, S. Mezziani, S. Herblot, F. Le Deist and M. Duval (2013). "Reconstitution of maturing and regulatory lymphocyte subsets after cord blood and BMT in children." Bone Marrow Transplant **48**(3): 376-382.
- Charrier, E., P. Cordeiro, M. Cordeau, R. Dardari, A. Michaud, M. Harnois, N. Merindol, S. Herblot and M. Duval (2012). "Post-transcriptional down-regulation of Toll-like receptor signaling pathway in umbilical cord blood plasmacytoid dendritic cells." Cell Immunol **276**(1-2): 114-121.
- Chen, W., S. Antonenko, J. M. Sederstrom, X. Liang, A. S. Chan, H. Kanzler, B. Blom, B. R. Blazar and Y. J. Liu (2004). "Thrombopoietin cooperates with FLT3-ligand in the generation of plasmacytoid dendritic cell precursors from human hematopoietic progenitors." Blood **103**(7): 2547-2553.
- Demoulin, S., P. Roncarati, P. Delvenne and P. Hubert (2012). "Production of large numbers of plasmacytoid dendritic cells with functional activities from CD34(+) hematopoietic progenitor cells: use of interleukin-3." Exp Hematol **40**(4): 268-278.
- Egli, A., D. M. Santer, D. O'Shea, K. Barakat, M. Syedbasha, M. Vollmer, A. Baluch, R. Bhat, J. Groenendyk, M. A. Joyce, L. F. Lisboa, B. S. Thomas, M. Battegay, N. Khanna, T. Mueller, D. L. Tyrrell, M. Houghton, A. Humar and D. Kumar (2014). "IL-28B is a key regulator of B- and T-cell vaccine responses against influenza." PLoS Pathog **10**(12): e1004556.
- Foley, B., S. Cooley, M. R. Verneris, J. Curtisinger, X. Luo, E. K. Waller, D. J. Weisdorf and J. S. Miller (2011). "NK cell education after allogeneic transplantation: dissociation between recovery of cytokine-producing and cytotoxic functions." Blood **118**(10): 2784-2792.
- Gerosa, F., A. Gobbi, P. Zorzi, S. Burg, F. Briere, G. Carra and G. Trinchieri (2005). "The reciprocal interaction of NK cells with plasmacytoid or myeloid dendritic cells profoundly affects innate resistance functions." J Immunol **174**(2): 727-734.
- Hordyjewska, A., L. Popiolek and A. Horecka (2015). "Characteristics of hematopoietic stem cells of umbilical cord blood." Cytotechnology **67**(3): 387-396.

Ko, R. H., L. Ji, P. Barnette, B. Bostrom, R. Hutchinson, E. Raetz, N. L. Seibel, C. J. Twist, E. Eckroth, R. Sposto, P. S. Gaynon and M. L. Loh (2010). "Outcome of patients treated for relapsed or refractory acute lymphoblastic leukemia: a Therapeutic Advances in Childhood Leukemia Consortium study." *J Clin Oncol* **28**(4): 648-654.

Koreth, J., K. Matsuoka, H. T. Kim, S. M. McDonough, B. Bindra, E. P. Alyea, 3rd, P. Armand, C. Cutler, V. T. Ho, N. S. Treister, D. C. Bienfang, S. Prasad, D. Tzachanis, R. M. Joyce, D. E. Avigan, J. H. Antin, J. Ritz and R. J. Soiffer (2011). "Interleukin-2 and regulatory T cells in graft-versus-host disease." *N Engl J Med* **365**(22): 2055-2066.

Lelaidier, M., Y. Diaz-Rodriguez, M. Cordeau, P. Cordeiro, E. Haddad, S. Herblot and M. Duval (2015). "TRAIL-mediated killing of acute lymphoblastic leukemia by plasmacytoid dendritic cell-activated natural killer cells." *Oncotarget* **6**(30): 29440-29455.

Liu, H., I. Ramachandran and D. I. Gabrilovich (2014). "Regulation of plasmacytoid dendritic cell development in mice by aryl hydrocarbon receptor." *Immunol Cell Biol* **92**(2): 200-203.

Locatelli, F., M. Schrappe, M. E. Bernardo and S. Rutella (2012). "How I treat relapsed childhood acute lymphoblastic leukemia." *Blood*.

Maraskovsky, E., E. Daro, E. Roux, M. Teepe, C. R. Maliszewski, J. Hoek, D. Caron, M. E. Lebsack and H. J. McKenna (2000). "In vivo generation of human dendritic cell subsets by Flt3 ligand." *Blood* **96**(3): 878-884.

McKenna, H. J., K. L. Stocking, R. E. Miller, K. Brasel, T. De Smedt, E. Maraskovsky, C. R. Maliszewski, D. H. Lynch, J. Smith, B. Pulendran, E. R. Roux, M. Teepe, S. D. Lyman and J. J. Peschon (2000). "Mice lacking flt3 ligand have deficient hematopoiesis affecting hematopoietic progenitor cells, dendritic cells, and natural killer cells." *Blood* **95**(11): 3489-3497.

Megjugorac, N. J., G. E. Gallagher and G. Gallagher (2009). "Modulation of human plasmacytoid DC function by IFN-lambda1 (IL-29)." *J Leukoc Biol* **86**(6): 1359-1363.

Miller, J. S. (2013). "Therapeutic applications: natural killer cells in the clinic." *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* **2013**: 247-253.

Onai, N., K. Kurabayashi, M. Hosoi-Amaike, N. Toyama-Sorimachi, K. Matsushima, K. Inaba and T. Ohteki (2013). "A clonogenic progenitor with prominent plasmacytoid dendritic cell developmental potential." *Immunity* **38**(5): 943-957.

Pui, C. H. and W. E. Evans (2006). "Treatment of acute lymphoblastic leukemia." *N Engl J Med* **354**(2): 166-178.

Pulendran, B., J. Banchereau, S. Burkeholder, E. Kraus, E. Guinet, C. Chalouni, D. Caron, C. Maliszewski, J. Davoust, J. Fay and K. Palucka (2000). "Flt3-ligand and granulocyte colony-stimulating factor mobilize distinct human dendritic cell subsets in vivo." *J Immunol* **165**(1): 566-572.

Rezvani, K. and R. H. Rouse (2015). "The Application of Natural Killer Cell Immunotherapy for the Treatment of Cancer." *Front Immunol* **6**: 578.

Rocha, V., N. Kabbara, I. Ionescu, A. Ruggeri, D. Purtill and E. Gluckman (2009). "Pediatric related and unrelated cord blood transplantation for malignant diseases." *Bone Marrow Transplant* **44**(10): 653-659.

Ruggeri, A., G. Michel, J. H. Dalle, M. Caniglia, F. Locatelli, A. Campos, C. D. de Heredia, M. Mohty, J. M. Hurtado, M. Bierings, H. Bittencourt, M. Mauad, D. Purtill, R. Cunha, N. Kabbara, E. Gluckman, M. Labopin, C. Peters and V. Rocha (2012). "Impact of pretransplant minimal residual disease after cord blood transplantation for childhood acute lymphoblastic leukemia in remission: an Eurocord, PDWP-EBMT analysis." *Leukemia*.

Souza-Fonseca-Guimaraes, F., A. Young, D. Mittal, L. Martinet, C. Bruedigam, K. Takeda, C. E. Andoniou, M. A. Degli-Esposti, G. R. Hill and M. J. Smyth (2015). "NK cells require IL-28R for optimal in vivo activity." Proc Natl Acad Sci U S A **112**(18): E2376-2384.

Szabolcs, P. and D. Niedzwiecki (2008). "Immune reconstitution in children after unrelated cord blood transplantation." Biol Blood Marrow Transplant **14**(1 Suppl 1): 66-72.

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

Vivier, E. and S. Ugolini (2011). "Natural killer cells: from basic research to treatments." Front Immunol **2**: 18.

Waskow, C., K. Liu, G. Darrasse-Jeze, P. Guermonprez, F. Ginhoux, M. Merad, T. Shengelia, K. Yao and M. Nussenzweig (2008). "The receptor tyrosine kinase Flt3 is required for dendritic cell development in peripheral lymphoid tissues." Nat Immunol **9**(6): 676-683.

Yin, Z., J. Dai, J. Deng, F. Sheikh, M. Natalia, T. Shih, A. Lewis-Antes, S. B. Amrute, U. Garrigues, S. Doyle, R. P. Donnelly, S. V. Kotenko and P. Fitzgerald-Bocarsly (2012). "Type III IFNs are produced by and stimulate human plasmacytoid dendritic cells." J Immunol **189**(6): 2735-2745.

Zhang, M. J., S. M. Davies, B. M. Camitta, B. Logan, K. Tiedemann and M. Eapen (2012). "Comparison of Outcomes after HLA-Matched Sibling and Unrelated Donor Transplantation for Children with High-Risk Acute Lymphoblastic Leukemia." Biol Blood Marrow Transplant **18**(8): 1204-1210.

Zwirner, N. W. and C. I. Domaica (2010). "Cytokine regulation of natural killer cell effector functions." Biofactors **36**(4): 274-288.



## **CONCLUSION**

## Conclusion

Notre étude permet d'établir les bases nécessaires pour l'utilisation des pDC générées *in vitro* comme agent immuno-thérapeutique dans la lutte contre le cancer. Nous avons démontré que l'utilisation d'antagonistes de l'AhR augmente le nombre de pDC générées *in vitro* à partir des progéniteurs hématopoïétiques, permettant d'obtenir les quantités requises pour utilisation en clinique. De plus, nous montrons que, malgré des différences phénotypiques avec les pDC du sang périphérique, les pDC générées *in vitro* stimulent les fonctions cytolytiques des cellules NK vis-à-vis des cellules leucémiques. Nous montrons également que des ligands des TLR7 ou TLR9 peuvent être utilisés pour obtenir cet effet.

Dans cette étude nous utilisons comme modèle la leucémie aigüe lymphoïde (LAL) car c'est une maladie dont taux de mortalité après rechute n'a pas diminué dans les deux dernières décennies. Pour les patients atteints de LAL réfractaire aux traitements de chimiothérapie ou en rechute, la transplantation des cellules souches hématopoïétiques (TCSH) est la meilleur alternative thérapeutique. L'efficacité de la TCSH repose sur les effets combinés d'une chimiothérapie agressive, qui détruit une grande partie des cellules leucémiques et de l'élimination des cellules leucémiques résiduelles par le système immunitaire qui se reconstitue à partir des cellules souches du donneur, appelé l'effet GvL (graft versus leukemia) (Rocha, Gluckman et al. 2009). Afin d'éviter la rechute, une stratégie prometteuse est le renforcement de l'effet GvL. Les cellules NK sont les premiers effecteurs du système immunitaire à apparaître dans les premiers mois post-greffe (Szabolcs and Niedzwiecki 2008, Foley, Cooley et al. 2011, Charrier, Cordeiro et al. 2013). Ces cellules jouent donc un rôle important dans l'effet GvL très tôt après la greffe, lorsque la maladie résiduelle est la plus faible. Cependant, les LAL sont généralement résistantes à l'action des cellules NK. La stimulation des cellules NK est nécessaire pour vaincre cette résistance. Nous avons démontré que la stimulation des cellules NK par des pDC activées augmente leurs capacités cytolytiques vis-à-vis des LAL. De plus, le transfert adoptif des pDC activées est capable de contrôler le développement de la leucémie dans un modèle de souris humanisées (Lelaidier, Diaz-Rodriguez et al. 2015). Ces résultats démontrent que le transfert adoptif de pDC est une nouvelle stratégie thérapeutique pour les patients atteints de LAL réfractaire au traitement de

chimiothérapie ou en rechute. Cependant, cette approche est limitée par le faible nombre de pDC que l'on peut isoler à partir du sang périphérique. L'utilisation de la méthode d'expansion et de différenciation décrite dans notre étude permet d'adresser cette limite et de rendre disponible cette approche pour les patients atteints de LAL.

En résumé, nos résultats serviront de base à l'établissement d'une méthode de production de pDC pour usage thérapeutique à partir des cellules CD34<sup>+</sup> de sang de cordon. Les prochaines étapes sont l'établissement des conditions de culture, de sélection des pDC après différenciation et d'activation des pDC aux normes Good Manufacturing Procedure (GMP). Ces travaux seront effectués en collaboration avec le Centre d'Excellence en Thérapie Cellulaire de l'hôpital Maisonneuve-Rosemont. A moyen terme, un nouvel essai clinique basé sur le transfert adoptif de pDC activées sera proposé aux patients atteints de leucémie et à risque de rechute après la TSCH.

## BIBLIOGRAPHIE :

- Adib-Conquy, M., D. Scott-Algara, J. M. Cavaillon and F. Souza-Fonseca-Guimaraes (2014). "TLR-mediated activation of NK cells and their role in bacterial/viral immune responses in mammals." Immunol Cell Biol **92**(3): 256-262.
- Ahonen, C. L., S. J. Gibson, R. M. Smith, L. K. Pederson, J. M. Lindh, M. A. Tomai and J. P. Vasilakos (1999). "Dendritic cell maturation and subsequent enhanced T-cell stimulation induced with the novel synthetic immune response modifier R-848." Cell Immunol **197**(1): 62-72.
- Ames, E. and W. J. Murphy (2014). "Advantages and clinical applications of natural killer cells in cancer immunotherapy." Cancer Immunol Immunother **63**(1): 21-28.
- Ashkenazi, A., R. C. Pai, S. Fong, S. Leung, D. A. Lawrence, S. A. Marsters, C. Blackie, L. Chang, A. E. McMurtrey, A. Hebert, L. DeForge, I. L. Koumenis, D. Lewis, L. Harris, J. Bussiere, H. Koeppen, Z. Shahrokh and R. H. Schwall (1999). "Safety and antitumor activity of recombinant soluble Apo2 ligand." J Clin Invest **104**(2): 155-162.
- Aspord, C., L. Tramcourt, C. Leloup, J. P. Molens, M. T. Leccia, J. Charles and J. Plumas (2014). "Imiquimod inhibits melanoma development by promoting pDC cytotoxic functions and impeding tumor vascularization." J Invest Dermatol **134**(10): 2551-2561.
- Bandyopadhyay, S., B. Perussia, G. Trinchieri, D. S. Miller and S. E. Starr (1986). "Requirement for HLA-DR+ accessory cells in natural killing of cytomegalovirus-infected fibroblasts." J Exp Med **164**(1): 180-195.
- Belting, L., N. Homberg, M. Przewoznik, C. Brenner, T. Riedel, A. Flatley, B. Polic, D. H. Busch, M. Rocken and R. Mocikat (2015). "Critical role of the NKG2D receptor for NK cell-mediated control and immune escape of B-cell lymphoma." Eur J Immunol **45**(9): 2593-2601.
- Beziat, V., S. Nguyen, S. Lapsan, B. Hervier, N. Dhedin, D. Bories, M. Uzunov, A. Boudifa, H. Trebeden-Negre, F. Norol, Z. Marjanovic, J. P. Marie, J. P. Vernant, P. Debre, B. Rio and V. Vieillard (2009). "Fully functional NK cells after unrelated cord blood transplantation." Leukemia **23**(4): 721-728.
- Blake, S. J., K. Stannard, J. Liu, S. Allen, M. C. Yong, D. Mittal, A. R. Aguilera, J. J. Miles, V. P. Lutzky, L. F. de Andrade, L. Martinet, M. Colonna, K. Takeda, F. Kuhnel, E. Gurlevik, G. Bernhardt, M. W. Teng and M. J. Smyth (2016). "Suppression of Metastases Using a New Lymphocyte Checkpoint Target for Cancer Immunotherapy." Cancer Discov **6**(4): 446-459.
- Blom, B., S. Ho, S. Antonenko and Y. J. Liu (2000). "Generation of interferon alpha-producing predendritic cell (Pre-DC)2 from human CD34(+) hematopoietic stem cells." J Exp Med **192**(12): 1785-1796.
- Bluestone, J. A. (2011). "The yin and yang of interleukin-2-mediated immunotherapy." N Engl J Med **365**(22): 2129-2131.
- Boitano, A. E., J. Wang, R. Romeo, L. C. Bouchez, A. E. Parker, S. E. Sutton, J. R. Walker, C. A. Flaveny, G. H. Perdew, M. S. Denison, P. G. Schultz and M. P. Cooke (2010). "Aryl hydrocarbon receptor antagonists promote the expansion of human hematopoietic stem cells." Science **329**(5997): 1345-1348.
- Bottino, C., R. Castriconi, D. Pende, P. Rivera, M. Nanni, B. Carnemolla, C. Cantoni, J. Grassi, S. Marcenaro, N. Reymond, M. Vitale, L. Moretta, M. Lopez and A. Moretta (2003).

"Identification of PVR (CD155) and Nectin-2 (CD112) as cell surface ligands for the human DNAM-1 (CD226) activating molecule." *J Exp Med* **198**(4): 557-567.

Byrd, A., S. C. Hoffmann, M. Jarahian, F. Momburg and C. Watzl (2007). "Expression analysis of the ligands for the Natural Killer cell receptors NKp30 and NKp44." *PLoS One* **2**(12): e1339.

Carotta, S. (2016). "Targeting NK Cells for Anticancer Immunotherapy: Clinical and Preclinical Approaches." *Front Immunol* **7**: 152.

Castriconi, R., A. Dondero, M. V. Corrias, E. Lanino, D. Pende, L. Moretta, C. Bottino and A. Moretta (2004). "Natural killer cell-mediated killing of freshly isolated neuroblastoma cells: critical role of DNAX accessory molecule-1-poliovirus receptor interaction." *Cancer Res* **64**(24): 9180-9184.

Cella, M., F. Facchetti, A. Lanzavecchia and M. Colonna (2000). "Plasmacytoid dendritic cells activated by influenza virus and CD40L drive a potent TH1 polarization." *Nat Immunol* **1**(4): 305-310.

Chan, A., D. L. Hong, A. Atzberger, S. Kollnberger, A. D. Filer, C. D. Buckley, A. McMichael, T. Enver and P. Bowness (2007). "CD56bright human NK cells differentiate into CD56dim cells: role of contact with peripheral fibroblasts." *J Immunol* **179**(1): 89-94.

Chan, C. J., L. Martinet, S. Gilfillan, F. Souza-Fonseca-Guimaraes, M. T. Chow, L. Town, D. S. Ritchie, M. Colonna, D. M. Andrews and M. J. Smyth (2014). "The receptors CD96 and CD226 oppose each other in the regulation of natural killer cell functions." *Nat Immunol* **15**(5): 431-438.

Chan, C. J., M. J. Smyth and L. Martinet (2014). "Molecular mechanisms of natural killer cell activation in response to cellular stress." *Cell Death Differ* **21**(1): 5-14.

Chaperot, L., A. Blum, O. Manches, G. Lui, J. Angel, J. P. Molens and J. Plumaz (2006). "Virus or TLR agonists induce TRAIL-mediated cytotoxic activity of plasmacytoid dendritic cells." *J Immunol* **176**(1): 248-255.

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

Charrier, E., P. Cordeiro, R. M. Brito, S. Mezziani, S. Herblot, F. Le Deist and M. Duval (2013). "Reconstitution of maturing and regulatory lymphocyte subsets after cord blood and BMT in children." *Bone Marrow Transplant* **48**(3): 376-382.

Charrier, E., P. Cordeiro, M. Cordeau, R. Dardari, A. Michaud, M. Harnois, N. Merindol, S. Herblot and M. Duval (2012). "Post-transcriptional down-regulation of Toll-like receptor signaling pathway in umbilical cord blood plasmacytoid dendritic cells." *Cell Immunol* **276**(1-2): 114-121.

Chehimi, J., S. E. Starr, H. Kawashima, D. S. Miller, G. Trinchieri, B. Perussia and S. Bandyopadhyay (1989). "Dendritic cells and IFN-alpha-producing cells are two functionally distinct non-B, non-monocytic HLA-DR+ cell subsets in human peripheral blood." *Immunology* **68**(4): 486-490.

Chen, W., S. Antonenko, J. M. Sederstrom, X. Liang, A. S. Chan, H. Kanzler, B. Blom, B. R. Blazar and Y. J. Liu (2004). "Thrombopoietin cooperates with FLT3-ligand in the generation of plasmacytoid dendritic cell precursors from human hematopoietic progenitors." *Blood* **103**(7): 2547-2553.

Clynes, R. A., T. L. Towers, L. G. Presta and J. V. Ravetch (2000). "Inhibitory Fc receptors modulate in vivo cytotoxicity against tumor targets." *Nat Med* **6**(4): 443-446.

Coca, S., J. Perez-Piqueras, D. Martinez, A. Colmenarejo, M. A. Saez, C. Vallejo, J. A. Martos and M. Moreno (1997). "The prognostic significance of intratumoral natural killer cells in patients with colorectal carcinoma." *Cancer* **79**(12): 2320-2328.

Cooper, M. A., T. A. Fehniger and M. A. Caligiuri (2001). "The biology of human natural killer-cell subsets." *Trends Immunol* **22**(11): 633-640.

Dalod, M., T. Hamilton, R. Salomon, T. P. Salazar-Mather, S. C. Henry, J. D. Hamilton and C. A. Biron (2003). "Dendritic cell responses to early murine cytomegalovirus infection: subset functional specialization and differential regulation by interferon alpha/beta." *J Exp Med* **197**(7): 885-898.

Dalod, M., T. P. Salazar-Mather, L. Malmgaard, C. Lewis, C. Asselin-Paturel, F. Briere, G. Trinchieri and C. A. Biron (2002). "Interferon alpha/beta and interleukin 12 responses to viral infections: pathways regulating dendritic cell cytokine expression in vivo." *J Exp Med* **195**(4): 517-528.

Davis, J. E., M. J. Smyth and J. A. Trapani (2001). "Granzyme A and B-deficient killer lymphocytes are defective in eliciting DNA fragmentation but retain potent in vivo anti-tumor capacity." *Eur J Immunol* **31**(1): 39-47.

Demoulin, S., P. Roncarati, P. Delvenne and P. Hubert (2012). "Production of large numbers of plasmacytoid dendritic cells with functional activities from CD34(+) hematopoietic progenitor cells: use of interleukin-3." *Exp Hematol* **40**(4): 268-278.

Di Domizio, J., A. Blum, M. Gallagher-Gambarelli, J. P. Molens, L. Chaperot and J. Plumas (2009). "TLR7 stimulation in human plasmacytoid dendritic cells leads to the induction of early IFN-inducible genes in the absence of type I IFN." *Blood* **114**(9): 1794-1802.

Diefenbach, A., E. R. Jensen, A. M. Jamieson and D. H. Raulet (2001). "Rae1 and H60 ligands of the NKG2D receptor stimulate tumour immunity." *Nature* **413**(6852): 165-171.

Donnelly, R. P. and S. V. Kotenko (2010). "Interferon-lambda: a new addition to an old family." *J Interferon Cytokine Res* **30**(8): 555-564.

Egli, A., D. M. Santer, D. O'Shea, K. Barakat, M. Syedbasha, M. Vollmer, A. Baluch, R. Bhat, J. Groenendyk, M. A. Joyce, L. F. Lisboa, B. S. Thomas, M. Battegay, N. Khanna, T. Mueller, D. L. Tyrrell, M. Houghton, A. Humar and D. Kumar (2014). "IL-28B is a key regulator of B- and T-cell vaccine responses against influenza." *PLoS Pathog* **10**(12): e1004556.

Eischen, C. M., J. D. Schilling, D. H. Lynch, P. H. Krammer and P. J. Leibson (1996). "Fc receptor-induced expression of Fas ligand on activated NK cells facilitates cell-mediated cytotoxicity and subsequent autocrine NK cell apoptosis." *J Immunol* **156**(8): 2693-2699.

Evdokiou, A., S. Bouralexis, G. J. Atkins, F. Chai, S. Hay, M. Clayer and D. M. Findlay (2002). "Chemotherapeutic agents sensitize osteogenic sarcoma cells, but not normal human bone cells, to Apo2L/TRAIL-induced apoptosis." *Int J Cancer* **99**(4): 491-504.

Facchetti, F., W. Vermi, D. Mason and M. Colonna (2003). "The plasmacytoid monocyte/interferon producing cells." *Virchows Arch* **443**(6): 703-717.

Fauriat, C., E. O. Long, H. G. Ljunggren and Y. T. Bryceson (2010). "Regulation of human NK-cell cytokine and chemokine production by target cell recognition." *Blood* **115**(11): 2167-2176.

Fehniger, T. A., M. A. Cooper, G. J. Nuovo, M. Cella, F. Facchetti, M. Colonna and M. A. Caligiuri (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**(8): 3052-3057.

Ferlazzo, G. and B. Morandi (2014). "Cross-Talks between Natural Killer Cells and Distinct Subsets of Dendritic Cells." *Front Immunol* **5**: 159.

Fiebiger, E., P. Meraner, E. Weber, I. F. Fang, G. Stingl, H. Ploegh and D. Maurer (2001). "Cytokines regulate proteolysis in major histocompatibility complex class II-dependent antigen presentation by dendritic cells." *J Exp Med* **193**(8): 881-892.

Fitzgerald-Bocarsly, P. (1993). "Human natural interferon-alpha producing cells." *Pharmacol Ther* **60**(1): 39-62.

Foley, B., S. Cooley, M. R. Verneris, J. Curtsinger, X. Luo, E. K. Waller, D. J. Weisdorf and J. S. Miller (2011). "NK cell education after allogeneic transplantation: dissociation between recovery of cytokine-producing and cytotoxic functions." *Blood* **118**(10): 2784-2792.

Fonteneau, J. F., M. Gilliet, M. Larsson, I. Dasilva, C. Munz, Y. J. Liu and N. Bhardwaj (2003). "Activation of influenza virus-specific CD4+ and CD8+ T cells: a new role for plasmacytoid dendritic cells in adaptive immunity." *Blood* **101**(9): 3520-3526.

Geiger, T. L. and J. C. Sun (2016). "Development and maturation of natural killer cells." *Curr Opin Immunol* **39**: 82-89.

Gerlini, G., C. Urso, G. Mariotti, P. Di Gennaro, D. Palli, P. Brandani, A. Salvadori, N. Pimpinelli, U. M. Reali and L. Borgognoni (2007). "Plasmacytoid dendritic cells represent a major dendritic cell subset in sentinel lymph nodes of melanoma patients and accumulate in metastatic nodes." *Clin Immunol* **125**(2): 184-193.

Gerosa, F., A. Gobbi, P. Zorzi, S. Burg, F. Briere, G. Carra and G. Trinchieri (2005). "The reciprocal interaction of NK cells with plasmacytoid or myeloid dendritic cells profoundly affects innate resistance functions." *J Immunol* **174**(2): 727-734.

Gibson, S. J., J. M. Lindh, T. R. Riter, R. M. Gleason, L. M. Rogers, A. E. Fuller, J. L. Oesterich, K. B. Gorden, X. Qiu, S. W. McKane, R. J. Noelle, R. L. Miller, R. M. Kedl, P. Fitzgerald-Bocarsly, M. A. Tomai and J. P. Vasilakos (2002). "Plasmacytoid dendritic cells produce cytokines and mature in response to the TLR7 agonists, imiquimod and resiquimod." *Cell Immunol* **218**(1-2): 74-86.

Gilliet, M., A. Boonstra, C. Paturel, S. Antonenko, X. L. Xu, G. Trinchieri, A. O'Garra and Y. J. Liu (2002). "The development of murine plasmacytoid dendritic cell precursors is differentially regulated by FLT3-ligand and granulocyte/macrophage colony-stimulating factor." *J Exp Med* **195**(7): 953-958.

Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2000). "The hallmarks of cancer." *Cell* **100**(1): 57-70.

Hart, O. M., V. Athie-Morales, G. M. O'Connor and C. M. Gardiner (2005). "TLR7/8-mediated activation of human NK cells results in accessory cell-dependent IFN-gamma production." *J Immunol* **175**(3): 1636-1642.

Hassan, H. T. and A. Zander (1996). "Stem cell factor as a survival and growth factor in human normal and malignant hematopoiesis." *Acta Haematol* **95**(3-4): 257-262.

Hayakawa, Y., J. M. Kelly, J. A. Westwood, P. K. Darcy, A. Diefenbach, D. Raulet and M. J. Smyth (2002). "Cutting edge: tumor rejection mediated by NKG2D receptor-ligand interaction is dependent upon perforin." *J Immunol* **169**(10): 5377-5381.

Hemmi, H., T. Kaisho, O. Takeuchi, S. Sato, H. Sanjo, K. Hoshino, T. Horiuchi, H. Tomizawa, K. Takeda and S. Akira (2002). "Small anti-viral compounds activate immune cells via the TLR7 MyD88-dependent signaling pathway." *Nat Immunol* **3**(2): 196-200.

Homberg, J.-C. (1999). *Immunologie Fundamentale*.

Hordyjewska, A., L. Popiolek and A. Horecka (2015). "Characteristics of hematopoietic stem cells of umbilical cord blood." Cytotechnology **67**(3): 387-396.

Huergo-Zapico, L., A. Acebes-Huerta, A. Lopez-Soto, M. Villa-Alvarez, A. P. Gonzalez-Rodriguez and S. Gonzalez (2014). "Molecular Bases for the Regulation of NKG2D Ligands in Cancer." Front Immunol **5**: 106.

Ikeda, H., L. J. Old and R. D. Schreiber (2002). "The roles of IFN gamma in protection against tumor development and cancer immunoediting." Cytokine Growth Factor Rev **13**(2): 95-109.

Imai, K., S. Matsuyama, S. Miyake, K. Suga and K. Nakachi (2000). "Natural cytotoxic activity of peripheral-blood lymphocytes and cancer incidence: an 11-year follow-up study of a general population." Lancet **356**(9244): 1795-1799.

Ishigami, S., S. Natsugoe, K. Tokuda, A. Nakajo, X. Che, H. Iwashige, K. Aridome, S. Hokita and T. Aikou (2000). "Prognostic value of intratumoral natural killer cells in gastric carcinoma." Cancer **88**(3): 577-583.

Ito, T., R. Amakawa, T. Kaisho, H. Hemmi, K. Tajima, K. Uehira, Y. Ozaki, H. Tomizawa, S. Akira and S. Fukuhara (2002). "Interferon-alpha and interleukin-12 are induced differentially by Toll-like receptor 7 ligands in human blood dendritic cell subsets." J Exp Med **195**(11): 1507-1512.

Iversen, M. B. and S. R. Paludan (2010). "Mechanisms of type III interferon expression." J Interferon Cytokine Res **30**(8): 573-578.

Janeway, C. A., Jr. and R. Medzhitov (2002). "Innate immune recognition." Annu Rev Immunol **20**: 197-216.

Jego, G., A. K. Palucka, J. P. Blanck, C. Chalouni, V. Pascual and J. Banchereau (2003). "Plasmacytoid dendritic cells induce plasma cell differentiation through type I interferon and interleukin 6." Immunity **19**(2): 225-234.

Jewell, N. A., T. Cline, S. E. Mertz, S. V. Smirnov, E. Flano, C. Schindler, J. L. Grieves, R. K. Durbin, S. V. Kotenko and J. E. Durbin (2010). "Lambda interferon is the predominant interferon induced by influenza A virus infection in vivo." J Virol **84**(21): 11515-11522.

Kerkmann, M., S. Rothenfusser, V. Hornung, A. Towarowski, M. Wagner, A. Sarris, T. Giese, S. Endres and G. Hartmann (2003). "Activation with CpG-A and CpG-B oligonucleotides reveals two distinct regulatory pathways of type I IFN synthesis in human plasmacytoid dendritic cells." J Immunol **170**(9): 4465-4474.

Ko, R. H., L. Ji, P. Barnette, B. Bostrom, R. Hutchinson, E. Raetz, N. L. Seibel, C. J. Twist, E. Eckroth, R. Sposto, P. S. Gaynon and M. L. Loh (2010). "Outcome of patients treated for relapsed or refractory acute lymphoblastic leukemia: a Therapeutic Advances in Childhood Leukemia Consortium study." J Clin Oncol **28**(4): 648-654.

Koreth, J., K. Matsuoka, H. T. Kim, S. M. McDonough, B. Bindra, E. P. Alyea, 3rd, P. Armand, C. Cutler, V. T. Ho, N. S. Treister, D. C. Bienfang, S. Prasad, D. Tzachanis, R. M. Joyce, D. E. Avigan, J. H. Antin, J. Ritz and R. J. Soiffer (2011). "Interleukin-2 and regulatory T cells in graft-versus-host disease." N Engl J Med **365**(22): 2055-2066.

Kotenko, S. V., G. Gallagher, V. V. Baurin, A. Lewis-Antes, M. Shen, N. K. Shah, J. A. Langer, F. Sheikh, H. Dickensheets and R. P. Donnelly (2003). "IFN-lambdas mediate antiviral protection through a distinct class II cytokine receptor complex." Nat Immunol **4**(1): 69-77.

Kothny-Wilkes, G., D. Kulms, B. Poppelmann, T. A. Luger, M. Kubin and T. Schwarz (1998). "Interleukin-1 protects transformed keratinocytes from tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand." J Biol Chem **273**(44): 29247-29253.



Krug, A., G. D. Luker, W. Barchet, D. A. Leib, S. Akira and M. Colonna (2004). "Herpes simplex virus type 1 activates murine natural interferon-producing cells through toll-like receptor 9." *Blood* **103**(4): 1433-1437.

Krug, A., S. Rothenfusser, V. Hornung, B. Jahrsdorfer, S. Blackwell, Z. K. Ballas, S. Endres, A. M. Krieg and G. Hartmann (2001). "Identification of CpG oligonucleotide sequences with high induction of IFN-alpha/beta in plasmacytoid dendritic cells." *Eur J Immunol* **31**(7): 2154-2163.

Krug, A., A. Towarowski, S. Britsch, S. Rothenfusser, V. Hornung, R. Bals, T. Giese, H. Engelmann, S. Endres, A. M. Krieg and G. Hartmann (2001). "Toll-like receptor expression reveals CpG DNA as a unique microbial stimulus for plasmacytoid dendritic cells which synergizes with CD40 ligand to induce high amounts of IL-12." *Eur J Immunol* **31**(10): 3026-3037.

Kruse, P. H., J. Matta, S. Ugolini and E. Vivier (2014). "Natural cytotoxicity receptors and their ligands." *Immunol Cell Biol* **92**(3): 221-229.

Langenkamp, A., K. Nagata, K. Murphy, L. Wu, A. Lanzavecchia and F. Sallusto (2003). "Kinetics and expression patterns of chemokine receptors in human CD4+ T lymphocytes primed by myeloid or plasmacytoid dendritic cells." *Eur J Immunol* **33**(2): 474-482.

Lanier, L. L., A. M. Le, C. I. Civin, M. R. Loken and J. H. Phillips (1986). "The relationship of CD16 (Leu-11) and Leu-19 (NKH-1) antigen expression on human peripheral blood NK cells and cytotoxic T lymphocytes." *J Immunol* **136**(12): 4480-4486.

Le Mercier, I., D. Poujol, A. Sanlaville, V. Sisirak, M. Gobert, I. Durand, B. Dubois, I. Treilleux, J. Marvel, J. Vlach, J. Y. Blay, N. Bendriss-Vermare, C. Caux, I. Puisieux and N. Goutagny (2013). "Tumor promotion by intratumoral plasmacytoid dendritic cells is reversed by TLR7 ligand treatment." *Cancer Res* **73**(15): 4629-4640.

Lelaidier, M., Y. Diaz-Rodriguez, M. Cordeau, P. Cordeiro, E. Haddad, S. Herblot and M. Duval (2015). "TRAIL-mediated killing of acute lymphoblastic leukemia by plasmacytoid dendritic cell-activated natural killer cells." *Oncotarget* **6**(30): 29440-29455.

Liang, S., H. Wei, R. Sun and Z. Tian (2003). "IFNalpha regulates NK cell cytotoxicity through STAT1 pathway." *Cytokine* **23**(6): 190-199.

Liao, T., A. M. Kaufmann, X. Qian, V. Sangvatanakul, C. Chen, T. Kube, G. Zhang and A. E. Albers (2013). "Susceptibility to cytotoxic T cell lysis of cancer stem cells derived from cervical and head and neck tumor cell lines." *J Cancer Res Clin Oncol* **139**(1): 159-170.

Liu, C., Y. Lou, G. Lizee, H. Qin, S. Liu, B. Rabinovich, G. J. Kim, Y. H. Wang, Y. Ye, A. G. Sikora, W. W. Overwijk, Y. J. Liu, G. Wang and P. Hwu (2008). "Plasmacytoid dendritic cells induce NK cell-dependent, tumor antigen-specific T cell cross-priming and tumor regression in mice." *J Clin Invest* **118**(3): 1165-1175.

Liu, H., I. Ramachandran and D. I. Gabrilovich (2014). "Regulation of plasmacytoid dendritic cell development in mice by aryl hydrocarbon receptor." *Immunol Cell Biol* **92**(2): 200-203.

Locatelli, F., M. Schrappe, M. E. Bernardo and S. Rutella (2012). "How I treat relapsed childhood acute lymphoblastic leukemia." *Blood*.

Lodoen, M. B. and L. L. Lanier (2006). "Natural killer cells as an initial defense against pathogens." *Curr Opin Immunol* **18**(4): 391-398.

Lombardi, V. C., S. F. Khaiboullina and A. A. Rizvanov (2015). "Plasmacytoid dendritic cells, a role in neoplastic prevention and progression." *Eur J Clin Invest* **45** *Suppl 1*: 1-8.

Long, E. O., H. S. Kim, D. Liu, M. E. Peterson and S. Rajagopalan (2013). "Controlling natural killer cell responses: integration of signals for activation and inhibition." Annu Rev Immunol **31**: 227-258.

Lundqvist, A., S. I. Abrams, D. S. Schrupp, G. Alvarez, D. Suffredini, M. Berg and R. Childs (2006). "Bortezomib and depsipeptide sensitize tumors to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand: a novel method to potentiate natural killer cell tumor cytotoxicity." Cancer Res **66**(14): 7317-7325.

MacDonald, K. P., V. Rowe, H. M. Bofinger, R. Thomas, T. Sasmono, D. A. Hume and G. R. Hill (2005). "The colony-stimulating factor 1 receptor is expressed on dendritic cells during differentiation and regulates their expansion." J Immunol **175**(3): 1399-1405.

Mace, E. M., P. Dongre, H. T. Hsu, P. Sinha, A. M. James, S. S. Mann, L. R. Forbes, L. B. Watkin and J. S. Orange (2014). "Cell biological steps and checkpoints in accessing NK cell cytotoxicity." Immunol Cell Biol **92**(3): 245-255.

Maghazachi, A. A. (2010). "Role of chemokines in the biology of natural killer cells." Curr Top Microbiol Immunol **341**: 37-58.

Maraskovsky, E., E. Daro, E. Roux, M. Teepe, C. R. Maliszewski, J. Hoek, D. Caron, M. E. Lebsack and H. J. McKenna (2000). "In vivo generation of human dendritic cell subsets by Flt3 ligand." Blood **96**(3): 878-884.

Martin-Fontecha, A., L. L. Thomsen, S. Brett, C. Gerard, M. Lipp, A. Lanzavecchia and F. Sallusto (2004). "Induced recruitment of NK cells to lymph nodes provides IFN-gamma for T(H)1 priming." Nat Immunol **5**(12): 1260-1265.

Masson, D., A. Jarry, B. Baur, P. Blanchardie, C. Labois, P. Lustenberger and M. G. Denis (2001). "Overexpression of the CD155 gene in human colorectal carcinoma." Gut **49**(2): 236-240.

McKenna, H. J., K. L. Stocking, R. E. Miller, K. Brasel, T. De Smedt, E. Maraskovsky, C. R. Maliszewski, D. H. Lynch, J. Smith, B. Pulendran, E. R. Roux, M. Teepe, S. D. Lyman and J. J. Peschon (2000). "Mice lacking flt3 ligand have deficient hematopoiesis affecting hematopoietic progenitor cells, dendritic cells, and natural killer cells." Blood **95**(11): 3489-3497.

Megjugorac, N. J., G. E. Gallagher and G. Gallagher (2009). "Modulation of human plasmacytoid DC function by IFN-lambda1 (IL-29)." J Leukoc Biol **86**(6): 1359-1363.

Menard, C., J. Y. Blay, C. Borg, S. Michiels, F. Ghiringhelli, C. Robert, C. Nonn, N. Chaput, J. Taieb, N. F. Delahaye, C. Flament, J. F. Emile, A. Le Cesne and L. Zitvogel (2009). "Natural killer cell IFN-gamma levels predict long-term survival with imatinib mesylate therapy in gastrointestinal stromal tumor-bearing patients." Cancer Res **69**(8): 3563-3569.

Merad, M. and M. G. Manz (2009). "Dendritic cell homeostasis." Blood **113**(15): 3418-3427.

Miller, J. S. (2013). "Therapeutic applications: natural killer cells in the clinic." Hematology Am Soc Hematol Educ Program **2013**: 247-253.

Moretta, A., C. Bottino, M. Vitale, D. Pende, C. Cantoni, M. C. Mingari, R. Biassoni and L. Moretta (2001). "Activating receptors and coreceptors involved in human natural killer cell-mediated cytotoxicity." Annu Rev Immunol **19**: 197-223.

Mori, S., A. Jewett, K. Murakami-Mori, M. Cavalcanti and B. Bonavida (1997). "The participation of the Fas-mediated cytotoxic pathway by natural killer cells is tumor-cell-dependent." Cancer Immunol Immunother **44**(5): 282-290.

Mrozek, E., P. Anderson and M. A. Caligiuri (1996). "Role of interleukin-15 in the development of human CD56+ natural killer cells from CD34+ hematopoietic progenitor cells." Blood **87**(7): 2632-2640.

Munn, D. H., M. D. Sharma, D. Hou, B. Baban, J. R. Lee, S. J. Antonia, J. L. Messina, P. Chandler, P. A. Koni and A. L. Mellor (2004). "Expression of indoleamine 2,3-dioxygenase by plasmacytoid dendritic cells in tumor-draining lymph nodes." J Clin Invest **114**(2): 280-290.

Nguyen, K. B., T. P. Salazar-Mather, M. Y. Dalod, J. B. Van Deusen, X. Q. Wei, F. Y. Liew, M. A. Caligiuri, J. E. Durbin and C. A. Biron (2002). "Coordinated and distinct roles for IFN-alpha beta, IL-12, and IL-15 regulation of NK cell responses to viral infection." J Immunol **169**(8): 4279-4287.

O'Sullivan, T., R. Saddawi-Konefka, W. Vermi, C. M. Koebel, C. Arthur, J. M. White, R. Uppaluri, D. M. Andrews, S. F. Ngiew, M. W. Teng, M. J. Smyth, R. D. Schreiber and J. D. Bui (2012). "Cancer immunoediting by the innate immune system in the absence of adaptive immunity." J Exp Med **209**(10): 1869-1882.

Onai, N., K. Kurabayashi, M. Hosoi-Amaike, N. Toyama-Sorimachi, K. Matsushima, K. Inaba and T. Ohteki (2013). "A clonogenic progenitor with prominent plasmacytoid dendritic cell developmental potential." Immunity **38**(5): 943-957.

Orr, M. T. and L. L. Lanier (2010). "Natural killer cell education and tolerance." Cell **142**(6): 847-856.

Penna, G., S. Sozzani and L. Adorini (2001). "Cutting edge: selective usage of chemokine receptors by plasmacytoid dendritic cells." J Immunol **167**(4): 1862-1866.

Peter, M. E. and P. H. Krammer (2003). "The CD95(APO-1/Fas) DISC and beyond." Cell Death Differ **10**(1): 26-35.

Prokunina-Olsson, L., B. Muchmore, W. Tang, R. M. Pfeiffer, H. Park, H. Dickensheets, D. Hergott, P. Porter-Gill, A. Mumy, I. Kohaar, S. Chen, N. Brand, M. Tarway, L. Liu, F. Sheikh, J. Astemborski, H. L. Bonkovsky, B. R. Edlin, C. D. Howell, T. R. Morgan, D. L. Thomas, B. Rehermann, R. P. Donnelly and T. R. O'Brien (2013). "A variant upstream of IFNL3 (IL28B) creating a new interferon gene IFNL4 is associated with impaired clearance of hepatitis C virus." Nat Genet **45**(2): 164-171.

Pui, C. H. and W. E. Evans (2006). "Treatment of acute lymphoblastic leukemia." N Engl J Med **354**(2): 166-178.

Pulendran, B., J. Banchemereau, S. Burkeholder, E. Kraus, E. Guinet, C. Chalouni, D. Caron, C. Maliszewski, J. Davoust, J. Fay and K. Palucka (2000). "Flt3-ligand and granulocyte colony-stimulating factor mobilize distinct human dendritic cell subsets in vivo." J Immunol **165**(1): 566-572.

Pulendran, B., J. Lingappa, M. K. Kennedy, J. Smith, M. Teepe, A. Rudensky, C. R. Maliszewski and E. Maraskovsky (1997). "Developmental pathways of dendritic cells in vivo: distinct function, phenotype, and localization of dendritic cell subsets in FLT3 ligand-treated mice." J Immunol **159**(5): 2222-2231.

Pulendran, B., J. L. Smith, G. Caspary, K. Brasel, D. Pettit, E. Maraskovsky and C. R. Maliszewski (1999). "Distinct dendritic cell subsets differentially regulate the class of immune response in vivo." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(3): 1036-1041.

Rezvani, K. and R. H. Rouce (2015). "The Application of Natural Killer Cell Immunotherapy for the Treatment of Cancer." Front Immunol **6**: 578.

Rocha, V., E. Gluckman, r. Eurocord-Netcord, B. European and g. Marrow Transplant (2009). "Improving outcomes of cord blood transplantation: HLA matching, cell dose and other graft- and transplantation-related factors." Br J Haematol **147**(2): 262-274.

Rocha, V., N. Kabbara, I. Ionescu, A. Ruggeri, D. Purtill and E. Gluckman (2009). "Pediatric related and unrelated cord blood transplantation for malignant diseases." Bone Marrow Transplant **44**(10): 653-659.

Romagnani, C., K. Juelke, M. Falco, B. Morandi, A. D'Agostino, R. Costa, G. Ratto, G. Forte, P. Carrega, G. Lui, R. Conte, T. Strowig, A. Moretta, C. Munz, A. Thiel, L. Moretta and G. Ferlazzo (2007). "CD56brightCD16- killer Ig-like receptor- NK cells display longer telomeres and acquire features of CD56dim NK cells upon activation." J Immunol **178**(8): 4947-4955.

Rosmaraki, E. E., I. Douagi, C. Roth, F. Colucci, A. Cumano and J. P. Di Santo (2001). "Identification of committed NK cell progenitors in adult murine bone marrow." Eur J Immunol **31**(6): 1900-1909.

Ruggeri, A., G. Michel, J. H. Dalle, M. Caniglia, F. Locatelli, A. Campos, C. D. de Heredia, M. Mohty, J. M. Hurtado, M. Bierings, H. Bittencourt, M. Mauad, D. Purtill, R. Cunha, N. Kabbara, E. Gluckman, M. Labopin, C. Peters and V. Rocha (2012). "Impact of pretransplant minimal residual disease after cord blood transplantation for childhood acute lymphoblastic leukemia in remission: an Eurocord, PDWP-EBMT analysis." Leukemia.

Sakisaka, T. and Y. Takai (2004). "Biology and pathology of nectins and nectin-like molecules." Curr Opin Cell Biol **16**(5): 513-521.

Sheppard, P., W. Kindsvogel, W. Xu, K. Henderson, S. Schlutsmeyer, T. E. Whitmore, R. Kuestner, U. Garrigues, C. Birks, J. Roraback, C. Ostrander, D. Dong, J. Shin, S. Presnell, B. Fox, B. Haldeman, E. Cooper, D. Taft, T. Gilbert, F. J. Grant, M. Tackett, W. Krivan, G. McKnight, C. Clegg, D. Foster and K. M. Klucher (2003). "IL-28, IL-29 and their class II cytokine receptor IL-28R." Nat Immunol **4**(1): 63-68.

Sloan, K. E., B. K. Eustace, J. K. Stewart, C. Zehetmeier, C. Torella, M. Simeone, J. E. Roy, C. Unger, D. N. Louis, L. L. Ilag and D. G. Jay (2004). "CD155/PVR plays a key role in cell motility during tumor cell invasion and migration." BMC Cancer **4**: 73.

Souza-Fonseca-Guimaraes, F., A. Young, D. Mittal, L. Martinet, C. Bruedigam, K. Takeda, C. E. Andoniou, M. A. Degli-Esposti, G. R. Hill and M. J. Smyth (2015). "NK cells require IL-28R for optimal in vivo activity." Proc Natl Acad Sci U S A **112**(18): E2376-2384.

Sozzani, S., W. Vermi, A. Del Prete and F. Facchetti (2010). "Trafficking properties of plasmacytoid dendritic cells in health and disease." Trends Immunol **31**(7): 270-277.

Spits, H., D. Artis, M. Colonna, A. Diefenbach, J. P. Di Santo, G. Eberl, S. Koyasu, R. M. Locksley, A. N. McKenzie, R. E. Mebius, F. Powrie and E. Vivier (2013). "Innate lymphoid cells--a proposal for uniform nomenclature." Nat Rev Immunol **13**(2): 145-149.

Stanietsky, N., T. L. Rovis, A. Glasner, E. Seidel, P. Tsukerman, R. Yamin, J. Enk, S. Jonjic and O. Mandelboim (2013). "Mouse TIGIT inhibits NK-cell cytotoxicity upon interaction with PVR." Eur J Immunol **43**(8): 2138-2150.

Stanietsky, N., H. Simic, J. Arapovic, A. Toporik, O. Levy, A. Novik, Z. Levine, M. Beiman, L. Dassa, H. Achdout, N. Stern-Ginossar, P. Tsukerman, S. Jonjic and O. Mandelboim (2009). "The interaction of TIGIT with PVR and PVRL2 inhibits human NK cell cytotoxicity." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(42): 17858-17863.

Sun, J. C., J. N. Beilke and L. L. Lanier (2009). "Adaptive immune features of natural killer cells." Nature **457**(7229): 557-561.

Szabolcs, P. and D. Niedzwiecki (2008). "Immune reconstitution in children after unrelated cord blood transplantation." Biol Blood Marrow Transplant **14**(1 Suppl 1): 66-72.

Tahara-Hanaoka, S., K. Shibuya, H. Kai, A. Miyamoto, Y. Morikawa, N. Ohkochi, S. Honda and A. Shibuya (2006). "Tumor rejection by the poliovirus receptor family ligands of the DNAM-1 (CD226) receptor." Blood **107**(4): 1491-1496.

Tahara-Hanaoka, S., K. Shibuya, Y. Onoda, H. Zhang, S. Yamazaki, A. Miyamoto, S. Honda, L. L. Lanier and A. Shibuya (2004). "Functional characterization of DNAM-1 (CD226) interaction with its ligands PVR (CD155) and nectin-2 (PRR-2/CD112)." Int Immunol **16**(4): 533-538.

Takeda, K., T. Kaisho and S. Akira (2003). "Toll-like receptors." Annu Rev Immunol **21**: 335-376.

Tel, J., E. H. Aarntzen, T. Baba, G. Schreiber, B. M. Schulte, D. Benitez-Ribas, O. C. Boerman, S. Croockewit, W. J. Oyen, M. van Rossum, G. Winkels, P. G. Coulie, C. J. Punt, C. G. Figdor and I. J. de Vries (2013). "Natural human plasmacytoid dendritic cells induce antigen-specific T-cell responses in melanoma patients." Cancer Res **73**(3): 1063-1075.

Teufert, N. (2015). Virus transformed human natural killer (NK) cell lines - a model for functional analysis. 7th Annual Retreat, Erlangen School of Molecular Communication. Schloss Hirschberg, Beilngries, Germany.

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

Tsutsui, H., K. Nakanishi, K. Matsui, K. Higashino, H. Okamura, Y. Miyazawa and K. Kaneda (1996). "IFN-gamma-inducing factor up-regulates Fas ligand-mediated cytotoxic activity of murine natural killer cell clones." J Immunol **157**(9): 3967-3973.

Verma, C., V. Kaewkangsan, J. M. Eremin, G. P. Cowley, M. Ilyas, M. A. El-Sheemy and O. Eremin (2015). "Natural killer (NK) cell profiles in blood and tumour in women with large and locally advanced breast cancer (LLABC) and their contribution to a pathological complete response (PCR) in the tumour following neoadjuvant chemotherapy (NAC): differential restoration of blood profiles by NAC and surgery." J Transl Med **13**: 180.

Vermi, W., R. Bonecchi, F. Facchetti, D. Bianchi, S. Sozzani, S. Festa, A. Berenzi, M. Cella and M. Colonna (2003). "Recruitment of immature plasmacytoid dendritic cells (plasmacytoid monocytes) and myeloid dendritic cells in primary cutaneous melanomas." J Pathol **200**(2): 255-268.

Vivier, E., D. H. Raulet, A. Moretta, M. A. Caligiuri, L. Zitvogel, L. L. Lanier, W. M. Yokoyama and S. Ugolini (2011). "Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells." Science **331**(6013): 44-49.

Vivier, E. and S. Ugolini (2011). "Natural killer cells: from basic research to treatments." Front Immunol **2**: 18.

Vogt, T. K., A. Link, J. Perrin, D. Finke and S. A. Luther (2009). "Novel function for interleukin-7 in dendritic cell development." Blood **113**(17): 3961-3968.

Waskow, C., K. Liu, G. Darrasse-Jeze, P. Guermonprez, F. Ginhoux, M. Merad, T. Shengelia, K. Yao and M. Nussenzweig (2008). "The receptor tyrosine kinase Flt3 is required for dendritic cell development in peripheral lymphoid tissues." Nat Immunol **9**(6): 676-683.

Yin, Z., J. Dai, J. Deng, F. Sheikh, M. Natalia, T. Shih, A. Lewis-Antes, S. B. Amrute, U. Garrigues, S. Doyle, R. P. Donnelly, S. V. Kotenko and P. Fitzgerald-Bocarsly (2012). "Type

III IFNs are produced by and stimulate human plasmacytoid dendritic cells." J Immunol **189**(6): 2735-2745.

Yu, H., T. A. Fehniger, P. Fuchshuber, K. S. Thiel, E. Vivier, W. E. Carson and M. A. Caligiuri (1998). "Flt3 ligand promotes the generation of a distinct CD34(+) human natural killer cell progenitor that responds to interleukin-15." Blood **92**(10): 3647-3657.

Zamai, L., C. Ponti, P. Mirandola, G. Gobbi, S. Papa, L. Galeotti, L. Cocco and M. Vitale (2007). "NK cells and cancer." J Immunol **178**(7): 4011-4016.

Zhang, M. J., S. M. Davies, B. M. Camitta, B. Logan, K. Tiedemann and M. Eapen (2012). "Comparison of Outcomes after HLA-Matched Sibling and Unrelated Donor Transplantation for Children with High-Risk Acute Lymphoblastic Leukemia." Biol Blood Marrow Transplant **18**(8): 1204-1210.

Zhou, Z., O. J. Hamming, N. Ank, S. R. Paludan, A. L. Nielsen and R. Hartmann (2007). "Type III interferon (IFN) induces a type I IFN-like response in a restricted subset of cells through signaling pathways involving both the Jak-STAT pathway and the mitogen-activated protein kinases." J Virol **81**(14): 7749-7758.

Zou, W., V. Machelon, A. Coulomb-L'Hermin, J. Borvak, F. Nome, T. Isaeva, S. Wei, R. Krzysiek, I. Durand-Gasselien, A. Gordon, T. Pustilnik, D. T. Curiel, P. Galanaud, F. Capron, D. Emilie and T. J. Curiel (2001). "Stromal-derived factor-1 in human tumors recruits and alters the function of plasmacytoid precursor dendritic cells." Nat Med **7**(12): 1339-1346.

Zwirner, N. W. and C. I. Domaica (2010). "Cytokine regulation of natural killer cell effector functions." Biofactors **36**(4): 274-288.

|