

Université de Montréal

**Combinaison de thérapie épigénétique et  
d'immunothérapie pour prévenir la rechute de leucémie  
lymphoblastique aiguë chez les enfants transplantés**

Par  
Mélanie Diaz

Programme de Microbiologie et Immunologie  
Faculté de médecine

Mémoire présentée à la Faculté de médecine en vue de l'obtention du grade de Maître des  
sciences en Microbiologie et Immunologie

2018-12-30

© Mélanie Diaz, 2018

## Résumé

L'ère de la chimiothérapie a commencé dans les années 40 cependant, malgré de nombreux progrès, environ 20% des enfants atteints de leucémie lymphoblastique aigue (LLA) rechutent. La seule alternative thérapeutique est la transplantation de cellules souches hématopoïétiques (HSCT). L'efficacité de l'HSCT dépend de la capacité du système immunitaire greffé à éliminer les cellules leucémiques résiduelles, c'est l'effet «anti-leucémie de la Greffe». Lors de la reconstitution du système immunitaire après greffe, les cellules Natural killer (NK) sont les premiers effecteurs immunitaires à réapparaître. De précédents travaux dans notre laboratoire, montrent une lyse des cellules leucémiques par les NK lorsqu'elles sont stimulées, préalablement, par les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC). Cependant, certaines lignées LLA restent résistantes à la lyse médiée par les NK. Il s'agit, ici, de combiner les effets épigénétiques de drogue à l'immunothérapie médiée par les NK activées par les pDC.

Les cellules leucémiques ont la capacité d'échapper à l'activité cytolytique des NK en réprimant des gènes de l'apoptose par des mécanismes épigénétiques. Des expériences de cytotoxicité, médiées par des NK activées par des pDC, indiquent qu'un prétraitement par la Décitabine et le Vorinostat permet d'augmenter la sensibilité des cellules réfractaires à lyse cellulaire. En revanche, des tests de toxicité montrent un effet de lyse de la Décitabine sur la lignée leucémique pré-B 697. De plus, dans le but de sélectionner les patients qui répondront au traitement par les pDC, il est important de déterminer des biomarqueurs prédictifs. Cette étude montre, par des expériences de cytotoxicité, que la lyse induite par les cellules NK activées par les pDC, se fait essentiellement via la voie des récepteurs TRAIL (Ligand induisant une apoptose liée au facteur de nécrose tumorale), caspase 8-TRAIL-R1/R2 et dans une moindre mesure par la voie de dégranulation (caspase 9).

Bien que cette étude permette de construire les bases d'un projet, il est nécessaire, d'approfondir notre compréhension des différentes facettes de réponses immunitaires (reconnaissance, lyse cellulaire). Etude, qui, à long terme permettra de développer un traitement pour les jeunes patients atteints de LLA.

Mots clés : Leucémie lymphoblastique aigue, Immunothérapie, NK, pDC, épigénétique

## Abstract

The era of chemotherapy began in the 1940s, but despite an extensive progress in this field, approximately 20% of children with acute lymphoblastic leukemia (ALL) still experience relapse. Nowadays, the only therapeutic alternative to chemotherapy is hematopoietic stem cell transplantation (HSCT). The efficiency of HSCT greatly depends on the ability of the immune system to eradicate residual leukemia cells, which is also known as the *graft versus leukemia* effect. During immune reconstitution following HSCT, cytotoxic lymphocytes, known as Natural Killer (NK) cells, are the first effectors to re-appear. Previous studies in our laboratory showed that the lysis of leukemia cells can be induced when NK cells are stimulated by plasmacytoid dendritic cells (pDC). While this is a promising result, some cancer cell lines, however, still remain refractory to NK-mediated lysis. . The aim, here, is to combine epigenetic drug effects with NK-activated immunotherapy.

Leukemia cells have the ability to escape the cytotoxic activity of NK cells through the repression of apoptotic genes and epigenetic mechanisms. Cytotoxic experiments indicate that leukemia cells become more sensible to NK-mediated lysis if treated with Decitabine and Vorinostat prior to NK exposure. Decitabine also shows a toxic effect on the human pre-B leukemia 697 cell line. In order to further develop pDC treatment in leukemia patients, an extensive need exists to identify more predictive biomarkers. In this study, by conducting cytotoxic experiments, I show that the lysis induced by pDC-activated NK cells, is primarily driven by the TRAIL (tumor-necrosis-factor related apoptosis inducing ligand) receptor pathway (caspase8, TRAIL-R1/R2) and to some extent by the degranulation pathway (caspase 9).

While this study has established some basic groundwork, it is necessary to further broaden our understanding of the facets of immune responses (i. e. recognition, cell lysis). This study, in long term, will permit to develop a treatment for young patients with ALL.

Key words : Acute lymphoblastic leukemia, Immunotherapy, NK, pDC, Epigenetic

# Table des matières

|   |     |
|---|-----|
| Résumé .....  | i   |
| Abstract .....  | ii  |
| Table des matières .....  | iii |
| Liste des tableaux .....  | v   |
| Liste des figures.....  | vi  |
| Liste des abréviations .....  | vii |
| Remerciements .....   | ix  |
| 1. Introduction .....   | 1   |
| 1.1 Hématopoïèse .....  | 1   |
| 1.2 Cellules Natural killer (NK) .....                                    | 2   |
| 1.2.1 Définition .....  | 2   |
| 1.2.2 Développement.....  | 3   |
| 1.2.3 Récepteurs des cellules NK.....                                     | 4   |
| 1.2.3.1 Les récepteurs activateurs .....                                  | 5   |
| 1.2.3.2 Les récepteurs inhibiteurs.....                                   | 5   |
| 1.2.4 Mécanisme de lyse .....   | 6   |
| 1.3 Cellules dendritiques plasmacytoïdes .....                            | 8   |
| 1.3.1 Définition .....  | 8   |
| 1.3.2 Développement.....  | 9   |
| 1.3.3 Fonction.....   | 9   |
| 1.4 L'axe pDC/NK .....  | 10  |
| 1.4.1 Immunité innée anti-virale .....                                    | 10  |
| 1.4.2 Activité anti-leucémique des cellules NK activées par les pDC ..... | 11  |
| 1.4.2.1 Régulations fonctionnelles des cellules NK par les pDC.....       | 11  |
| 1.4.2.2 Interaction des cellules NK avec les cellules leucémiques .....   | 11  |
| 1.5 Leucémie aigüe lymphoblastique.....                                   | 12  |
| 1.5.1 Caractéristiques de la Leucémie Lymphoblastique aigüe .....         | 13  |
| 1.5.2 Facteurs de risque.....   | 14  |
| 1.5.3 Traitements.....  | 14  |
| 1.5.4 Rechute leucémique .....  | 15  |
| 1.6 Greffe de cellules souches hématopoïétiques.....                      | 15  |
| 1.6.1 La greffe .....   | 15  |
| 1.6.2 Reconstitution du système immunitaire .....                         | 17  |
| 1.6.3 Différents mécanismes de lyse des lignées cellulaires LLA .....     | 19  |
| 1.6.3.1 Lignée REH.....   | 19  |
| 1.6.3.2 Lignée Nalm6 .....  | 20  |
| 1.6.4 Etudes menées <i>in vitro</i> .....                                 | 21  |
| 1.6.5 Études menées <i>in vivo</i> .....                                  | 23  |
| 1.7 Mécanismes épigénétiques.....   | 24  |
| 1.7.1 Concept.....  | 24  |
| 1.7.2 Structure de la chromatine.....                                     | 25  |
| 1.7.3 L'épigénétique des cellules leucémiques .....                       | 28  |
| 1.7.4 Décitabine et Vorinostat.....                                       | 28  |

|         |   |    |
|---------|---|----|
| 2.      | Projet de recherche .....   | 30 |
| 3.      | Matériels et Méthodes .....   | 32 |
| 3.1     | Lignées cellulaires.....  | 32 |
| 3.2     | Délétion des gènes impliquées dans les voies d'apoptose dans les lignées de LLA   | 33 |
| 3.3     | Western blot .....  | 33 |
| 3.4     | Expérience de cytotoxicité .....  | 34 |
| 3.4.1   | Sélection des cellules NK et pDC .....  | 34 |
| 3.4.2   | Activation des cellules NK par les cellules pDC .....   | 35 |
| 3.4.3   | Compte des cellules vivantes en cytométrie.....   | 35 |
| 3.4.4   | Contrôles: Activation des NK .....  | 36 |
| 3.5     | Différenciation <i>in vitro</i> des pDC à partir des progéniteurs du sang de cordon .....   | 37 |
| 3.6     | Traitement Décitabine et Vorinostat sur la lignée 697.....  | 37 |
| 3.7     | Méthylation de l'ADN.....   | 38 |
| 4.      | Résultats .....   | 39 |
| 4.1     | Objectif 1: Mécanismes de lyse cellulaire induits par les cellules NK activées par les pDC.....   | 39 |
| 4.1.1   | Lignée REH: la mort cellulaire induite par les cellules NK dépend fortement de la voie d'apoptose directe.....                                    | 39 |
| 4.1.1.1 | REH Casp8-KO.....   | 40 |
| 4.1.1.2 | REH Casp9-KO.....   | 40 |
| 4.1.1.3 | REH TRAILR1-KO et TRAILR2-KO.....   | 41 |
| 4.1.2   | Lignée Nalm6: La mort cellulaire induite par les cellules NK ne dépend pas uniquement des récepteurs de mort cellulaire TRAIL-R1 et TRAIL-R2..... | 43 |
| 4.1.2.1 | Nalm6 Casp8-KO.....   | 43 |
| 4.1.2.2 | Nalm6 Casp9-KO.....   | 44 |
| 4.1.2.3 | Nalm6 TRAILR1-KO et TRAILR2-KO.....   | 45 |
| 4.2     | Objectif 2: Sensibilisation des cellules leucémiques par modifications épigénétiques.....   | 46 |
| 4.2.1   | Lignée 697 résistante à la lyse médiée par les cellules NK.....   | 47 |
| 4.2.2   | Levée de résistance sur la lignée 697 par effet épigénétique en amont .....   | 48 |
| 4.2.3   | Expression similaire des marqueurs spécifiques de mort en présence de Décitabine.....   | 51 |
| 4.2.4   | Effet cytotoxique de la Décitabine sur la lignée 697 et non toxique sur les cellules NK.....  | 52 |
| 4.2.5   | Diminution de la méthylation de l'ADN génomique après traitement à la Décitabine.....   | 55 |
| 5.      | Discussion .....  | 56 |
| 5.1     | Conclusion-Perspectives .....   | 60 |
|         | Références .....  | 62 |
|         | Annexes .....   | i  |

## Liste des tableaux

|  |    |
|--|----|
| Tableau 1: Récepteurs activateurs et inhibiteurs exprimés par les cellules NK..... | 4  |
| Tableau 2: Lignées cellulaires utilisées au cours de cette étude .....             | 32 |
| Tableau 3: Liste des concentrations utilisées pour chaque anticorps.....           | 36 |
| Tableau 4: Séquences des CpG analysées et des primers utilisés.....                | 38 |

## Liste des figures

|  |    |
|--|----|
| Figure 1: Modèle simplifié d'hématopoïèse.....   | 2  |
| Figure 2: Développement des cellules NK. Pro- NK en NK matures.....  | 4  |
| Figure 3: Deux voies principales d'activation de l'apoptose.....   | 8  |
| Figure 4: Développement des pDC. Pré-pDC en pDC matures.....   | 10 |
| Figure 5: Mécanisme d'activation d'une cellule NK par une cellule pDC, suivie de l'induction de la lyse de cellule leucémique par une cellule NK activée.....                | 12 |
| Figure 6: Fréquence des anomalies cytogénétiques et moléculaires chez les enfants atteints de LLA.....   | 14 |
| Figure 7: Transplantation de cellules souches hématopoïétiques dans le traitement de la LLA.....   | 16 |
| Figure 8: Types de greffes de cellules souches hématopoïétiques.....   | 17 |
| Figure 9: Lyse REH sensible à la voie des récepteurs de mort.....  | 20 |
| Figure 10: Lyse Nalm6 sensible à la voie des récepteurs de mort et des voies de dégranulation.....   | 21 |
| Figure 11: La stimulation des cellules NK par les pDC activées par le TLR9 (médiée par l'IFN- $\alpha$ ) surpasse la résistance des LLA.....                                 | 22 |
| Figure 12: Tests cytotoxiques in vitro sur la lignée 697 et REH.....   | 23 |
| Figure 13: L'injection de pDC activées prévient le développement des LLA chez des souris humanisées.....   | 24 |
| Figure 14: Les 3 grands mécanismes épigénétiques.....  | 27 |
| Figure 15: Lyse cellulaire réduite sur la lignée REH mutée pour la caspase 8.....  | 40 |
| Figure 16: L'absence de caspase 9 n'influence pas la lyse cellulaire médiée par les cellules NK 9.....   | 41 |
| Figure 17: Diminution de la lyse cellulaire des cellules REH dont les récepteurs de mort cellulaire TRAILR1 et TRAIL-R2 ont été respectivement inactivés.....                | 42 |
| Figure 18: La délétion du gène de la Caspase-8 n'altère pas la lyse des cellules Nalm6 par les cellules NK activées.....   | 43 |
| Figure 19: La délétion du gène de la Caspase-9 n'altère pas la lyse des cellules Nalm6 par les cellules NK activées.....   | 44 |
| Figure 20: La délétion des gènes TRAIL-R1 et TRAIL-R2 ne modifie pas la sensibilité des cellules Nalm6 à la lyse cellulaire médiée par les cellules NK activées.....         | 45 |
| Figure 21: Absence de lyse de la lignée 697 en présence de NK activées par les pDC.....  | 47 |
| Figure 22: Sensibilisation des cellules 697 à la lyse médiée par les cellules NK par pré-traitement épigénétique.....  | 50 |
| Figure 23: Le traitement à la Décitabine ne modifie pas significativement l'expression des récepteurs de mort et des ligands des récepteurs activateurs des cellules NK..... | 51 |
| Figure 24: Toxicité de la Décitabine sur la lignée 697.....  | 53 |
| Figure 25: La Décitabine ne présente aucun effet toxique sur les cellules NK mais une diminution du récepteur TRAIL.....   | 54 |
| Figure 26: Diminution de la méthylation de l'ADN sur la lignée 697 en présence de Décitabine.....  | 55 |

## Liste des abréviations

|               |  |
|---------------|--|
| ADN           | Acides désoxyribonucléiques  |
| APAF1         | Facteur 1 activant la peptidase apoptotique                            |
| APC           | Cellules présentatrices d'antigènes                                    |
| ARN           | Acides ribonucléiques  |
| ARNlinc       | ARN non codant longs intergéniques                                     |
| ARNnc         | ARN non codant   |
| BCP-ALL       | Leucémie lymphoblastique aigue à précurseur cellules-B                 |
| BMT           | transplantation de cellules souches de moelle osseuse                  |
| BSA           | Albumine de sérum bovin  |
| CBT           | transplantation de cellules souches de sang de cordon                  |
| CLP           | Progéniteur lignée lymphoïde   |
| CLR           | Récepteur de type Lectine-C  |
| CMH           | complexe majeur d'histocompatibilité                                   |
| CMP           | Progéniteur lignée myeloïde  |
| CpG           | Motif nucléotidique «cytosine-p-guanine» associé aux agents pathogènes |
| CSH           | Cellule souche   |
| DAMP          | Motifs moléculaires associés aux dommages cellulaires                  |
| DNMT          | ADN méthyltransférases   |
| DTT           | Dithiothreitol   |
| EDTA          | Éthylènediaminetétraacétique   |
| FBS           | Fetal bovine serum   |
| Flt3          | Fms-like tyrosine kinase 3   |
| G-CSF         | Facteur stimulant des colonies de granulocytes                         |
| GFP           | Protéine fluorescence verte  |
| GM-CSF        | Facteur stimulant des colonies de granulocytes et macrophages          |
| GvHD          | Réaction du greffon contre l'hôte                                      |
| GvL           | Réaction du greffon contre la leucémie                                 |
| HAT           | Enzymes histones acétyl-transférases                                   |
| HDAC          | Histones déacétylases  |
| HIV           | Virus de l'immunodéficience humaine                                    |
| HLA           | Antigène leucocytaire humain   |
| Hsp90         | Heat shock protein 90  |
| HTS           | High-Throughput Sampler (criblage à haut débit)                        |
| IAPs          | Protéine inhibitrices d'apoptose                                       |
| IFN- $\alpha$ | Interféron alpha   |
| ITAM          | Motif d'activation à base d'immunorécepteur tyrosine                   |
| ITIM          | Motif d'inhibition à base d'immunorécepteur tyrosine                   |
| KIR           | Récepteurs analogues aux immunoglobulines tueuses                      |
| KO            | Knock-out  |
| LLA           | Leucémie lymphoblastique aigue   |
| LLC           | Leucémie lymphoblastique chronique                                     |
| LMA           | Leucémie myéloïde aigue  |
| LMC           | Leucémie myéloïde chronique  |
| MBP           | Protéine basique myéline   |
| M-CSF         | Facteur stimulant des colonies de macrophages                          |



|      |   |
|------|---|
| MFI  | Median fluorescence intensity                 |
| MRD  | Maladie résiduelle minimale                   |
| NCR  | Récepteurs naturels de toxicité               |
| NK   | Natural Killer                                |
| NLR  | Récepteur de type NOD                         |
| NSG  | Souris gamma sous fond NOD/SCID               |
| PAMP | Motifs moléculaires associés aux pathogènes   |
| PBMC | Cellules mononucléées sanguines périphériques |
| PBS  | Tampon phosphate salin                        |
| PCR  | Réaction de polymérase en chaîne              |
| pDC  | Cellule dendritiques plasmacytoïdes           |
| PRR  | Récepteur de reconnaissance de motifs         |
| PI   | Iodure de propidium                           |
| RPMI | «Roswell Park Memorial Institute medium»      |
| SDS  | Dodécylsulfate de sodium                      |
| SR1  | StemRegenin 1                                 |
| TIR  | Récepteur Toll/interleukin-1                  |
| TLR  | Récepteur de type Toll                        |
| TP53 | Protéine tumorale 53                          |
| TPO  | La thyroperoxydase                            |
| VZV  | virus varicelle-zona                          |
| WASP | Syndrome de Wiskott-Aldrich                   |

## Remerciements

Je tiens à remercier l'ensemble de mon équipe pour le soutien qu'elle m'a apporté. Mon directeur, Dr. Duval Michel, pour sa gentillesse et sa compréhension, Sabine pour sa rigueur et ses grandes connaissances scientifiques, Paulo pour sa bonne humeur et ses connaissances techniques pointues, Assila pour sa gentillesse et sa disponibilité. Je tiens également à remercier le laboratoire du Dr. Elie Haddad pour ses constructions des lignées KO, le laboratoire du Dr. Noël Raynal pour sa collaboration dans la partie épigénétique, de ce projet, le laboratoire du Dr. Christian Beauséjour pour les constructions de mutants KO et enfin le laboratoire du Dr. Serge McGraw pour sa précieuse aide dans l'analyse de la méthylation de l'ADN.

Je remercie toute ma famille pour leurs soutiens incroyable bien qu'à plus de 6000 km. Je remercie Denise pour ses très bons conseils, son soutien indéfectible et sa constance rassurante. Je remercie Chloé pour son grand soutien, ces moments drôles passés ensemble. Je remercie Clothilde pour son sens de l'humour et sa manière de raconter les histoires.

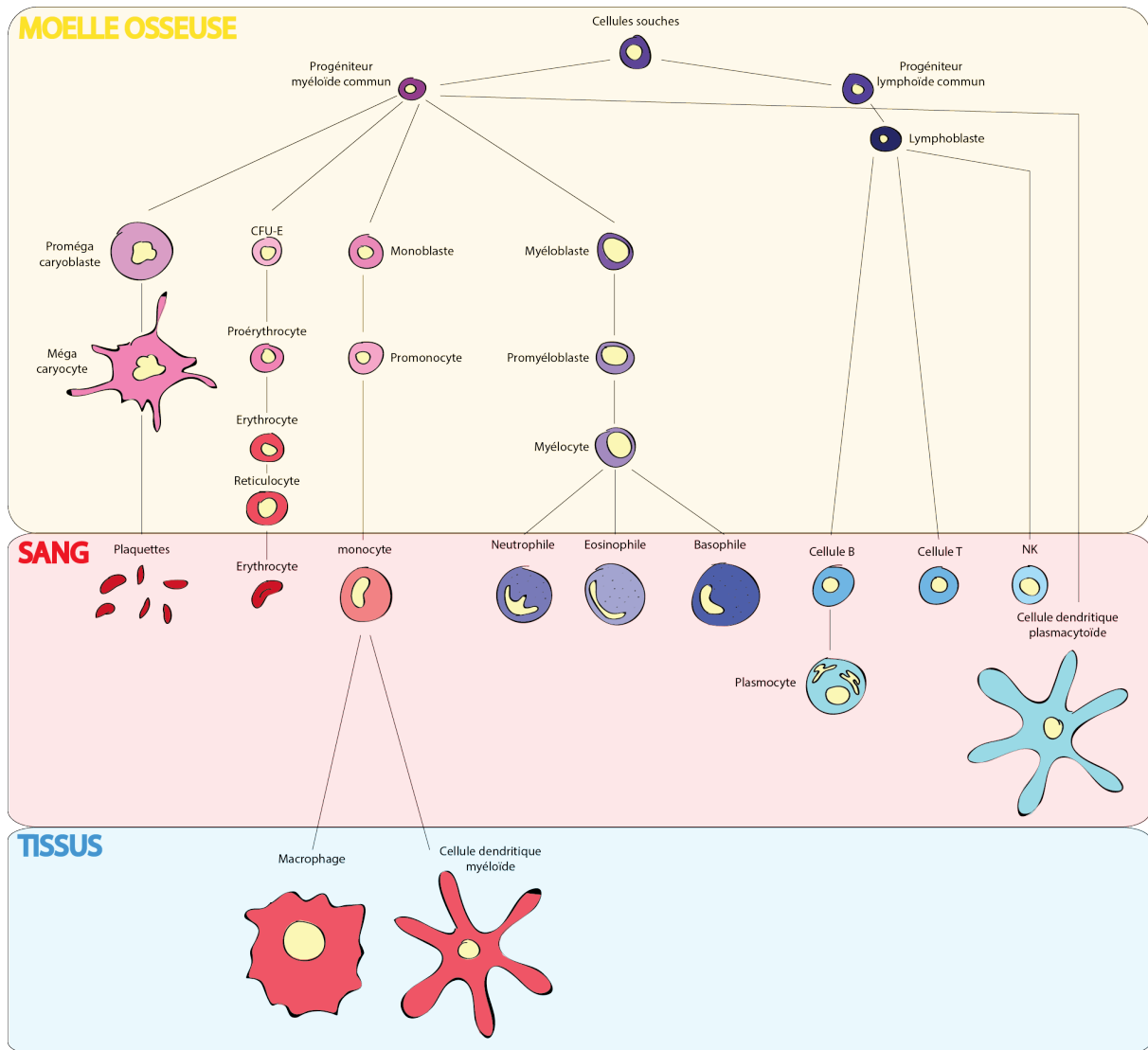
Je remercie, également, tous les membres du centre de recherche avec qui j'ai pu passer de très bon moments (Mathieu, Aurélie, Williams, Chloé.C, Hugo, Cynthia, Elodie) ainsi que le CHU Sainte-Justine pour son accueil.

# 1. Introduction

Les rechutes de Leucémie lymphoblastique aigue (LLA) représentent encore jusqu'à 20% après chimiothérapie. Malgré la reconstitution d'un système immunitaire, après transplantation de cellules souches hématopoïétiques, certaines souches restent réfractaires à l'action des cellules immunitaires de la greffe. Pour cela, cette étude a été menée sur l'utilisation de l'immunothérapie, par des NK activées par des pDC (cellules dendritiques plasmacytoïdes), combinée à des traitements épigénétiques.

## 1.1 Hématopoïèse

La LLA prend naissance au cours de l'hématopoïèse, qui est le processus de formation des cellules sanguines incluant les globules rouges, les plaquettes et les cellules immunitaires. Parmi les cellules immunitaires, on distingue les cellules myéloïdes (monocytes, granulocytes, cellules dendritiques) et les cellules lymphoïdes (lymphocytes B et T, cellules natural killer ou NK). Le développement des cellules sanguines a lieu dans la moelle osseuse après la naissance. Chaque cellule souche hématopoïétique (CSH) qui se divise, donne naissance à une nouvelle cellule souche et/ou une cellule engagée dans la différenciation: les progéniteurs des lignées myéloïde et lymphoïde (CMP et CLP respectivement). Les CMP vont donner naissance aux érythrocytes, thrombocytes (plaquettes), granulocytes, mastocytes, monocytes et cellules dendritiques. Les CLP vont donner naissance aux cellules T et B et aux cellules NK (figure 1) (Karamitros et al., 2018). Les cellules NK, les granulocytes, les phagocytes (macrophages, polynucléaires neutrophiles, et les cellules dendritiques) sont les effecteurs de l'immunité innée. Les lymphocytes T et B sont les effecteurs de l'immunité adaptative qui est dirigée vers des antigènes spécifiques. Les cellules malignes de LLA se développent au cours de la différenciation des cellules lymphoïdes à partir des CLP. Au cours de la différenciation, les cellules vont présenter des marqueurs de surface qui vont permettre, lors d'expériences, de différencier les sous-populations. Les cellules souches sont caractérisées par l'expression du marqueur CD34. Les cellules NK et pDC, qui nous intéressent ici, sont principalement expriment les marqueurs CD56, CD16 (NK) et CD123 (pDC).



**Figure 1: Modèle simplifié d'hématopoïèse.** Une cellule souche multipotente se différencie en progéniteurs lymphoïdes et myéloïdes. La lignée myéloïde se différencie en plaquettes, érythrocytes, monocytes, macrophages, cellules dendritiques myéloïdes et granulocytes. La lignée lymphoïde se différencie en lymphocytes B, lymphocytes T, cellules NK, plasmocytes et cellules dendritiques plasmacytoïdes. Diaz et al., non publié.

## 1.2 Cellules Natural killer (NK)

### 1.2.1 Définition

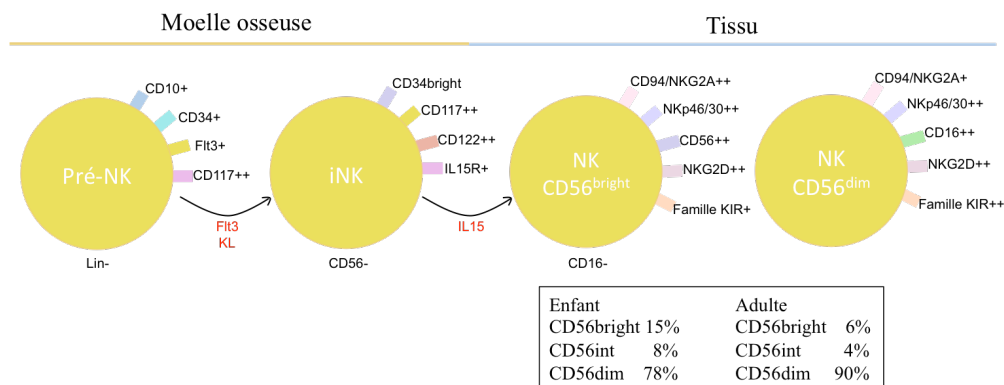
Les cellules NK, sont des grands lymphocytes granuleux appartenant à l'immunité innée. Elles représentent environ 3 à 10% des PBMC totaux (cellules sanguines

mononucléées périphériques). Elles possèdent une activité cytotoxique vis-à-vis des cellules infectées ou des cellules transformées sans stimulation préalable, elles n'ont pas besoin d'activation par les cellules présentatrices d'antigènes (APC) et donc pas de réarrangement génique contrairement aux lymphocytes T et B. Cependant les NK présentent aussi des caractéristiques associées à l'immunité adaptative dont la prolifération spécifique contre un pathogène, la génération de cellules mémoires et la capacité de créer une réponse de rappel plus efficace. L'action des NK nécessite un équilibre entre l'activation et l'inhibition de récepteurs spécifiques (Kiessling et al., 1975; O'Leary et al., 2006).

## 1.2.2 Développement

Les NK se développent à partir des précurseurs lymphoïdes dans la moelle osseuse. Les cellules  $CD34^+$ ,  $Flt3^+$  en présence des facteurs de croissance  $Flt3$  et  $KL$  (c-kit ligand) vont former des précurseurs de NK  $CD34^+$ ,  $CD56^-$ . Ces mêmes cellules par l'action de l'IL-15 (Interleukine-15) vont devenir des cellules NK matures et représenter 90% des NK circulant. Ces cellules se divisent en deux populations:  $CD56^{bright}$ ,  $CD16^-$ ,  $CD94/NKG2A^{++}$ ,  $NKG2D^{++}$ ,  $KIR^+$  (Cooper et al., 2001) et  $CD56^{dim}$ ,  $CD16^{++}$ ,  $CD94/NKG2A^+$ ,  $NKG2D^{++}$ ,  $KIR^{++}$  (marqueurs présentés dans le tableau 1, p.4). Les cellules NK  $CD56^{bright}$  présentent une production importante de cytokines proinflammatoires avec une activité cytotoxique faible contrairement aux cellules NK  $CD56^{dim}$  avec une activité cytotoxique élevée et une prolifération réduite (Cooper et al., 2001). Au cours de cette maturation elles acquièrent une éducation. En rencontrant des cellules du «soi» saines (cellules stromales), les cellules NK, par leurs récepteurs KIR (inhibiteurs), vont apprendre à reconnaître les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe I et donc faire la différence avec des cellules tumorales ou infectées par des virus (Anfossi et al., 2006) figure 2.

Les cellules anormales peuvent diminuer l'expression de la molécule de CMH de classe I et augmenter l'expression de protéines associées au stress. Ces facteurs sont perçues/reconnues par les récepteurs des cellules NK. Ces reconnaissances vont faire pencher la balance en faveur de l'activation. Les NK vont ensuite dégranuler (voie de dégranulation), libérant notamment, perforine (protéine formant des pores dans la membrane plasmique de la cellule cible) et granzyme (sérine protéase induisant les voies d'apoptose) (Spitzer and Meadows, 1999). Une autre voie va également intervenir, voie d'apoptose médiée par les récepteurs/ligands Fas-FasL et TraiLR-TraiL.



**Figure 2: Développement des cellules NK.** Pro-NK en NK matures. Proportion des cellules NK matures retrouvées dans le sang, chez l'enfant et l'adulte.

### 1.2.3 Récepteurs des cellules NK

L'activité des cellules NK est un équilibre sensible qui va dépendre de signaux activateurs et inhibiteurs (tableau 1). De plus, leurs fonctions effectrices vont être augmentées par l'interaction avec les cellules dendritiques et la présence de cytokines.

**Tableau 1: Récepteurs activateurs et inhibiteurs exprimés par les cellules NK.**

| Récepteurs  |            | Ligands            |
|---|------------|--------------------|
| <b>Activateurs</b>                                |            |                    |
| Famille des récepteurs naturels de toxicité - NCR | NKp30      | B7-H6              |
|   | NKp44      | NKp44-L            |
|   | NKp46      | Héparine Sulfate   |
| DNAM-1  |            | Nectine-2<br>PVR   |
| FcγRIIIα  |            | IgG                |
| Famille des Lectines de type-C                    | NKG2D      | MIC A/B<br>ULBP1/2 |
| <b>Inhibiteurs</b>                                |            |                    |
| KIR   | KIR2DL1    | HLA-C2             |
|   | KIR2DL2/3  | HLA-C1             |
|   | KIR3DL1    | HLA-BW4            |
|   | KIR3DL2    | HLA A3/A11         |
| Famille des Lectines de type-C                    | CD94/NKG2A | HLA-E              |

Les récepteurs activateurs sont associés à la membrane par un motif ITAM (motif d'activation des récepteurs immuns basés sur la tyrosine) qui va être phosphorylé et déclencher une cascade menant à la cytotoxicité. Les récepteurs inhibiteurs sont associés à la membrane par un motif ITIM (motif d'inhibition des récepteurs immuns basés sur la tyrosine), sa phosphorylation active des phosphatases qui inhibent la cytotoxicité (Faure et al., 2003; Gross et al., 2008).

### **1.2.3.1 Les récepteurs activateurs**

Lors d'un contact avec une cellule, les récepteurs des cellules NK vont lier un certain nombre de ligands :

- Les récepteurs naturels de toxicité (NCR), NKp30, NKp44, NKp46 qui ont la capacité d'induire l'activité cytolytique des cellules NK et permettent une reconnaissance efficace des cellules tumorales. En effet le ligand de NKp30, B7-H6 est plus exprimé sur les cellules transformées, de même pour le ligand de NKp44, 21spe-MLL5 (Sivori et al., 2014).
- Le récepteur DNAM-1 va lier le ligand Nectine-2 et PVR surexprimés sur les cellules cancéreuses (Oshima et al., 2013).
- Le récepteur NKG2D, famille des lectines de type C, dont les ligands, MICA/B, ULBP1/2 sont surexprimés à la surface des cellules infectées, transformées ou stressées (Torelli et al., 2014).

### **1.2.3.2 Les récepteurs inhibiteurs**

Lors d'une liaison à une cellule du «soi», les cellules NK vont lier des récepteurs inhibiteurs:

- Les récepteurs de la famille des KIR, récepteurs analogues aux immunoglobulines des cellules NK. C'est une famille majoritairement d'inhibiteurs qui servent de régulateurs clés. KIR2DL1, KIR2DL2/3, KIR2DL1, KIR3DL2 ont comme ligands les molécules du CMH de classe I (HLA), la liaison provoquera l'activation des voies de signalisation qui stoppent la fonction cytolytique des NK (Campbell and Purdy, 2011).
- Les récepteurs CD94/NKG2A, famille des lectines de type C, ces récepteurs liés au ligand HLA-E vont induire un signal inhibiteur aux NK à travers les motifs ITIM qui interfèrent dans l'association de CD16 aux immunoglobulines et l'enzyme tyrosine kinase de la rate (SYK) (McWilliams et al., 2016).

## 1.2.4 Mécanisme de lyse

Lorsqu'une cellule NK rencontre une cellule transformée (tumorale) ou infectée par un virus, elle va induire des voies d'apoptoses sur la cellule cible.

La voie des récepteurs de mort va être induite par la liaison des ligands FasL et TRAIL sur leurs récepteurs respectifs Fas et TRAIL-R exprimés par la cellule cible. La voie de dégranulation peut-être induite par la liaison des récepteurs NKG2D, DNAM-1, NKP46 et CD16 avec leurs ligands respectifs MICA/B, ULBP1/2, Nectine2, NKp46L et les IgG (Chester et al., 2015; Li and Sun, 2018).

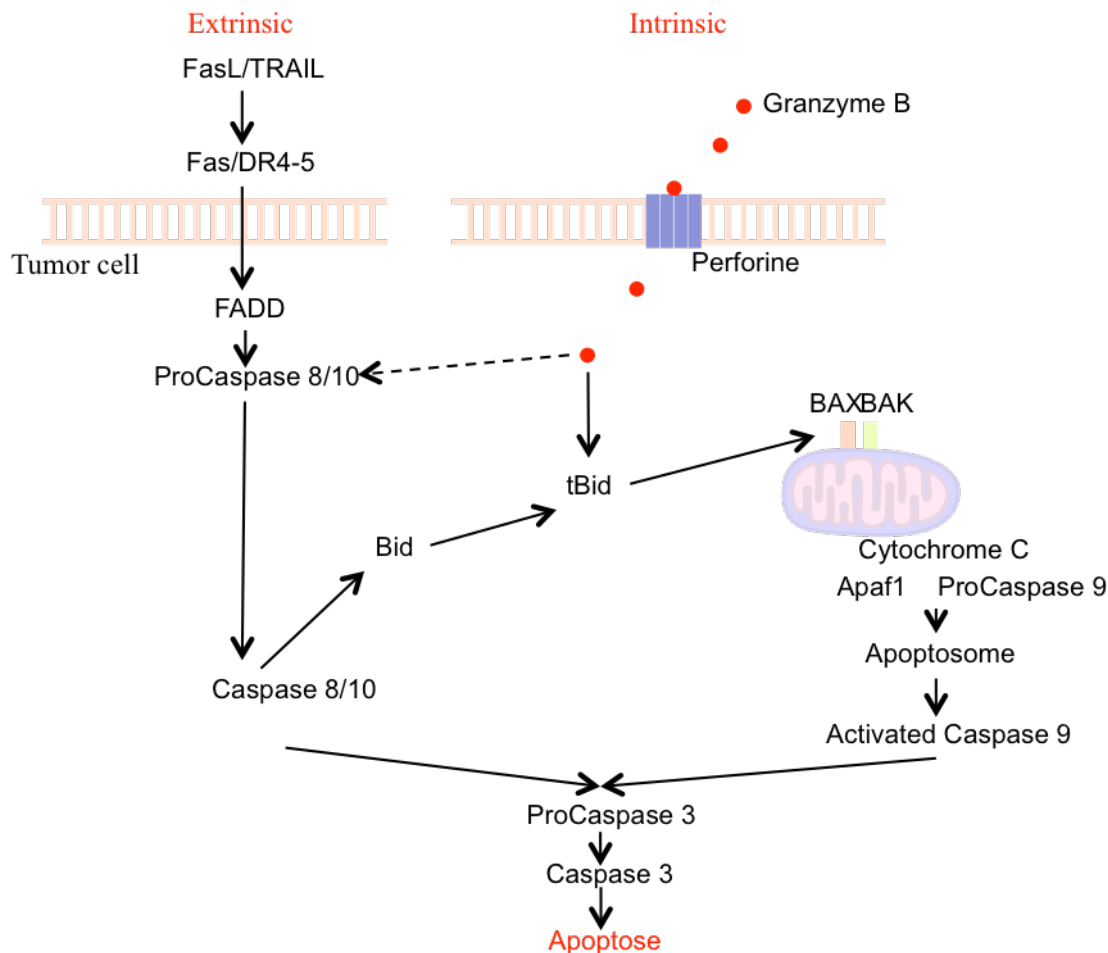
### Voie des récepteurs de morts :

Voie extrinsèque. Les récepteurs transmembranaires TRAIL-R (TRAILR1/DR4 et TRAILR2/DR5, homologues), vont former un trimère, induisant un changement conformationnel. La stimulation de ces récepteurs, (également de FAS), par leur domaine de mort (DD) intracellulaire, va entraîner le recrutement de la protéine adaptatrice FADD, qui va elle, recruter la pro-caspase 8 et 10, via les domaines DED (domaine effecteur de mort). Sous forme de monomère, la pro-caspase 8 va être clivée. Il y a séparation de sa petite et grande sous-unités, suivi d'une altération des propriétés enzymatiques. Suite à ça, elle va s'activer et devenir caspase 8 dimérisée (Boatright et al., 2003). L'activation forte de la caspase 8 va permettre l'activation directe de la caspase 3 induisant le clivage des substrats de mort et donc l'apoptose. Une activation plus faible de la caspase 8 et 10 vont déclencher le clivage de Bid et induire la voie mitochondriale (Crowder and El-Deiry, 2012). Voie d'apoptose intrinsèque (figure 7). Ces récepteurs TRAIL-R1/R2, et la caspase 8 jouent un rôle essentiel dans cette voie extrinsèque. En effet, des études ont rapporté qu'une plus forte expression de TRAIL-R1 en cellules blastiques (leucémie myéloïde aigue) était caractérisée par un plus haut taux de survie des patients (Pordzik et al., 2011). Observation similaire dans la leucémie myéloïde chronique. TRAIL-R1 présente une expression quasi nulle, comparée à TRAIL-R2, expression corrélée à la présence des cellules leucémiques en circulation (Deligezer and Dalay, 2007). De plus, une étude réalisée sur des cellules LLA, tumeur primaire fréquente chez l'enfant, a révélé un niveau d'expression de la caspase 8 corrélé à la sensibilité à la lyse cellulaire par des médicaments cytotoxiques (Ehrhardt et al., 2011). Cette caspase 8, dans une lignée LLA, montre également une fonction dans la voie mitochondriale. En effet, en bloquant la voie des récepteurs de mort cellulaire, la caspase 8 garde sa fonction mais la perd en surexprimant Bcl-2 (inhibiteur de la voie mitochondriale) (de Vries et al., 2007).



### Voie de dégranulation:

La voie de dégranulation passe par la liaison de récepteurs/ligands spécifiques: NKG2D / MICA/B,ULBP1/2; DNAM-1 / Nectine2. Ces liaisons vont induire la production de granzyme et perforine. Ces deux protéines sont les plus abondantes des granules cytotoxiques des cellules NK. Lorsque les granules sont libérés par la cellule NK, les perforines s'insèrent dans la membrane cytoplasmique pour former un canal dans la membrane de la cellule cible (cellule tumorale ou infectée). Les granzymes B ensuite entrent dans la cellule cible et déclenchent une cascade d'activation de la voie intrinsèque d'apoptose. Les granzymes B induisent une activation incomplète de la caspase 3 par l'inhibition exercée par les IAPs (inhibiteurs d'apoptose). De plus, les granzymes B induisent un clivage de Bid, qui, associé à Bax et Bak, favorise le relargage de facteurs pro-apoptotiques mitochondriaux, notamment le cytochrome C. Le cytochrome C va permettre la formation du complexe «apoptosome» composé d'abord de la protéine APAF1 couplée à deux pro-caspases 9 et deux Cytochrome C, formant une holoenzyme. La caspase 9 se dimérise et s'active par APAF1 qui forme un oligomère et facilite son auto-activation (Srinivasula et al., 1998). Cette auto-activation se fait, soit, via l'inhibition induite par le domaine de recrutement des caspases (CARD), soit par la stimulation de l'activité catalytique du domaine de la protéase (Li et al., 2017b), induisant l'apoptose (Li et al., 2017a; Wang and Youle, 2009) (figure 3). La caspase 9 est une des cibles clés dans la lutte contre le cancer. Une étude a montré dans le cancer de l'ovaire que l'inhibition de la caspase 9 favorisait une survie plus importante après traitement avec des agents chimiothérapeutiques. Une survie plus importante a aussi été observée chez une lignée cellulaire qui surexprimait une forme dominante négative de la caspase 9 (Wu and Ding, 2002).



**Figure 3: Deux voies principales d'activation de l'apoptose.** Voie intrinsèque, via la dégranulation des granzymes B et les mitochondries. Voie extrinsèque, via les récepteurs TRAIL et FasL.

## 1.3 Cellules dendritiques plasmacytoïdes

### 1.3.1 Définition

Les pDC sont des cellules à la base ronde qui, une fois activées, développent des dendrites. Elles représentent moins de 0,5% des PBMC totaux. Elles participent à la fois à l'immunité innée et adaptative. En effet, en fonction des interactions avec leur environnement elles vont donner des réponses cellulaires différentes. Leur grande capacité à produire de l'IFN- $\alpha$  les désigne comme principales activatrices des cellules NK. Elles permettent aussi la différenciation des cellules B et le recrutement des cellules immunitaires au site infectieux via la production de cytokines, IL-6 et TNF- $\alpha$ . En revanche les pDC présentent une activation

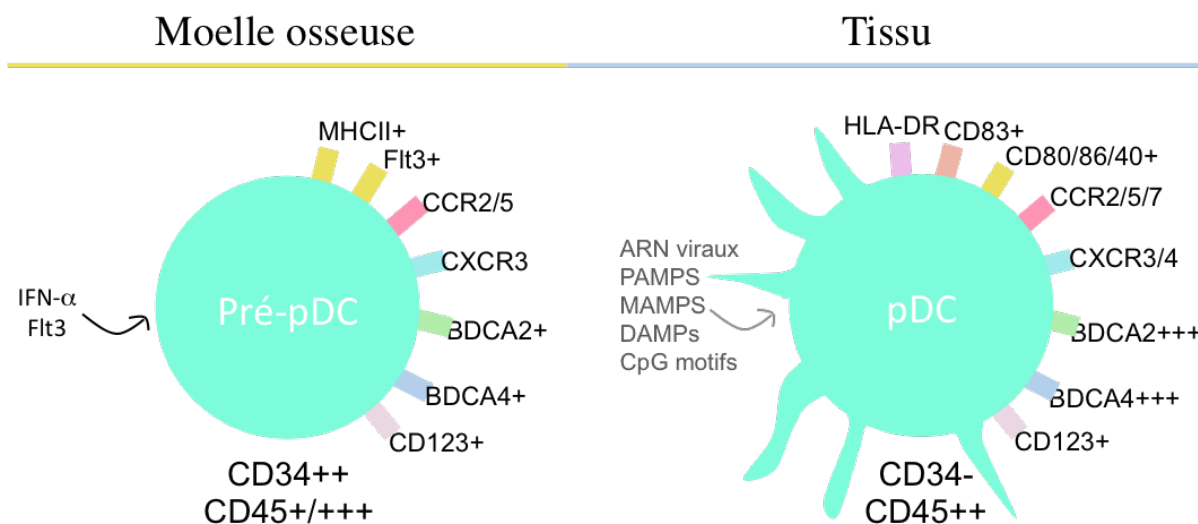
faible des cellules T due à un fort recyclage de leurs CMH-II (Mathan et al., 2013; Satpathy et al., 2012).

### 1.3.2 Développement

Ces cellules vont se développer dans la moelle osseuse à partir de progéniteurs myéloïdes (CMP)  $CD34^+$ ,  $Flt3^-$ ,  $Lin^-$  différenciés par l'action de GM-CSF, M-CSF, G-CSF et Flt3L (facteur clé du développement) en progéniteurs monocytes-macrophages (MDP)  $CD34^+$ ,  $Flt3^+$ . Elles sont ensuite différenciées par GM-CSF et Flt3 en progéniteurs dendritiques communs (CDP)  $CD16^{low}$ ,  $Flt3^+$ . Cependant elles peuvent également se développer à partir de progéniteurs lymphoïdes communs (CLP)  $FLT3^{++}$ ,  $lin^-$ . A partir de ces progéniteurs lymphoïdes et myéloïdes les cellules pré-pDC  $Lin^-$  vont se différencier en pDC immatures  $Flt3R^+$ ,  $CMHII^+$ , **CD123**<sup>+</sup>,  $BDCA2/4^+$ , par l'action de l'IFN- $\alpha$  et Flt3L. En revanche elles n'expriment pas des marqueurs spécifiques des lignées lymphoïdes et myéloïdes CD3, CD11c, CD19, CD16 et CD14 (Chistiakov et al., 2014; Weissman and Shizuru, 2008). Ces protéines, par la liaison aux ligands, vont entraîner le recrutement des pDC immatures aux sites infectieux où elles vont subir une maturation locale (figure 4).

### 1.3.3 Fonction

L'activation des pDC se fait via l'activation de CD40 ou via les TLR en réponse aux antigènes viraux ou motifs CpG (courtes séquences d'ADN à motif «cytosine-p-guanine», motifs 20 fois plus présents dans l'ADN bactérien et fort immunostimulant) (Ballas et al., 1996). Ces récepteurs, présents dans les endosomes, sont composés de 3 motifs. Un motif intra-endosomique, reconnaissant des motifs moléculaires associés aux pathogènes, un motif transmembranaire et un motif cytoplasmique déclenchant la production d'IFN- $\alpha$ . De plus, la maturation des pDC induit l'expression de récepteurs de costimulation des cellules T, CD40, CD80/86, CD83 et HLA-DR. Les pDC, principales productrices d'IFN- $\alpha$ , peuvent activer par contact direct les cellules NK via la liaison de récepteurs (GITR-GITRL et LFA1-FC $\gamma$ R3A) ou par contact indirecte via l'IFN- $\alpha$  et induire la production de cytokines et chimiokines dans les tissus et organes lymphoïdes secondaires.



**Figure 4: Développement des pDC.** Les cellules immatures pré-pDC retrouvées dans la MO se différencient en pDC matures.

## 1.4 L'axe pDC/NK

### 1.4.1 Immunité innée anti-virale

Dans le cas d'infection, la réponse immunitaire innée constitue la première barrière de défense. Elle est notamment caractérisée par la synthèse d'interféron- $\alpha$  et  $\beta$  (IFN- $\alpha$  et IFN- $\beta$ ), cytokines ayant des propriétés antivirales, antiprolifératives et immunomodulatrices (Seth et al., 2006). Les cellules innées, possèdent des récepteurs PRR membranaires (récepteurs de reconnaissance de motifs). Il existe 3 types de PRR: les récepteurs solubles, les récepteurs membranaires et les récepteurs cytoplasmiques. Les TLR (récepteurs de type Toll), CLR (récepteurs de type Lectine-C) et NLR (récepteurs de type NOD) font partie de ces récepteurs. Ces récepteurs vont reconnaître des motifs associés aux agents pathogènes (PAMPS et DAMPs). Les ARN doubles brins et ARN simples brins vont lier les TLR3 et TLR7/8 respectivement. Les motifs CpG, associé aux agents pathogènes vont être reconnus par le TLR9. Il existe 3 différentes classes de CpG, qui auront un effet différent sur les pDC: Le CpG-A, caractérisé par un motif palindromique central CpG et une queue poly-G. Il augmente la production d'IFN- $\alpha$  qui agit de façon autocrine en augmentant la production d'IFN- $\alpha$  par les pDC, cependant il stimule faiblement la voie TLR9 dépendante de NF- $\kappa$ B et la production

de cytokines. Le CpG-C a un effet combinant des CpG-A et B, avec un motif central CpG palindromique. Il va induire une forte production d'IFN- $\alpha$  des cellules pDC, ainsi qu'une stimulation des cellules B. (Mathan et al., 2013). Il existe également un activateur fort des pDC, le CpG-P. La production d'IFN- $\alpha$  diffère suivant la classe de CpG. A>P>C>B (Donhauser et al., 2010). Les IFN  $\alpha$  et  $\beta$  vont réprimer la réplication virale dans les cellules hôtes. Ils vont aussi permettre l'activation des cellules NK, via les pDC, l'activation des macrophages, la stimulation des cellules B (Elles subissent un basculement isotype en IgG2c et se différencient en cellules productrices d'anticorps) (Kiefer et al., 2012).

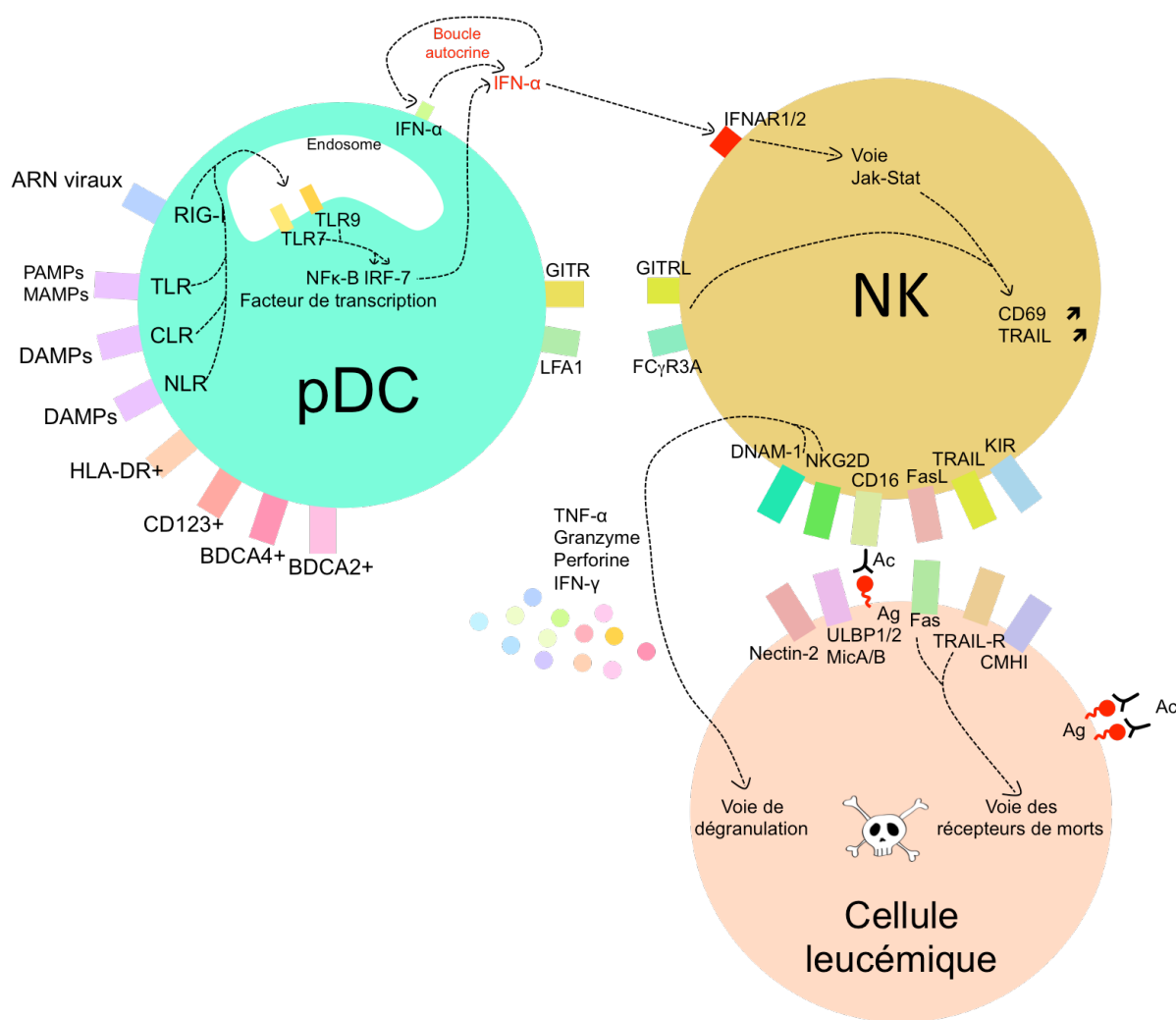
## **1.4.2 Activité anti-leucémique des cellules NK activées par les pDC**

### **1.4.2.1 Régulations fonctionnelles des cellules NK par les pDC**

Les pDC vont donc jouer un rôle important dans l'activation des cellules NK. En réponse aux motifs CpG, les pDC produisent de l'IFN- $\alpha$  et  $\beta$ . L'IFN- $\alpha$  possède un grand pouvoir activateur des cellules NK. L'IFN- $\beta$ , augmente l'activité cytotoxique des cellules NK (Hagberg et al., 2011). L'IFN- $\alpha$  et  $\beta$  vont se lier aux récepteurs IFNAR1/2 et activer la voie Jak-Stat et la production d'IFN $\gamma$  et permettre l'augmentation des récepteurs de surface TRAIL, FasL et CD69 sur les cellules NK (Hervas-Stubbs et al., 2011). En réaction, les cellules NK vont produire de l'IL-2 et provoquer une boucle en augmentant la production d'IFN- $\alpha$  par les pDC (Pogue et al., 2004; Robinson, 2015). Les cellules dendritiques vont également activer les NK par contact direct via les récepteurs GITR-GITRL et LFA1-FC $\gamma$ R3A (Hanabuchi et al., 2006; Urlaub et al., 2017) (figure 5).

### **1.4.2.2 Interaction des cellules NK avec les cellules leucémiques**

Les cellules leucémiques peuvent présenter une diminution d'expression du CMHI à leur surface (Pende et al., 2002). Les cellules NK vont se lier et provoquer une réaction de lyse. Les récepteurs TRAIL et FasL se lient à leurs ligands, induisant la voie des récepteurs de mort. Il va y avoir, parallèlement, après stimulation de TRAIL/FasL, libération de protéines cytotoxiques (granzymes et perforine) et de TNF- $\alpha$  par la liaison des récepteurs NKG2D et DNAM-1 à leurs ligands MICA/B et Nectine2, voie de dégranulation (figure 5).



**Figure 5: Mécanisme d'activation d'une cellule NK par une cellule pDC, suivie de l'induction de la lyse des cellules leucémiques par une cellule NK activée.**

## 1.5 Leucémie aigüe lymphoblastique

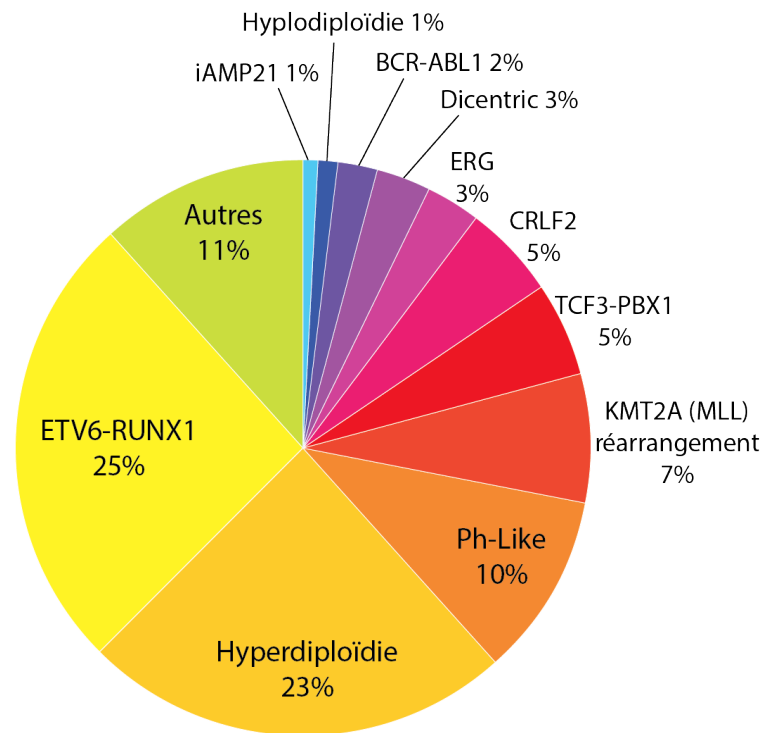
Les leucémies sont des cancers des cellules hématopoïétiques. Elles se définissent par le type de cellules affectées et la sévérité de leur développement. On distingue quatre principaux types de leucémies: la leucémie myéloïde aiguë (LMA), la leucémie myéloïde chronique (LMC), la leucémie lymphoblastique aiguë (LLA) et la leucémie lymphoblastique chronique (LLC). La LLA est le cancer le plus commun chez l'enfant, 75 à 80% des cas de leucémie. Malgré de nombreuses avancées, elle reste l'une des principales causes de mortalité en raison des rechutes qui peuvent atteindre 20%. La recherche de nouveaux traitements est donc primordiale.

### 1.5.1 Caractéristiques de la Leucémie Lymphoblastique aigüe

La LLA est un cancer à évolution rapide, qui correspond à une prolifération médullaire clonale à partir de la lignée lymphoïde. Il existe trois sous-types majeurs de LLA: la LLA à lymphocytes T, la LLA de type pre-B et la LLA des lymphocytes B matures. Les LLA de type pre-B sont les plus fréquentes. Les cellules immatures dites «blastés» sont bloquées à un stade indifférencié en raison d'un défaut au niveau de la transcription de gènes. En effet le développement des lymphocytes B dépend de facteurs de transcription menant à l'activation du programme « lignée B » et la désactivation de programme pour un autre destin cellulaire. Une altération des facteurs de transcription tels que IKZF1 (Ikaros Zinc finger protein1), TCF3 (Transcription factor 3), EGF1 (Epidermal growth factor 1) et PAX5 (Paired box gene 5) a été observée chez plusieurs lignées leucémiques (Fischer et al., 2015; Heltemes-Harris et al., 2011; Li et al., 2018). En présence de perturbations du programme génique les cellules leucémiques vont conserver leur capacité de division mais pas de différenciation. Les cellules leucémiques vont se multiplier et envahir la moelle osseuse, empêchant la production de cellules normales; ceci se traduit par une diminution des globules rouges, des cellules immunitaires et des plaquettes dans le sang des patients.

En plus de l'altération de ces facteurs de transcription, certaines aberrations chromosomiques peuvent être observées dans les lignées leucémiques. Les plus fréquentes étant l'hyperdiploïdie, 25 à 30% qui se caractérise par un gain notamment des chromosomes X, 4, 6, 10, 14, 17, 18 ou 21 (Paulsson and Johansson, 2009) et l'hypodiploïdie, qui se caractérise par un nombre de chromosome inférieur à 44. Ces patients présentent un risque d'échec thérapeutique plus grand. La translocation entre chromosomes est également observée (gain ou perte de segments chromosomiques), notamment entre les chromosomes. L'identification des signatures génétiques des LLA est importante pour déterminer le pronostic et ensuite adapter le traitement.

- 12 et 21, fusion des gènes ETV6-RUNX1 (Translocation-Ets-leukemia virus – Runt-related transcription factor 1)
- 1 et 19, fusion des gènes TCF3-PBX1 (Transcription factor 3 – PBX Homeobox 1)
- 12 et 22, MN1-ETV6 (Meningioma 1 – Translocation-Ets-leukemia virus)
- 9 et 22 «Chromosome Philadelphie», BCR-ABL1 (Breakpoint cluster region – Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1) (Jarosova et al., 2016; Terwilliger and Abdul-Hay, 2017) (figure 6).



**Figure 6: Fréquence des anomalies cytogénétiques et moléculaires chez les enfants atteints de LLA.** Adapté de (Pui et al., 2015).

### 1.5.2 Facteurs de risque

La LLA peut être déclenchée après une perturbation acquise qui correspond à une exposition environnementale. Les radiations, thérapeutiques ou ionisations, les pesticides, certaines infections virales et le tabagisme (Ji et al., 1997; Ma et al., 2002; Mahoney et al., 2004) sont des facteurs de prédisposition.

Elle peut également être déclenchée par des perturbations génétiques, dans ce cas, différents syndromes prédisposent au développement de LLA. Notamment, les mutations sur TP53 (tumor protein 53), syndrome de Li-Fraumeni (2-4% d'incidence), sur Nibrin syndrome de Nijmegen breakage (50% d'incidence), sur WAS, syndrome de Wiskott-Aldrich (13% d'incidence) ou encore la trisomie 21 (1-2% d'incidence) (Braun et al., 2014; Jongmans et al., 2010; Nigro et al., 1989; Varon et al., 2001).

### 1.5.3 Traitements

Le traitement de la leucémie dépend de plusieurs facteurs; le sous-type de LLA, l'anormalité chromosomique, s'il s'agit d'une rechute ou non, le sexe, l'origine ethnique,



l'âge du patient et l'état de santé général. Ils sont ensuite divisés en groupe de risque; un traitement plus léger sera administré à un sous-groupe ayant des caractéristiques favorables contrairement à un traitement intensif pour un sous-groupe ayant des caractéristiques défavorables (Hunger et al., 2013). Le traitement pour une LLA est fait par chimiothérapie. Le but est de tuer les cellules leucémiques blastiques dans le sang, la moelle osseuse et le liquide céphalo-rachidien. La chimiothérapie se divise en 2 phases de traitement. La phase d'induction de rémission qui a pour but d'induire la rémission complète, suivi de la thérapie post-induction qui se caractérise par une intensification et une consolidation du traitement. Ces phases combinent en général de 3 à 4 médicaments comprenant des corticostéroïdes (immunosuppresseurs), de la L-Asparaginase (privant les cellules leucémiques d'asparagine), de la Vincristine (empêche la division cellulaire par l'inhibition de la polymérisation des microtubules) et suivant la thérapie de l'Anthracycline (intercalant de l'ADN) (Gaynon et al., 1991). Cependant, malgré, les traitements 15 à 20% des patients présentant une rémission initiale complète vont rechuter.

#### **1.5.4 Rechute leucémique**

Malgré une rémission visible la détection des cellules leucémiques reste une limite. En effet la détection peut laisser passer des cellules leucémiques résiduelles et favoriser la rechute. Il s'agit donc d'évaluer la maladie résiduelle minimale (MRD). Pour cela, différentes techniques de détection sont utilisées. La détection optique à l'aide d'un microscope a une sensibilité de 1 cellule leucémique sur 20. L'analyse par PCR des ARN messagers de fusions chromosomiques possèdent une sensibilité supérieure à 1 cellule sur 100 000 (van Dongen et al., 1998). Le risque de rechute leucémique dépend également du sous-type de LLA. Si les cellules ne sont pas détectées et que la rechute apparaît, la seule alternative thérapeutique pour ces patients pédiatriques est la transplantation de cellules souches hématopoïétiques.

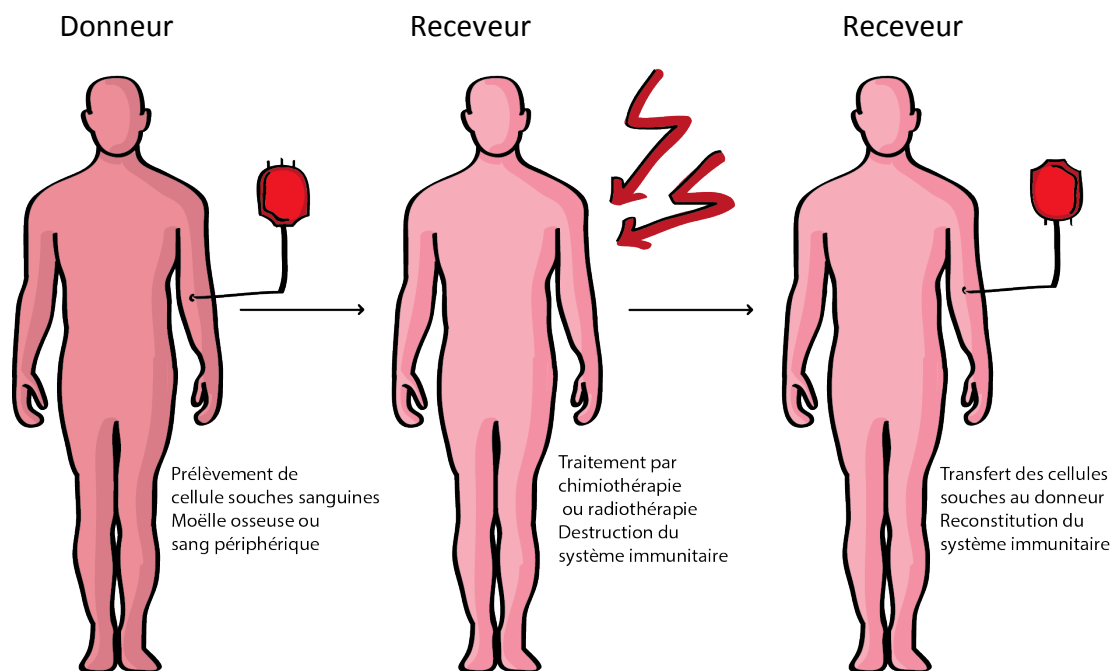
### **1.6 Greffe de cellules souches hématopoïétiques**

#### **1.6.1 La greffe**

La greffe de cellules souches hématopoïétiques permet une sorte de remise à zéro du système sanguin et immunitaire. La transplantation se divise en 4 phases : la phase de

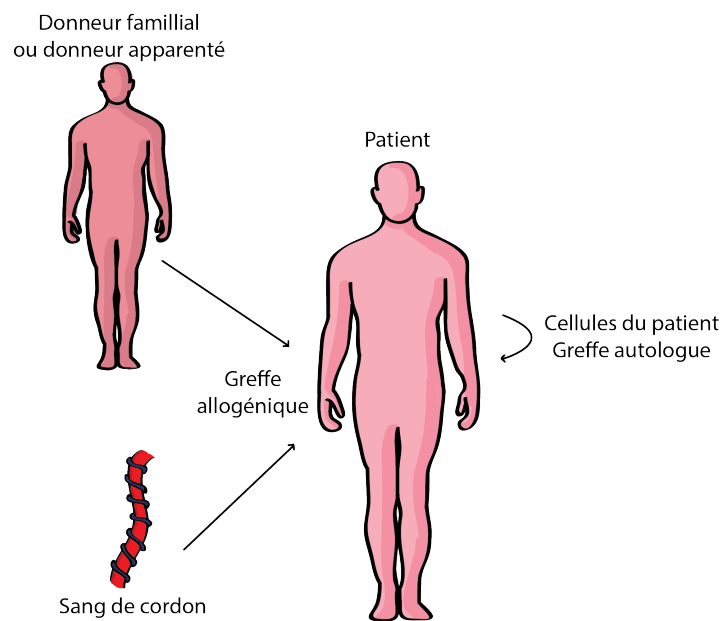
conditionnement, la phase de transplantation et la phase post-greffe contenant les phases de neutropénie et de prise du greffon.

Au cours de la phase de conditionnement, le patient va subir une chimiothérapie ou radiothérapie intense qui dure généralement 1 semaine et qui a pour but de détruire les cellules leucémiques. Malheureusement, les cellules souches hématopoïétiques saines sont aussi détruites par la chimiothérapie intensive. La phase de transplantation consiste à transfuser des cellules souches hématopoïétiques saines prélevées d'un donneur compatible. La troisième phase, neutropénie, correspond à la phase d'immunosuppression sévère, le patient est sans défense pendant 2 à 4 semaines. Cette phase est critique puisque les patients sont sujets aux infections (virales, bactériennes, fongiques). Ensuite, la phase de prise de greffe survient et le système immunitaire se reconstruit à partir des cellules souches du donneur. Les cellules T matures, du greffon peuvent provoquer l'effet du greffon contre l'hôte (GvhD). Les cellules T du greffon s'activent contre les antigènes du patient et causent des dommages aux organes, ce qui implique une prise de médicaments immunosuppresseurs, retardant en même temps la reconstitution du système immunitaire. La phase post-greffe, est une période où la reconstitution immunitaire n'est pas totalement terminée, la fonction des lymphocytes T demeure faible durant cette période. Cette phase peut durer plusieurs mois ou années, dépendant du type cellulaire, jusqu'à la reconstitution complète du nouveau système immunitaire (Moore and Sakamoto, 2005) (figure 7).



**Figure 7: Greffe de cellules souches hématopoïétiques dans le traitement de la LLA.**

Le prélèvement des cellules souches se fait principalement dans la moelle osseuse au niveau des os du bassin ou à partir de sang de cordon ombilicale. Il existe 2 types de greffes ; la greffe autologue (en provenance du patient lui-même) et la greffe allogénique, prélevée à partir d'un donneur. Dans un contexte allogénique, on privilégie les donneurs familiaux. En absence de donneur familiaux, le greffon peut provenir d'un inconnu, en provenance d'une banque de donneurs internationaux ou à partir d'une banque de cordon ombilical (Ljungman et al., 2006) (figure 8).



**Figure 8: Types de greffes de cellules souches hématopoïétiques.**

### 1.6.2 Reconstitution du système immunitaire

La reconstitution après greffe de cellules souches hématopoïétiques se déroule en deux phases: La première phase correspond à une prolifération massive de cellules NK qui retrouvent un taux normal 1 mois après la greffe (Charrier et al., 2013). Durant cette période le receveur peut être sujet à de nombreuses infections, bactériennes, virales et fongiques ainsi qu'à une GvHD aigue potentiellement dangereuse jusqu'à 100 jours. Puis, lors de la deuxième phase il y a une reconstitution des lymphocytes T et B atteignant des niveaux normaux après 6 à 9 mois ainsi qu'une susceptibilité au virus VZV (virus varicelle-zona) plus élevée (Danby and Rocha, 2014; Merindol et al., 2012).

Dans la reconstitution du système immunitaire, les cellules immunocompétences, grâce à leur alloréactivité contre les cellules du patient, vont aussi éliminer les cellules

leucémiques résiduelles. La réaction «greffe contre leucémie» (GvL), peut cependant se développer en effet «greffe contre l'hôte» (GvHD) et attaquer les cellules saines du patient. Elle apparaît dans 50% à 70% des cas de transplantation allogénique (Kuba and Raida, 2018). Cet effet va dépendre de l'histocompatibilité déterminé par le système HLA (antigène des leucocytes humains), marqueur génétique de la compatibilité tissulaire humaine, propre à chacun. Ces protéines sont encodées par le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) dont il existe deux classes: HLA-A/B/C (CMH classe I) et DP, DQ et DR (CMH class II). Le CMH I présentent des peptides endogènes du «soi», exprimées sur toutes les cellules nucléées, reconnus par les cellules NK et lymphocytes T CD8 (cluster de différenciation 8). Le CMH II présentent des peptides exogènes «non soi» exprimées sur les cellules présentatrices d'antigènes aux cellules T CD4 (Charles A Janeway et al., 2001). Pour effectuer une greffe de cellules souches, il s'agit de déterminer la plus grande compatibilité HLA possible afin de diminuer les risques de GvHD mais avec une différence suffisante provoquant l'effet GvL, (généralement les greffes sont HLA compatibles) (Kolb, 2008), médié principalement par les cellules NK et les cellules T (Kanda, 2013; Morishima et al., 2016).

Les cellules NK, présentent un développement en deux étapes. Une étude de 2013 montre qu'initialement les NK CD56<sup>bright</sup> sont élevées puis diminuent au cours de la première année post-greffe laissant place au cellules NK CD56<sup>dim</sup>. De plus, les cellules NK exprimant les récepteurs de types KIR<sup>+</sup> (récepteurs analogues aux immunoglobulines tueuses) ont augmenté pendant la reconstitution (Charrier et al., 2013). L'acquisition de tous les marqueurs de surface prend 3 à 6 mois et la production de cytokines par les cellules NK est décalée par rapport à leurs fonctionnalités. Il y a également une réduction de la production d'IFN- $\gamma$  (Interféron- $\gamma$ ), lors de la diminution de l'expression t-bet (facteur de transcription T-box) (Ullah et al., 2016).

Effet GvL des cellules NK. Lors d'une greffe, les cellules NK du greffon peuvent participer à l'effet GvL précoce (Verneris, 2013). En effet, les cellules du patient, n'exprimant pas les marqueurs du CMH I (notamment HLA-C1, HLA-C2 et HLA-Bw4) correspondants aux récepteurs KIR (KIR2DL2/3, KIR2DL1 et KIR3DL1) des cellules NK dérivées du donneur, vont être ciblées. Le développement de cellules NK alloréactives permet donc un effet GvL fort (Zeis et al., 1997). De plus, la population de NK étant une population hétérogène, une étude a mis en lumière un sous-ensemble de cellules NK, c-kit- (récepteur du facteur de

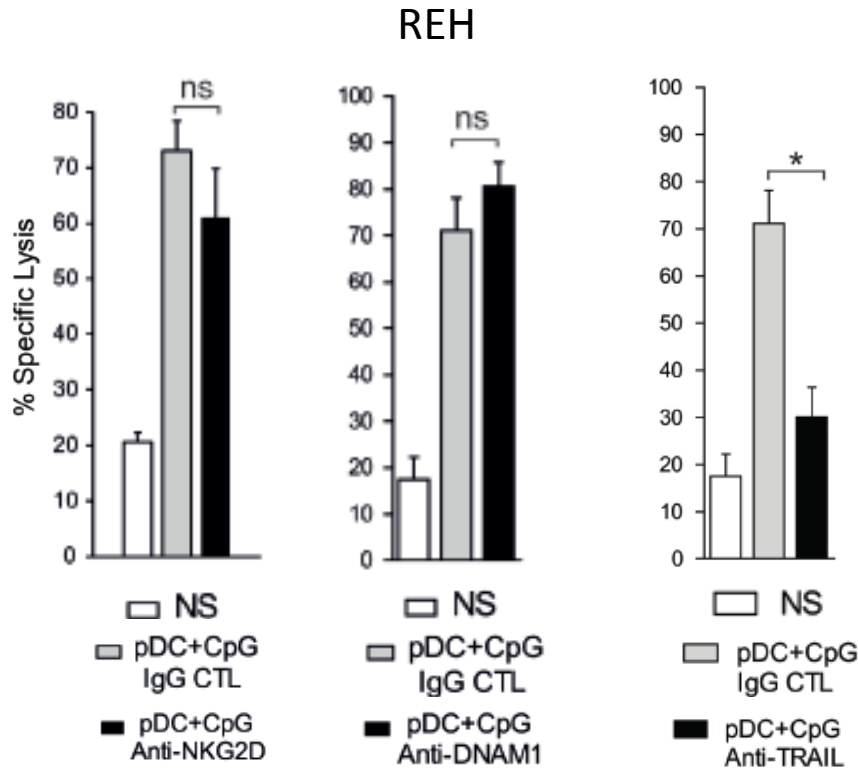
croissance de cellule souche), CD27- (récepteur de facteur de nécrose tumorale) et CD11b+ (intégrine et cluster de différenciation), supportant l'effet GvL et la migration vers les organes cibles (Meinhardt et al., 2015). Or des études menées par notre laboratoire ont montré une résistance des LLA (patients adultes), contrairement aux AML, aux NK après greffe. Ces lignées présentaient une déficience en LFA-1 (intégrine essentielle pour la cytotoxicité des NK). Il apparaît donc essentiel de développer des outils d'amplification de cette réponse NK-GvL (Ruggeri et al., 1999).

### **1.6.3 Différents mécanismes de lyse des lignées cellulaires LLA**

Dans cette étude les lignées cellulaires REH, Nalm6 et 697 sont étudiées. Elles présentent certains avantages. La lignée REH est une lignée sensible qui ne présente pas de mutation, elle a un temps de division de 70h (Rosenfeld et al., 1977). La lignée Nalm6, sensible à la lyse médiée par les NK, suite à des expériences réalisées au laboratoire, présente une expression plus élevée de NKG2D. Elle a un temps de division de 36h (Hurwitz et al., 1979). Ces deux lignées permettent une étude claire des mutants KO par leurs sensibilités à la lyse médiée par les NK. La lignée 697, résistante à la lyse médiée par les NK, présente une expression réduite de TRAIL-R2 (expériences réalisées au laboratoire) (Herblot et al., non publié). Elle a un temps de division de 30-40h (Findley et al., 1982). Par ses caractéristiques, elle est une cible idéale au développement de traitement à effets épigénétiques.

#### **1.6.3.1 Lignée REH**

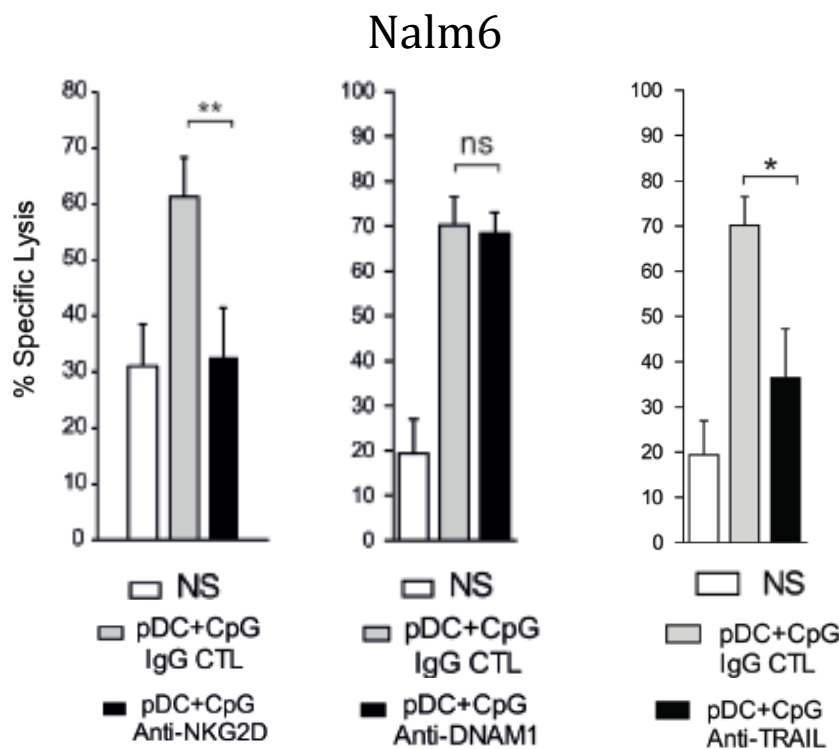
Les voies d'apoptose de la lignée REH ont été testées. Ces expériences ont mis en lumière l'utilisation de la voie TRAIL dans le processus d'apoptose de la lignée REH contrairement au blocage par anticorps de NKG2D ou DNAM-1 qui ne diminue pas la lyse des cellules leucémiques REH médiée par des cellules NK activées (figure 9).



**Figure 9: Lyse REH sensible à la voie des récepteurs de mort.** Les récepteurs NKG2D, DNAM-1 et TRAIL ont été bloqués par des anticorps monoclonaux spécifiques. La lyse, médiée par des NK activées par des cellules pDC, a été suivie par cytométrie en flux, au ratio 5:1. 5 cellules NK pour 1 cellule leucémique. La lyse est réduite spécifiquement en présence de l'anticorps anti-TRAIL (Lelaidier et al., 2015).

### 1.6.3.2 Lignée Nalm6

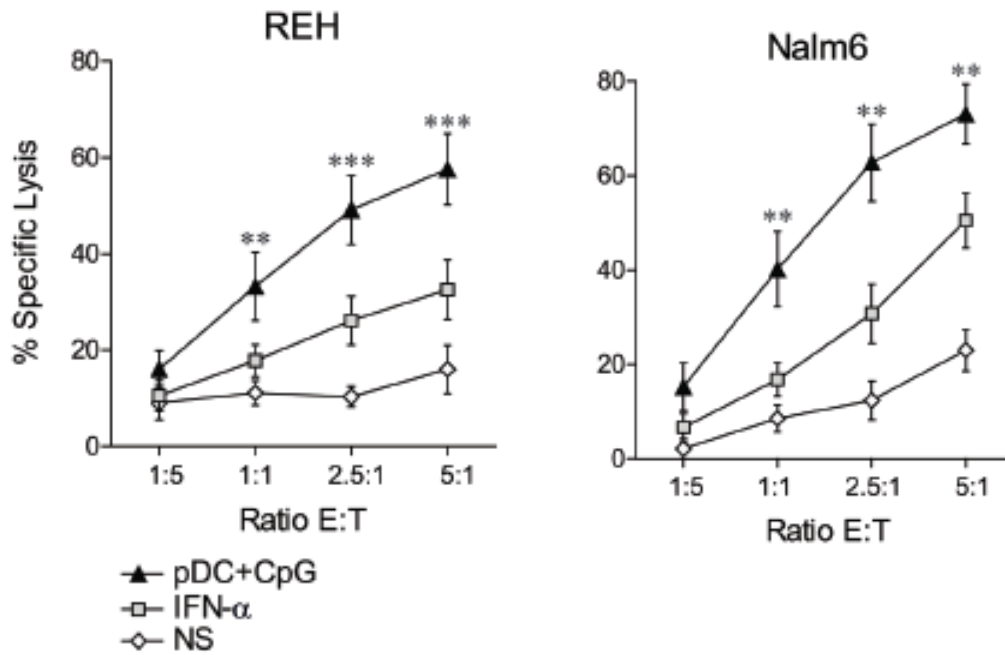
Parallèlement la lignée Nalm6 a été testée pour NKG2D, DNAM-1 et TRAIL. Contrairement à la lignée REH, la lignée Nalm6 présente une diminution importante de la lyse cellulaire, en absence de NKG2D et de TRAIL. Cette lignée a une lyse cellulaire médiée par la voie de TRAIL et de dégranulation via NKG2D. Les mécanismes de lyse cellulaire de cette lignée incluent, la voie d'apoptose induite par TRAIL et la dégranulation induite par le récepteur NKG2D (figure 10).



**Figure 10: Lyse Nalm6 sensible à la voie des récepteurs de mort et des voies de dégranulation.** Les récepteurs NKG2D, DNAM-1 et TRAIL ont été bloqués par des anticorps monoclonaux spécifiques. La lyse, médiée par des NK activées par des cellules pDC, a été suivie par cytométrie en flux, au ratio 5:1. 5 cellules NK pour 1 cellule leucémique (Lelaidier et al., 2015).

#### 1.6.4 Etudes menées *in vitro*

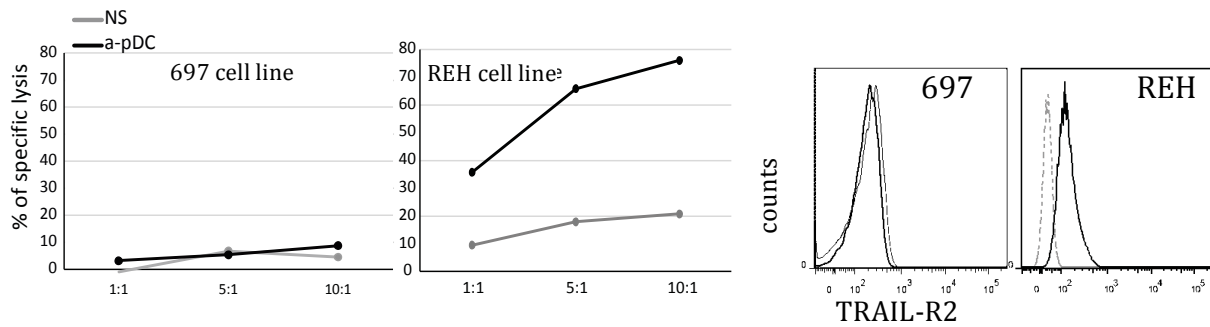
Des études récentes ont montré que des lignées leucémiques pouvaient avoir des sensibilités différentes à la lyse médiée par les cellules NK. L'étude *in vitro* (Lelaidier et al., 2015), sur les lignées REH et Nalm6 montre une lyse importante des cellules leucémiques en présence de NK activées par des pDC eux-mêmes stimulés sur leurs récepteurs TLR9 par un motif CpG. De plus, la lyse est plus importante avec des NK stimulées par des pDC que par de l'IFN- $\alpha$  seul (figure 11).



**Figure 11: La stimulation des cellules NK par les pDC activées par le TLR9 (médiée par l'IFN- $\alpha$ ) surpasse la résistance des LLA.** Cellules NK stimulées ou non, pendant 12h par des pDC activées. Des tests cytotoxiques ont ensuite été effectués contre les lignées REH et Nalm6. Les NK utilisées en contrôle ont été stimulées avec de l'IFN- $\alpha$  ou non stimulées (Lelaidier et al., 2015).

Cependant, dû à des différences dans l'expression génique et dans les modifications épigénétiques certaines lignées leucémiques restent résistantes à la lyse médiée par les NK activées par les pDC. En effet des résultats obtenus au laboratoire montrent une absence de lyse de la lignée 697 n'exprimant pas TRAIL-R2 (figure 12).

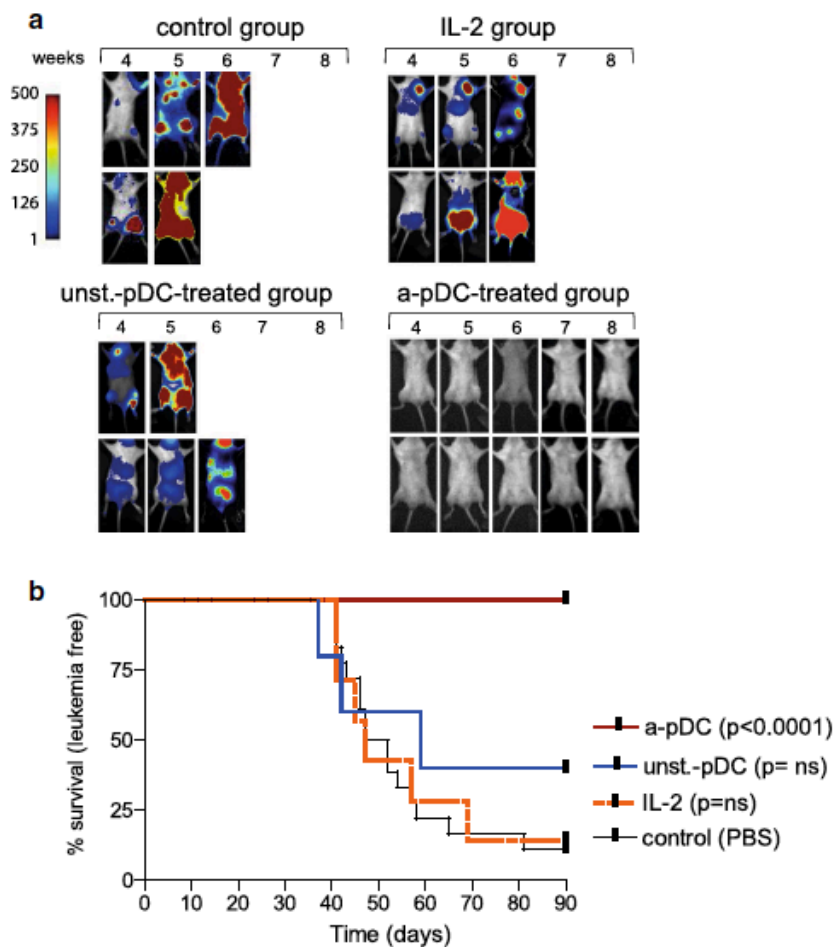




**Figure 12: Tests cytotoxiques *in vitro* sur la lignée 697 et REH.** Les deux lignées sont mises en contact avec des cellules NK activées par des pDC (ou NK non activées pour les contrôles), la lyse a été suivie par cytométrie en flux. La lignée 697 observée comparée la lignée REH, a une expression de TRAIL-R2 réduite. Trail-R2 a été évaluée par cytométrie en flux sur les deux lignées (Herblot et al., non publié).

### 1.6.5 Études menées *in vivo*

Ces tests ont également été menés *in vivo*. Des souris NSG, (Souris gamma sous fond NOD/SCID, dépourvues de cellules T matures, B et NK) (Puchalapalli et al., 2016) nouveau-nées ont été irradiées et greffées avec des cellules CD34<sup>+</sup> de sang de cordon. Les cellules NK humaines se développent dans ces souris humanisées grâce à l'injection d'IL-15 recombinante humaine. La lignée de LLA REH a été injectée à ces souris humanisées. Les souris ont été traitées par des injections de pDC activées ou non, de l'IL-2, ou de la solution saline en contrôle. Les souris traitées avec les pDC activées n'ont pas développé la leucémie contrairement aux souris contrôles (85%), ou les souris traitées par l'IL-2 ou les pDC non activées. La leucémie se développait à la même cinétique en présence d'IL2 et de pDC non activées que dans le groupe contrôle. Ces résultats confirment donc que les pDC activées sont un outil thérapeutique prometteur pour stimuler l'effet anti-leucémique médié par les cellules NK (figure 13).



**Figure 13: L'injection de pDC activées prévient le développement des LLA chez des souris humanisées.** a. Des souris NSG ont reçu la lignée REH, 48h après, des pDC activées par du CpG-A, ou non, sont injectées 1 fois par semaine pendant 5 semaines. Les souris sont suivies par bioluminescence. b. Courbe de survie des souris en présence de cellules leucémiques (Díaz-Rodríguez et al., 2017)

## 1.7 Mécanismes épigénétiques

### 1.7.1 Concept

Les mécanismes épigénétiques regroupent les modifications réversibles et transmissibles de l'expression des gènes sans altération de la séquence d'ADN. La structure moléculaire de l'ADN reste la même dans toutes les cellules alors que la composante épigénétique est réversible et variable, suivant le type cellulaire. Les modifications peuvent se faire au moment de la transcription, post-transcription, traduction et post-traduction, sur le

brin d'ADN, sur les protéines de liaison à l'ADN ou sur les histones (Moosavi and Ardekani, 2016). Il existe trois grands types de modifications épigénétiques : modification de la structure de la chromatine (méthylation de l'ADN), modification des histones et action des micro ARN.

### **1.7.2 Structure de la chromatine**

La chromatine est une structure complexe constituée d'ADN et de protéines (histones ou non histones). Elle possède une organisation dynamique qui va permettre l'accessibilité de l'ADN pour tous les processus de réplication, réparation, recombinaison et transcription, malgré sa grande compaction. L'euchromatine, contenant la portion active des gènes, est moins condensée et facilitera l'expression génique, alors que l'hétérochromatine, plus dense, est moins accessible. Les changements épigénétiques vont modifier la structure de la chromatine et rendre accessible des gènes aux facteurs de transcription.

L'ADN est donc une structure très compactée. Elle va être enroulée autour d'histones formant le nucléosome, qui enroulés sur eux-mêmes vont former des boucles, pour former les chromosomes. Le nucléosome représente le premier niveau de compaction de l'ADN. 8 protéines d'histones (2xH2A, 2xH2B, 2xH3 et 2xH4), formant un octamère, vont entourer une centaine de paires de bases d'ADN et l'histone H1 va stabiliser cet enroulement.

La dynamique de la chromatine va dépendre de la modification de la partie N-terminale (queues d'histones) des 8 histones ou C-terminale des histones H2A et H2B. En effet la chromatine joue un rôle dans le maintien, ou non, de la condensation et dans l'interaction internucléosomale. De plus, ces modifications sont covalentes (stables) mais réversibles (Morales et al., 2001). Les plus courantes sont: la phosphorylation, l'acétylation, la méthylation et l'ubiquitination, chacune étant médiée par des enzymes spécifiques. Il existe trois fonctions d'enzymes liées aux modifications des histones: Les modifications post-translacionnelles sont encryptées par les «writers», les retraits des modifications sont réalisés par les «erasers» et la reconnaissance des modifications est effectuée par les «readers» (Tarakhovsky, 2010).

**Phosphorylation:** La phosphorylation des histones va se faire sur des résidus lysines ou arginines en un, deux ou trois exemplaires, activant ou réprimant l'activité génique (Smith and Denu, 2009). Elle est réalisée par des enzymes «histones kinases».

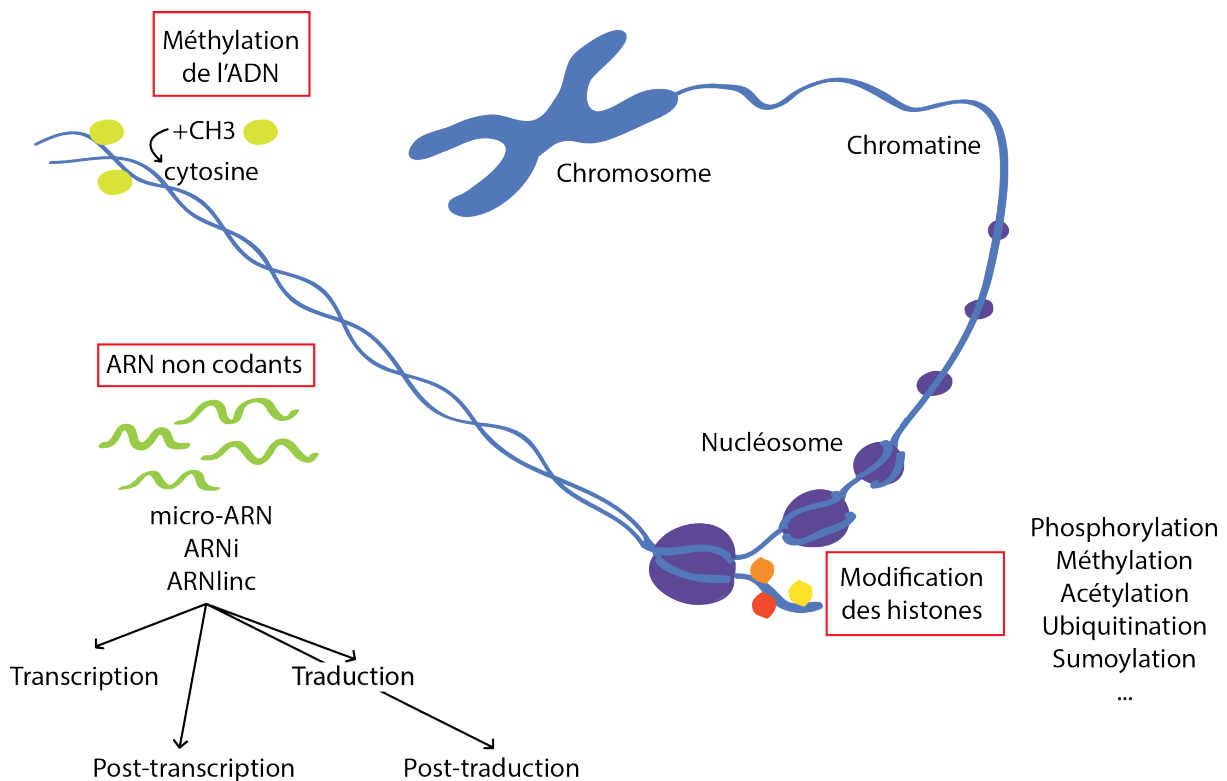
**Acétylation:** L'acétylation va se faire sur les résidus lysines par des «enzymes histones acétyl transférases» (HAT). L'acétylation sur la queue N-terminale entraîne une neutralisation des charges positives des histones et donc une décondensation de l'ADN (chargé négativement) et un accès aux gènes, modifiant ainsi leurs expressions vers la transcription. Par opposition, les «histones déacétylases» (HDAC) sont associées à l'inhibition de la transcription des gènes. De plus, l'altération d'enzymes HAT implique des acétylations et expressions géniques aberrantes pouvant être liées au développement de cancers comme la LLA (Zhang et al., 2015). L'acétylation va provoquer le recrutement de protéines de remodelage de la chromatine à bromodomains, comme SWI/SNF (SWItch/Sucrose Non-Fermentable), entrant en compétition avec la méthylation de l'ADN.

**Méthylation:** La méthylation peut également être associée à de la transcription ou de l'inhibition de gènes et est réalisée par des histones méthyltransférases. Par exemple, la triméthylation de l'histone H3 à la lysine 4 (H3K4me3) active la transcription des gènes et est souvent retrouvée près des régions promotrices. Au contraire la diméthylation de la lysine 9 (H3K9me2) va être généralement associée à l'inhibition de la transcription de gènes.

**Ubiquitination:** L'ubiquitination peut se faire par les «enzymes ubiquitine ligases» ou se défaire par les «enzymes déubiquitinases». C'est une modification post-traductionnelle importante en présence de dommages à l'ADN et qui permet la recombinaison homologue (Uckelmann and Sixma, 2017).

**Méthylation de l'ADN:** La méthylation de l'ADN est généralement liée à la répression de l'expression génique. Elle se fait majoritairement sur les cytosines suivies d'une guanine (CpG). Elle correspond à une addition d'un résidu méthyl-CH<sub>3</sub> sur la cytosine en carbone 5 (C5). Pour cela, les DNMT (DNMT1/3A/3A2/3B) vont lier le C6 et le S-adénosylméthionine (SAM) va donner le groupement méthyl et devenir S-adénosylhomocystéine (SAH). Une fois le CH<sub>3</sub> couplé, le DNMT et le SAH sont libérés du sites de méthylation (Dhe-Paganon et al., 2011).

Les dinucléotides CpG sont des séquences répétées, formées essentiellement en îlots et situées entre autres dans les régions de promoteurs. Ces îlots sont généralement non méthylés dans les régions actives du génome alors qu'ils sont méthylés dans les régions non codantes. La méthylation au niveau de ces motifs va dépendre en partie du tissu (Strichman-Almashanu et al., 2002). Une étude montre que la méthylation de ces îlots peut être corrélée au pronostic de survie des patients pédiatriques atteints de LLA (Chaber et al., 2017). En effet, dans 86,6% des cas, les sites méthylés associés aux promoteurs étaient hyper méthylés dans les cellules de LLA précurseurs B. Plusieurs de ces sites étaient associés à un pronostic à haut risque, notamment au niveau du gène MBP (protéine basique myéline, présente dans l'immunité innée) et PSMF1 (inhibiteur d'activation de protéasome) (Chaber et al., 2017). L'expression génique est associée aux cytosines non méthylées et histones acétylées au niveau du promoteur. La répression est normalement associée aux cytosines méthylées et histones déacétylées. Ces trois processus de modifications épigénétiques (figure 14) peuvent à la fois être dépendants et indépendants (l'un pouvant induire l'autre).



**Figure 14: Les 3 grands mécanismes épigénétiques.** La méthylation de l'ADN (ajout de CH<sub>3</sub> en C5 – cytosine), l'action des micro-ARN (dans la transcription, post-transcription,

traduction, post-traduction) et la modification des histones (Phosphorylation, Méthylation, Acétylation, Ubiquitination, Sumoylation).

### **1.7.3 L'épigénétique des cellules leucémiques**

Une étude réalisée en 2013, a effectué une analyse d'expression génique et de méthylation de CpG sur le génome de 137 cas de LLA-B pédiatriques (Figuroa et al., 2013). Ils ont pu mettre en lumière des signatures spécifiques où la méthylation de l'ADN corrélait avec celle de l'expression génique. L'analyse de lignées leucémiques comparées aux cellules B normales a montré 1266 régions hyperméthylées et 542 régions hypométhylées (Figuroa et al., 2013). L'hypo- ou l'hyper-méthylation des régions dépend du sous-type de LLA. Le sous-type ETV6-RUNX1 présente des changements de méthylation plus faible, 158 régions hyperméthylées, 272 régions hypométhylées. Le sous type LLA hyperdiploïdique a 84 régions hyperméthylées et 635 hypométhylées. Une grande partie des méthylations aberrantes sont retrouvées, similairement, au niveau des promoteurs des gènes du cycle cellulaire ou de l'apoptose (BPI, CASP8AP2, CCL25, FAAH, HRK, PAX8) (Milani et al., 2010). L'identification des marqueurs, des sous-types de LLA, permet un meilleur diagnostique et pronostique de la maladie.

La méthylation de l'ADN et la déacétylation des histones, réprimant la transcription des gènes, sont donc des cibles potentielles dans le traitement de la LLA. Pour cette raison, des inhibiteurs développés et d'autres en cours de développement, sont utilisés en thérapie et dans l'étude que j'ai menée.

### **1.7.4 Décitabine et Vorinostat**

Dans mes recherches, deux drogues épigénétiques sont utilisées. La Décitabine, inhibiteur des ADN méthyltransférases, et le Vorinostat, inhibiteur des histones déacétylases. La Décitabine, (5-aza-2'-désoxycytidine), est un médicament déjà utilisé dans le traitement de la leucémie. Elle est, en général chez l'enfant, administrée par voie intraveineuse à des concentrations moyennes de 10 à 20 mg/m<sup>2</sup>/jour durant 5 jours en cycle de 28 jours, en combinaison ou non avec d'autres drogues. Selon le type de tumeur, elle peut être administrée

de 2 à 90 mg/m<sup>2</sup>/jour (Nie et al., 2014). Elle a une demi-vie de 15 à 25 minutes (Benton et al., 2014; Momparler, 2005; Phillips et al., 2013). Une fois incorporée, elle va être phosphorylée et va modifier le carbone 5 de la cystéine en azote (N) se liant de manière covalente aux DNMTs, empêchant leurs liaisons. Ce blocage conduit une déméthylation passive durant la phase S du cycle cellulaire (Stresemann and Lyko, 2008). De plus, une étude menée, sur des cellules ML-2 (temps de division de 60h), a montré une incorporation de la Décitabine (100 nM) après 9h (Öz et al., 2014).

*In vitro*, elle induit une diminution de la prolifération des cellules leucémique, à 500 et 1000 nM. *In vivo* elle ralentit la progression de la leucémie et réduit la fréquence des blastes BCP-ALL (Leucémie lymphoblastique aigue à précurseur cellules-B). (Roelf et al., 2018). Ce qui en fait une drogue de premier plan dans les traitements par effets épigénétiques. De plus, dans le neuroblastome, la Décitabine, à 5 mg/m<sup>2</sup>/jour durant 7 jours, en combinaison avec la Doxorubicine (agent intercalant de l'ADN) montre une myelosuppression (Nie et al., 2014). D'autres observations, réalisées sur le cancer du sein montrent un arrêt de la progression, dans 35% des patients, par un traitement à la Décitabine à 10 mg/m<sup>2</sup>/jour durant 5 jours suivi d'un traitement au Carboplatin (agent alkylant créant des ponts inter- et intra- brins) (Matei et al., 2012).

Le Vorinostat, hydroxamate, est un inhibiteur d'histones déacétylases également utilisé dans le traitement de la leucémie. Elle est administrée par voie orale à 230 mg/m<sup>2</sup>. Cette drogue est utilisée dans plusieurs études, elle montre une efficacité, dans la lyse des cellules LLA précurseur B chez l'enfant, ou une efficacité en combinaison avec la drogue methotrexate ou Décitabine (Burke et al., 2014; Einsiedel et al., 2006; Leclerc et al., 2010). Le Vorinostat va chelater l'ion zinc au centre des HDAC, ce qui va inhiber leur activité. *In vitro*, le Vorinostat diminue la prolifération des cellules leucémiques (Beagle et al., 2015). De plus, en synergie avec la Décitabine, le Vorinostat diminue la viabilité cellulaire dans les lignées AML et démontre un effet bénéfique clinique chez les patients en rechute (Burke et al., 2014; Young et al., 2017).

Des expériences préliminaires, conduites dans notre laboratoire, montrent une survie plus importante des souris NSG (porteuses de la leucémie aigue lymphoblastique résiduelle) traitées à la Décitabine et Vorinostat. De plus, des blasts de patients, testés *in vitro*, présentent une lyse cellulaire plus importante en présence des deux drogues épigénétiques (Herblot., et al. non publié).

## 2. Projet de recherche

### Hypothèse

Encore aujourd'hui 20% des enfants atteints de LLA rechutent après traitement de chimiothérapie. La transplantation de cellules souches hématopoïétiques reste la seule alternative thérapeutique mais son efficacité dépend de la reconstitution du système immunitaire et de l'effet GvL. Pour prévenir les rechutes leucémiques chez les patients greffés, nous proposons de stimuler les cellules immunitaires dérivées des cellules souches du donneur pour éradiquer la maladie minimale résiduelle. Cette stimulation est induite par le transfert adoptif de pDC activées, qui vont augmenter les fonctions anti-leucémiques des cellules NK. Bien que la majorité des lignées leucémiques sont sensibles à cette approche, certaines lignées sont plus résistantes.

Nous faisons l'hypothèse que la détermination des mécanismes de lyse des cellules LLA (par les cellules NK activées par les pDC) permettra de déterminer des critères de sensibilité spécifiques des LLA et qu'un prétraitement des cellules leucémiques avec des agents perturbateurs permettra d'augmenter la sensibilité des lignées réfractaires. Cela, grâce à la réexpression génique de récepteurs activateurs des cellules NK ou de récepteurs de mort cellulaire.

### Objectifs:

- Caractériser la voie d'apoptose médiée par les cellules NK activées par les pDC. Les lignées REH et Nalm6, par la technique de CRISP-Cas9, sont dépourvues des gènes Trail-R1, Trail-R2, caspase 8 (voie des récepteurs de mort) et de caspase 9 (voie mitochondriale), et utilisées en test cytotoxique *in vitro*.
- Tester les effets de la Décitabine et du Vorinostat sur la lignée 697, résistante, en présence des cellules NK activées par les pDC. Des tests de cytotoxicité, d'expression de marqueurs et de méthylation de l'ADN, seront réalisés.



## Expérimentation

L'étude a été essentiellement menée par cytométrie en flux et en cytométrie en flux à haut débit. Trois lignées leucémiques humaines ont été utilisées: les cellules REH, les cellules Nalm6 et les cellules 697. Ces lignées ont été mises en contact avec des cellules NK activées, isolées à partir de sang périphérique. Les cellules NK ont été activées par les pDC isolées du sang périphérique, ou dérivées de cellules CD34+ de sang de cordon. La lignée résistante 697 a également été mise en contact préalablement avec la Décitabine et le Vorinostat, puis testée en cytotoxicité avec des cellules NK activées. Les tests d'expression de marqueurs (ULBP1/2, MICA/B, HLA A/B/C et TRAIL-R1/R2) ont, également, été réalisés par cytométrie en flux.

### 3. Matériels et Méthodes

#### 3.1 Lignées cellulaires

Toutes les cellules utilisées sont des lignées de cellules de LLA (tableau 2).

REH: Cellules dérivées de précurseurs de cellules B avec une translocation chromosomiques t(12;21) TEL/AML1. Isolées à partir d'une patiente en rechute leucémique, sur sang périphérique (jeune fille de 15 ans) en 1974. Cette lignée a été obtenue à partir d'ATCC (Global Bioresource Center). La lignée REH-GFP a été transduite avec un rétrovirus exprimant la GFP, la lignée est traçable par cytométrie en flux.

Nalm6: Cellules dérivées de précurseurs de cellules B (BCP) t(5 ;12). Isolées à partir de sang périphérique (jeune homme de 19 ans) en 1976. Cette lignée a été obtenue à partir d'ATCC (Global Bioresource Center).

697: Cellules dérivées de précurseurs de cellules B (BCP) avec un réarrangement chromosomiques t(1;19)(q23;p13) E2A/PBX1. Isolées à partir d'un patient en rechute leucémique, sur moelle osseuse (jeune homme de 12 ans) en 1979. Elle est caractérisée par une absence d'expression de DR5 (TRAIL-R2). Cette lignée a été obtenue à partir d'ATCC (Global Bioresource Center).

**Tableau 2: Lignées cellulaires utilisées au cours de cette étude**

|                |                  |     |
|----------------|------------------|-----|
| REH            | Nalm6            | 697 |
| REH-GFP        | Nalm6-Caspase8KO |     |
| REH-Caspase8KO | Nalm6-Caspase9KO |     |
| REH-Caspase9KO | Nalm6-TRAIL-R1KO |     |
| REH-TRAIL-R1KO | Nalm6-TRAIL-R2KO |     |
| REH-TRAIL-R2KO |                  |     |

Les lignées sont maintenues en culture dans du milieu RPMI (Wisent, Saint-Bruno, QC) additionné de 10% de FBS inactivé (Wisent) à 37°C avec 5% de CO<sub>2</sub>. Elles sont diluées tous les deux jours à une concentration de  $0,2 \times 10^6$  cellules/ml dans un volume final de 15 ml en flasque T75 ou dans 5 ml en flasque T25.

## **3.2 Délétion des gènes impliqu es dans les voies d'apoptose dans les lignées de LLA**

Les gènes Caspase 9 et Caspase 8 ont été délétés dans les cellules REH selon un protocole établi par le laboratoire du Dr. Elie Haddad (centre de recherche du CHU Sainte-Justine). Les lignées ont été construites par transduction lentivirale. La production de lentivirus se fait avec la lignée 293T, à confluence 80% (cellules isol es à partir de rein embryonnaire). Elles sont ensuite transfect es par la méthode de précipitation au phosphate de calcium. La séquence guide est int gr e dans un plasmide, HIV vector   8,6  g (pLG-puro-CASP9\_sgE3\_1). Les plasmides accessoires psPAX2 et pMD2.G sont ajoutés à 8,6  g et 7  g.

Les cellules sont ensuite incubées une nuit. Le lendemain le milieu est changé avec de l'Opti-mem (GIBCO) additionné de PenStrep (GIBCO). Après 48h, le milieu de culture est récupéré, filtré et les lentivirus sont concentrés. Les lentivirus sont ensuite ajoutés aux cellules d'intérêt, ici REH (  confluence 80%), additionné de sulfate de protamine 8  g/ml. Après 3 jours, les cellules transfect es sont s lectionn es par ajout de puromycine 5  g/ml (Santa-Cruz SC-108071) pendant 1 semaine. Une fois à confluence optimale ( $1 \times 10^6$  cellules /ml). Les cellules sont tri es en plaque de 96 puits, par cytométrie, dans 50  l de FBS par puits, puis 50  l de RPMI 10% FBS après le tri. Le milieu est changé chaque semaine jusqu'à confluence. Les clones sélectionnés, 15 en moyenne, sont testés par western blot. Les gènes codant pour TRAIL-R1, TRAIL-R2 ont été délétés dans les lignées REH, Nalm6 et KOPN8, ainsi que les gènes Caspase-8 et Caspase-9 dans la lignée Nalm6, selon un protocole similaire, par la plateforme d'édition génique du CHU Ste-Justine dirig e par le Dr. Christian Beauséjour.

## **3.3 Western blot**

Les cellules des lignes leucémiques ont été misent en culture en flasque T75. Les cellules ont ensuite été r cup r es et lysées par un tampon spécifique (75mM de HEPES, 150mM de KCl, 2mM de MgCl<sub>2</sub>, 5% de gly cerol, 0,20% de triton X-100, 1mM de DTT (dithiothreitol) et enfin 10ml de ddH<sub>2</sub>O) plus 1 tablette d'inhibiteur de protéase (Roche).

Ensuite, les protéines ont été dosées par le protocole de Bradford (Biorad), suivant les résultats, les concentrations ont été ajustées avec le tampon de lyse. Les échantillons ont été préparés en ajoutant un tampon Laemmli (20% de glycérol, 4% de SDS, 0,125M de Tris-HCl, 0,05% de bleu de bromophenol et 200mM de DTT) chauffés 5 minutes à 95°C. Ici 50 µg de protéines ont été déposées sur gel SDS-PAGE à 10% et migrent à 100V avec du tampon running buffer, après elles ont été transférées sur membrane de nitrocellulose Amersham Hybond ECL (GE Healthcare) avec tampon de transfert à 0,06 A durant la nuit. Après transfert, la membrane est immergée dans du rouge ponceau (0,1% Ponceau S (w/v), 5% d'acide acétique) pour vérifier la quantité de protéines. Ensuite, elle est lavée dans du TBST (0,5M de Tris Base, 1,5M de NaCl, 0,2% de Tween 20) 2 fois et bloquée avec du TBST/lait 5% (Carnation, Lait écrémé en poudre) pendant 1h. Dans un premier temps l'anticorps primaire de souris monoclonale anti-Caspase8 ou anti-Caspase 9 (MBL International à 1 mg/ml) a été dilué dans du TBST/Lait 1% au ratio 1/200 et ajouté à la membrane toute la nuit. 3 lavages ont été effectués avec du TBST pendant 30 minutes. Dans un second temps l'anticorps secondaire (Goat anti-mouse IgG-HRP – Santa Cruz Biotechnology – 200 µg/0,5 ml) est dilué à 1/10000 dans du TBST /Lait 1%. 5 lavages de 5 minutes dans du TBST ont été réalisés. L'anticorps de la β-actin mouse anti-human (Sigma) est ajouté comme contrôle (dilution à 1/2000). Enfin, la membrane a été immergée avec des agents chemiluminescents (Clarity western ECL) pendant 5 minutes et révélée par fluorescence (Syngene G).

### **3.4 Expérience de cytotoxicité**

L'expérience de cytotoxicité consiste à mesurer la mort cellulaire des cellules leucémiques en contact avec des cellules NK activées par les pDC, par cytométrie en flux. Les cellules leucémiques sont cultivées en flasque T75 à une concentration de départ de  $0,2 \cdot 10^6$  cellules par millilitre. Elles sont ensuite mises en contact avec les cellules NK activées et la survie cellulaire est observée.

#### **3.4.1 Sélection des cellules NK et pDC**

Les échantillons de sang périphérique sont obtenus à partir de donateurs volontaires sains après avoir obtenu un consentement écrit. Le consentement est conforme à la Déclaration d'Helsinki et à l'approbation du comité d'éthique à la recherche du CHU Sainte-

Justine. Les cellules monoclonées du sang périphérique sont isolées par centrifugation sur gradient de densité (Ficoll-Paque PLUS, GE Healthcare Bio-Science AB, Uppsala, Sweden). La concentration cellulaire est déterminée par comptage à l'hématimètre et ajustée à  $5 \times 10^7$  cellules/ml. Les cellules NK ou pDC sont ensuite isolées par sélection négative à l'aide de billes magnétiques sur aimant (EasySep enrichment kits, StemCell Technologies, Vancouver, BC). La pureté des cellules sélectionnées est ensuite vérifiée par cytométrie après marquage avec les anticorps spécifiques anti-CD56<sup>+</sup> (APC, mouse anti-human, BD Biosciences), -CD3<sup>-</sup> (NK) (Pe-Cy7, mouse anti-human, BioLegend) et -CD123<sup>+</sup> (pDC) (PE mouse anti-human, BD Biosciences).

### 3.4.2 Activation des cellules NK par les cellules pDC

Après purification, les cellules NK sont mises en culture en plaque 96 puits à une concentration de  $2 \times 10^6$  cellules/ml dans du milieu RPMI 10% FBS. Les cellules pDC, obtenues par sélection négative à partir de sang périphérique ou par différenciation à partir de sang de cordon, sont ajoutées à un ratio NK: pDC de 10:1. Les cellules pDC sont stimulées par ajout de ligands de TLR9 (CpG 2216, 10 $\mu$ g/ml, Invivogen, San Diego, CA), ( $6,25 \cdot 10^{-2}$  cellules/ml). CpG 2216 fait partie de la classe des CpG-A et permet une stimulation large des interférons, surtout de l'IFN- $\alpha$ . Les cellules sont ensuite incubées à 37°C, 5% de CO<sub>2</sub>, pendant 18-20h. Les cellules NK seules servent de contrôle négatif.

### 3.4.3 Compte des cellules vivantes en cytométrie

**Marquage cellulaire.** Les cellules des lignées leucémiques sont récupérées et centrifugées 10 min à 1100 rpm. Elles sont ensuite resuspendues, dans 1ml de milieu PBS 2% PBS, et comptées. Le volume est ajusté à  $10^6$  cellules/ml et le marqueur DiOC (qui marque la membrane cellulaire) ajouté à 10  $\mu$ l pour  $10^6$  cellules. Les cellules sont ensuite incubées pendant 20 minutes à 37°C. Après l'incubation les cellules sont lavées 2 fois dans du PBS 2% FBS. Enfin, les cellules sont resuspendues dans du milieu RPMI 10% FBS à une concentration de  $2 \times 10^5$  cellules/ml.

**Test de cytotoxicité.** Les cellules leucémiques (GFP ou marquées ou DioC) et les cellules NK (activées ou non) sont co-cultivées en plaque 96 puits, à fond conique, à trois ratios effecteur : cible : 1:1, 5:1 et 10:1 pendant 2h à 37°C. La co-culture est ensuite récoltée et transférée dans des tubes à FACs. De l'iodure de propidium (PI) (10 mg/ml) est ajouté, à

0,16µg/200µl pour marquer les cellules mortes. 5000 billes de comptage sont ajoutées dans chaque échantillon (countbeats). L'acquisition est réalisée par cytométrie en flux sur le cytomètre FACSCanto II (BD Biosciences). Comme paramètre constant, 2000 billes sont acquises pour chaque échantillon. Le nombre absolu de cellules vivantes (GFP<sup>+</sup>, PI<sup>-</sup>) est ensuite déterminé, il est dépendant du nombre de billes acquises. Le pourcentage de lyse est calculé:  $((\#cellules\ contrôles - \#cellules\ échantillons) / \#cellules\ contrôles) * 100$ . Les paramètres d'acquisition sont indiqués en annexe 1. Lors de l'acquisition au cytomètre FACSCanto II HTS (échantillonneur à haut débit), les billes de comptage ne sont pas utilisées. La co-culture est laissée en plaque 96 puits et le propidium est ajouté. Ici, le paramètre constant est le volume d'acquisition: 30 µl pour 90 µl d'échantillon. Les paramètres d'acquisition sont indiqués en annexe 1. Le nombre absolu de cellules vivantes (GFP<sup>+</sup>, PI<sup>-</sup>) est ensuite calculé. Nombre absolu de cellules:  $(\#cellules\ acquises \times volume\ acquis) / volume\ de\ l'échantillon$ . Pourcentage de lyse:  $1((\#cellules\ contrôles - \#cellules\ échantillons) / \#cellules\ contrôles)*100$ .

### 3.4.4 Contrôles: Activation des NK

Pour vérifier l'activation des cellules NK par les pDC activées, les cellules NK stimulées et non stimulées sont marquées avec des anticorps spécifiques anti-CD69 (FITC, BD Biolegend) et anti-TRAIL (PE, BD Phamingen). 50 000 à 100 000 cellules NK sont placées dans une plaque 96 puits à fond conique, puis centrifugées 10 minutes à 1100 rpm. Les sites de liaison, non spécifiques, des anticorps sont bloqués par l'addition de 10 µl d'Ig de souris (γ-Ig de souris 100 µg/ml – Jackson ImmunoResearch). Parallèlement, des contrôles positifs et négatifs sont préparés à l'aide de billes de compensation incubées avec chacun des anticorps utilisés (tableau 3). Ces mêmes anticorps sont également ajoutés aux échantillons dans 30 µl de PBS/EDTA/BSA.

**Tableau 3: Liste des concentrations utilisées pour chaque anticorps.**

| Anticorps     | Espèce           | Concentration de départ | Concentration finale |
|---------------|------------------|-------------------------|----------------------|
| CD56          | Mouse/Anti-Human | 50 µg/ml                | 8 µg/ml              |
| CD69          | Mouse/Anti-Human | 50 µg/ml                | 8 µg/ml              |
| CD3           | Mouse/Anti-Human | 150 µg/ml               | 5 µg/ml              |
| TRAIL (CD253) | Mouse/Anti-Human | 0,2 mg/ml               | 6 µg/ml              |

Les cellules sont ensuite incubées avec les anticorps à 4°C, pendant 30 min. Les cellules sont ensuite lavées avec 200 µl de PBS/EDTA/BSA et centrifugées à 1100 rpm pendant 10 minutes. Elles sont récupérées dans 400 µl de PBS/EDTA/BSA dans des tubes et 3 µl de

7AAD est ajouté comme marqueur de viabilité. L'analyse en cytométrie est réalisée sur le FACS Canto II.

### **3.5 Différenciation *in vitro* des pDC à partir des progéniteurs du sang de cordon**

A partir de sang de cordon, les progéniteurs CD34<sup>+</sup> sont isolés et mis en culture. Les unités de sang de cordon sont obtenues à partir de la banque de sang de cordon du centre de recherche du CHU Sainte-Justine, approuvé par le comité d'éthique à la recherche. Les cellules mononuclées sont isolées par centrifugation sur gradient de densité (Ficoll-Pâque PLUS). Les cellules CD34<sup>+</sup> sont ensuite sélectionnées positivement à l'aide d'un kit avec des billes magnétiques et d'un aimant (Miltenyi Biotec, kit CD34<sup>+</sup>, San Diego, CA). Une fois isolées, les cellules CD34<sup>+</sup> sont mises en culture pour 7 jours de prolifération puis 7 jours de différenciation, à 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Les 7 premiers jours, les cellules sont cultivées, à 0,2.10<sup>6</sup> cellules/ml, dans un milieu sans sérum (StemSpan™ SFEM, StemCell Technologies, Vancouver, BC). Le milieu est supplémenté du facteur de croissance Flt3-L à 100ng/ml (de R&D System, Minneapolis, MN ou Miltenyi Biotec), de thrombopoïétine (TPO – R&D systems) (50mg/mL), de Stem Cell Factor recombinant (SCF – R&D systems) (10 mg/ml) et enfin de Stemregenin-1 (SR1, 0.75µM, Selleckchem, Houston, TX). Le milieu est changé tous les 2 jours. Les 7 derniers jours, les cellules sont cultivées en présence de TPO, Flt3, SR1 et IL-7 (10 ng/mL, Miltenyi). Les cellules sont ensuite triées en cytométrie (FACs Aria – BD Biosciences) après marquage avec des anticorps anti-HLA-DR-PE/Cy7 et anti-CD123-APC (BD Biosciences, San Jose, CA). Le marqueur de viabilité Sytox blue (Molecular Probes) est ajouté pour exclure les cellules mortes. Les pDC enrichissent négativement à l'aide d'un kit (EasySep enrichment kits, StemCell Technologies, Vancouver, BC), sont resuspendues dans du milieu RPMI 10% FBS.

### **3.6 Traitement Décitabine et Vorinostat sur la lignée 697**

Pour cette expérience, les cellules 697 sont mises en culture en flasque T75 à 0.2.10<sup>6</sup> cellules/ml dans 15 ml. La Décitabine est ajoutée à des concentrations de 25, 50, 100, 250 ou 500 nM à partir de dilution à un 1 µM (en collaboration avec le laboratoire du Dr. Noël

Raynal – provenance du laboratoire du Dr. Montparlé), pendant 24h. Les cellules sont ensuite lavées et le Vorinostat est ajouté à 50 nM, à partir d'échantillon à 10 µM (en collaboration avec le laboratoire du Dr. Noël Raynal – compagnie: Synn Innova), pendant 24h. Les cellules sont ensuite lavées et maintenues 24h de plus en milieu frais. Ce protocole a été établi à partir de données de laboratoire du Dr. Noël Raynal, montrant un effet de la Décitabine après 48h de traitement. Protocole appuyé par différentes études (Momparler et al., 1997; Schmelz et al., 2005).

### 3.7 Méthylation de l'ADN

L'extraction d'ADN a été réalisée par le laboratoire du Dr. Noël Raynal. Les cellules (5 à 10.10<sup>6</sup> cellules/ml) sont lysées dans 600 µl de solution (2% SDS, 25mM EDTA, +/- RNase A). Le lysat est ensuite précipité avec 10 M d'acetate d'ammonium, et 600 µl d'isopropanol. Le précipité est lavé avec de l'éthanol 70%. L'ADN extrait est récupéré dans une solution TE (Tris 1M, EDTA 0,5M, 500 ml ddH2O) et incubé à 65°C 1h pour solubiliser l'ADN. L'extraction est suivie d'un traitement au Bisulfite (KIT Qiagen #59824) et amplification par PCR. Le pyroséquençage a été réalisé à l'Université McGill en collaboration avec le laboratoire du Dr. Serge McGraw. Le statut de méthylation des rétrotransposons LINE-1 (un des deux éléments les plus abondants du génome) et ERKV (éléments présents en abondance dans le génome) a été analysé (environs 50 nucléotides) (tableau 4). Pour cela, l'analyse des CpG se fait à l'intérieur des séquences (entre primers) (tableau 4) (Zheng et al., 2017). Ces régions ont été choisies car elles sont répétées plusieurs milliers de fois dans le génome. Elles permettent d'estimer la méthylation globale du génome.

**Tableau 4: Séquences des CpG analysées et des primers utilisés.**

|                        | LINE-1                               | ERKV                               |
|------------------------|--------------------------------------|------------------------------------|
| Séquence non convertie | TCGGGAGGTGGGAGGCAAGGAGAGGGA<br>TAACG | GCGGTAACACCAGCGTCTGGGAA<br>GACG    |
| Séquence convertie     | TCGGGAGGTGGGAGGTAAGGAGAGGGA<br>TAACG | GCGGTAATATTAGCGTTTGGGAA<br>GACG    |
| Primer forward         | GGGTATAGGGAAGGGAATATTATATATT<br>AG   | ATGGTGAGAAGTGATTAGAAGAT<br>AAG     |
| Primer reverse         | CCATCAACTCACCATCTACATT               | CTACTCAATAATAAATACTTTTCC<br>CTTAAC |
| Primer de séquençage   | AGGGAATATTATATATTAGGGT               | GGGTTATTAGAGGGTTTT                 |
|                        | chr1_72184-72525                     | chr1_3748218-3749146               |

Les tests statistiques présent dans cette étude, ont été réalisés avec des tests non paramétriques, Mann-Whitney. \* p<0,005 à partir du logiciel PRISM.



## **4. Résultats**

Mes travaux ont porté sur le développement d'une nouvelle approche thérapeutique pour prévenir les rechutes leucémiques après greffe de cellules souches hématopoïétiques. Cette nouvelle approche est une immunothérapie qui vise à stimuler les cellules NK pour augmenter leur activité anti leucémiques au cours des premiers mois après la greffe. Mon projet avait pour objectif de comprendre les mécanismes impliqués dans l'activité cytotoxique des cellules NK stimulées par les cellules pDC. Par ailleurs, nous avons également testé l'hypothèse qu'un prétraitement des lignées leucémiques avec des modificateurs épigénétiques augmenterait l'efficacité de notre immunothérapie en induisant l'expression de récepteurs activateurs des cellules NK et/ou des récepteurs de mort cellulaire sur les cellules leucémiques.

### **4.1 Objectif 1: Mécanismes de lyse cellulaire induits par les cellules NK activées par les pDC**

Pour cet objectif, les lignées REH et Nalm6 sont utilisées. Elles présentent une sensibilité à la lyse médiée par les NK activées par les pDC. Cependant, d'après d'autres études, elles ne montrent pas le même type de réponse à la lyse médiée par les NK. Elles permettent donc de visualiser clairement les effets des mutants KO, caspase 8, 9 et TRAIL-R1, TRAIL-R2, et de montrer l'hétérogénéité des réponses sur des lignées sensibles.

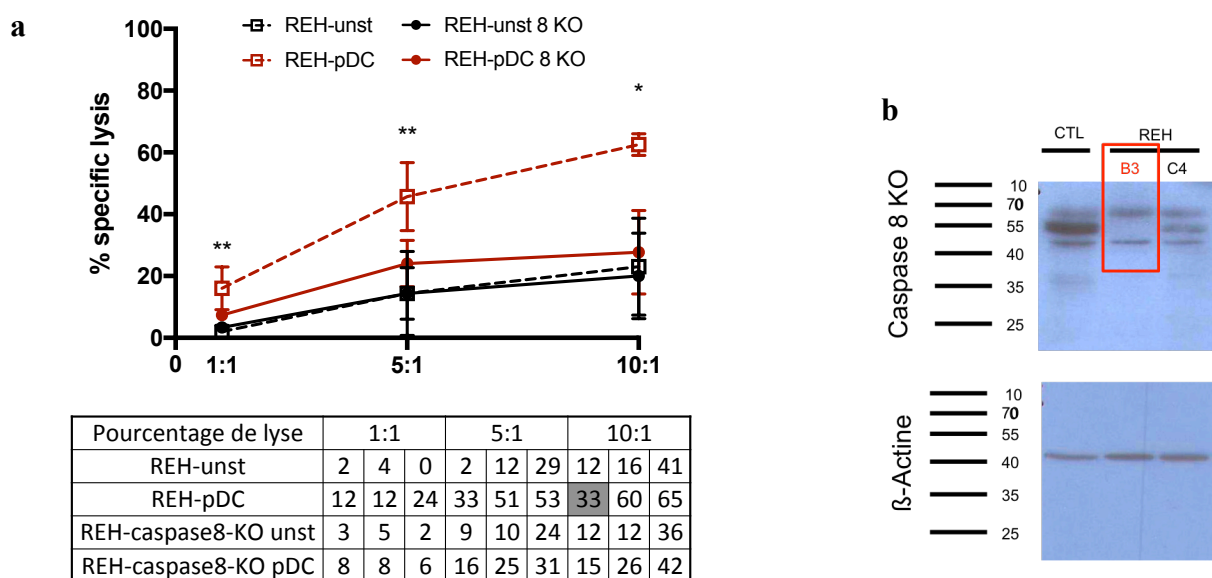
#### **4.1.1 Lignée REH: la mort cellulaire induite par les cellules NK dépend fortement de la voie d'apoptose directe**

Les cellules REH sont sensibles à la lyse médiée par les cellules NK quand celles-ci sont préalablement stimulées par les pDC activées. Des travaux antérieurs ont permis de déterminer que la mort cellulaire des cellules REH nécessite l'interaction de TRAIL (exprimé par les cellules NK activées par les pDC) et les récepteurs de mort TRAIL-R1/R2 (exprimés par les cellules REH), suivi de la caspase 8 (Lelaidier et al., 2015). Cette caspase 8 va permettre l'activation de la caspase 3 qui induira l'apoptose. La caspase 9, pour la voie mitochondriale, va également permettre l'activation de la caspase 3. La différence se fait sur

l'activation propre des caspases 8 et 9, via FADD et Cytochrome C respectivement. L'objectif est de tester dans l'ordre l'effet de la délétion de caspase 8, 9, TRAIL-R1 et R2.

#### 4.1.1.1 REH Casp8-KO

Ici, nous nous attendions à un effet réduit de la lyse des cellules REH en présence de mutant caspase 8 KO. Des expériences de cytotoxicité *in vitro* ont été réalisées. Les cellules NK ont été stimulées avec des pDC activées ou non stimulées. Nous observons une réduction significative de la lyse cellulaire des cellules REH dont le gène caspase 8 a été inactivé en comparaison avec la lignée REH parentale (figure 15). La caspase 8 a un rôle dans la lyse médiée par les NK. Activation des NK en annexe 2. La caspase 9 a ensuite été testée.

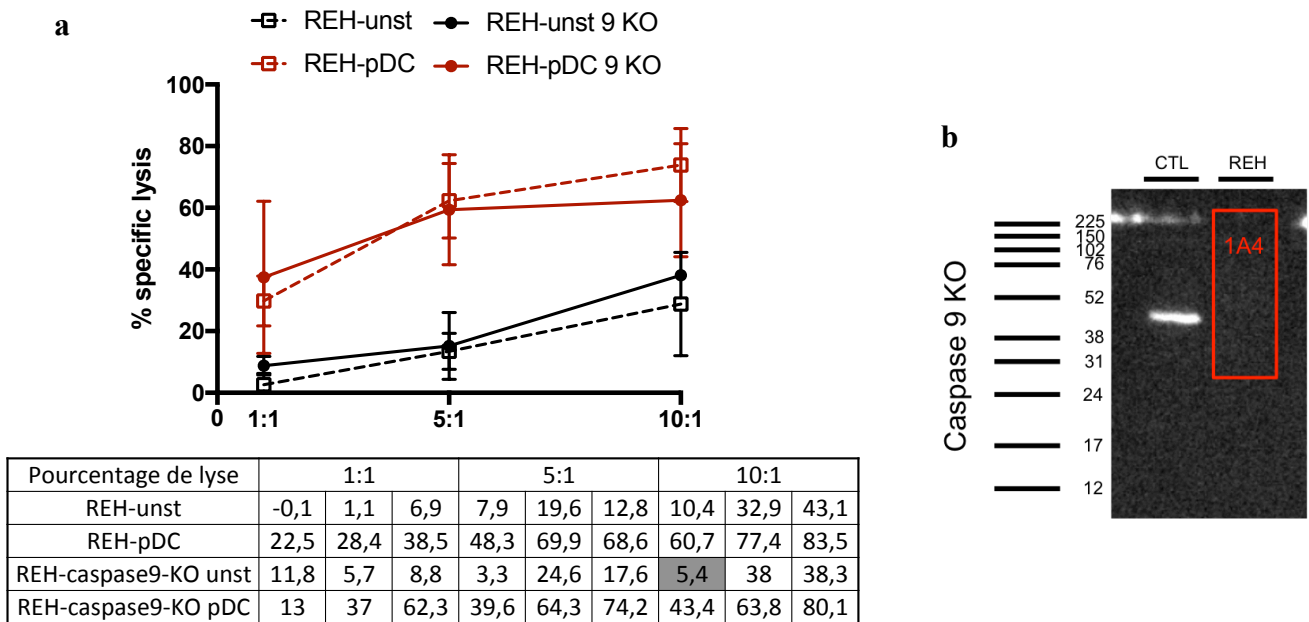


**Figure 15: Lyse cellulaire réduite sur la lignée REH mutée pour la caspase 8. a). 3 expériences.** Les cellules NK et pDC ont été purifiées à partir d'échantillons de sang périphérique et les cellules NK ont été activées ou non avec les pDC stimulées par du CPG-2216 pendant 24h avant l'essai. Les cellules leucémiques mutées pour la caspase 8 ont ensuite été mises en contact avec les NK activées ou non pendant 2h puis la lyse cellulaire a été mesurée par cytométrie en flux. Statistiques réalisées entre les conditions pDC et unst. (en présence de NK non stimulées). N=3. 1:1 5:1 10:1 ratio de 1 cellule NK pour 1 cellule leucémique; 5 pour 1 et 10 pour 1. Test non paramétrique, Mann-Whitney.  $p < 0,05$ . \*  $p = 0,0182$  \*\*  $p = 0,0091$ . b). Le clone B3 vérifié par western blot a été utilisé pour la lignée REH-Casp8-KO.

#### 4.1.1.2 REH Casp9-KO

Pour la caspase 9, d'après la littérature (Wu and Ding, 2002), une absence de lyse cellulaire devrait être observée. Des expériences similaires de cytotoxicité ont été réalisées sur

les cellules REH dont le gène de la Caspase-9 a été délété. Nous observons que la sensibilité des cellules REH à la lyse médiée par les cellules NK activées est beaucoup moins affectée par la perte de la Caspase-9 que par la perte de la Caspase-8. Ces résultats indiquent que la voie d'apoptose impliquant la mitochondrie n'est pas essentielle pour la lyse des cellules LLA par les cellules NK activées par les pDC, (figure 16). Activation des NK en annexe 3. Les récepteurs TRAIL-R1 et R2 ont ensuite été testés.

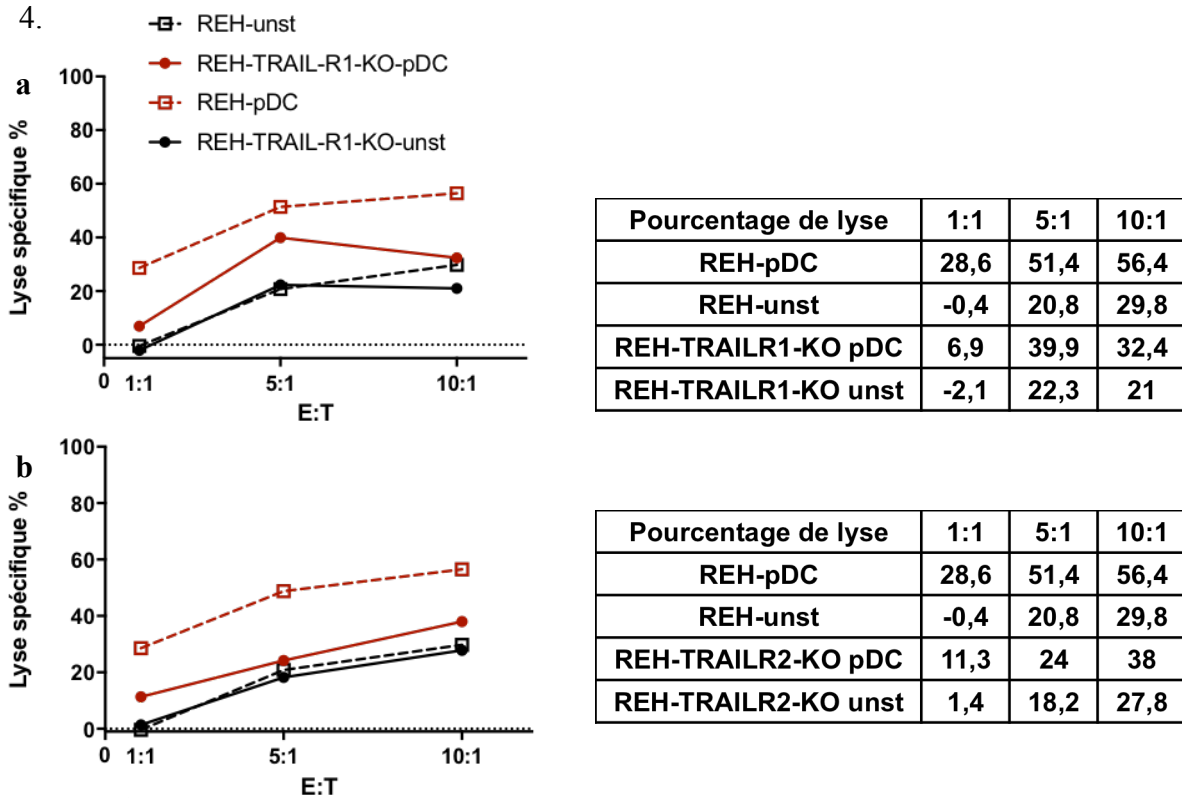


**Figure 16 : L'absence de caspase 9 n'influence pas la lyse cellulaire médiée par les cellules NK.** a). Les essais de cytotoxicité ont été menés de la même manière que pour la REH-Casp8-KO. Les cellules NK et pDC ont été purifiées à partir d'échantillons de sang périphérique et les cellules NK ont été activées ou non avec les pDC stimulées par du CPG-2216 pendant 24h avant l'essai. Les cellules leucémiques ont ensuite été mises en contact avec les cellules NK activées ou non pendant 2h puis la lyse cellulaire a été mesurée par cytométrie en flux. Statistiques réalisées entre les conditions pDC et unst (en présence de NK non stimulées). N=3. 1:1 5:1 10:1 ratio 1 cellule NK pour 1 cellule leucémique ; 5 pour 1 et 10 pour 1. Test non paramétrique, Mann-Whitney.  $p > 0,05$ , non significatif. b). Le clone B3 vérifié par western blot a été utilisé comme lignée REH-Casp9-KO.

#### 4.1.1.3 REH TRAILR1-KO et TRAILR2-KO

Les gènes TRAIL-R1 et R2 font partie de la voie des récepteurs de mort. Les expériences sur ces gènes devraient indiquer une diminution de la lyse médiée par les NK. Des essais de cytotoxicité ont été réalisés avec les cellules REH. Les résultats montrent que la perte des récepteurs de mort cellulaire TRAIL-R1 et TRAIL-R2 réduit la lyse des cellules

REH médiée par les cellules NK activées. Ces résultats pourraient indiquer que ces récepteurs (TRAIL-R1 et R2) sont essentiels à la sensibilité des cellules REH à une immunothérapie basée sur l'activation des cellules NK par les pDC, (figure 17.a, b). Cependant étant réalisée une fois elle nécessite des réplicas pour confirmer ces résultats. Activation des NK en annexe



**Figure 17 : Diminution de la lyse cellulaire des cellules REH dont les récepteurs de mort cellulaire TRAILR1 et TRAIL-R2 ont été respectivement inactivés.** Les tests cytotoxiques ont été menés de la même manière que pour la REH-Casp8-KO. Les cellules NK et pDC ont été purifiées à partir d'échantillons de sang périphérique et les cellules NK ont été activées ou non avec les pDC stimulées par du CPG-2216 pendant 24h avant l'essai. Les cellules leucémiques ont ensuite été mises en contact avec les NK activées ou non pendant 2h puis la lyse cellulaire a été évaluée par cytométrie en flux. N=1. 1:1 5:1 10:1 ratio 1 cellule NK pour 1 cellule leucémique; 5 pour 1 et 10 pour 1. Aucun test statistique effectué, nombre d'expériences insuffisant.

En conclusion, dans les cellules REH, la délétion des gènes impliqués dans l'apoptose médiée par les récepteurs de mort, montre l'implication des récepteurs TRAIL-R1 et TRAIL-R2 dans l'apoptose médiée par les cellules NK activées par les pDC. Cette voie d'apoptose est indépendante de la Caspase 9, ce qui suggère que la voie d'apoptose mitochondriale n'est pas essentielle. Il serait cependant intéressant d'explorer l'effet de l'inactivation simultanée des 2 récepteurs TRAIL-R1 et TRAIL-R2 puisque ceux-ci ont des rôles similaires et redondants

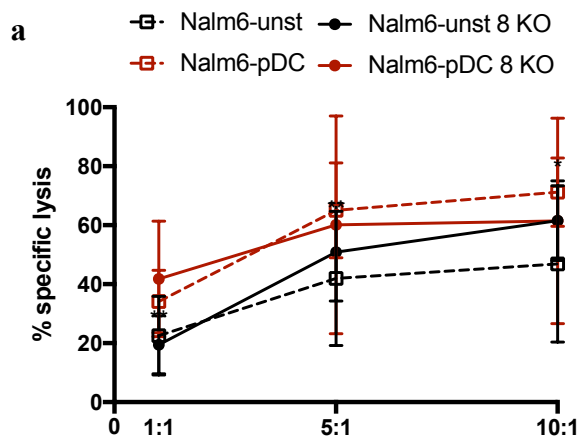
(Walczak et al., 1997). Il s'agit maintenant de mener les mêmes expériences sur la lignée Nalm6 et d'évaluer la réponse comparée à la lignée REH.

#### 4.1.2 Lignée Nalm6: La mort cellulaire induite par les cellules NK ne dépend pas uniquement des récepteurs de mort cellulaire TRAIL-R1 et TRAIL-R2

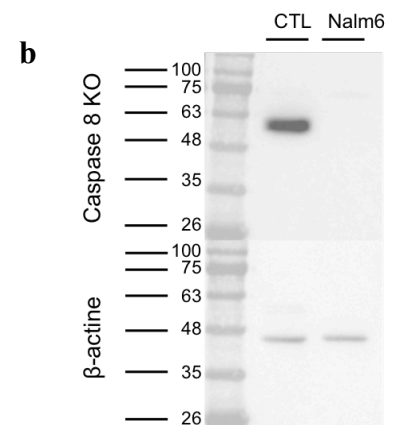
Afin de déterminer les variabilités entre les lignées, la lignée Nalm6 a été utilisée. Elle présente un niveau plus élevé des ligands du récepteur activateur des cellules NK, NKG2D (Lelaidier et al., 2015). La liaison du récepteur NKG2D à son ligand induit la dégranulation des cellules NK et la mort cellulaire des cellules cibles par la voie des perforine, granzyme. En utilisant la même approche que pour la lignée REH, nous avons testé l'hypothèse que la voie d'apoptose médiée par les récepteurs de mort TRAIL-R1 et TRAIL-R2 puis caspase 8, joue également un rôle dans la lyse cellulaire induite par les cellules NK activées mais que la voie mitochondriale est plus importante que pour la lignée REH.

##### 4.1.2.1 Nalm6 Casp8-KO

Ici, nous attendions un effet réduit de la lyse cellulaire en présence du mutant caspase 8 KO. Des essais de cytotoxicité ont été réalisés avec des cellules NK stimulées ou non avec des pDC activées. Nous n'observons pas de différence significative entre les lignées Nalm6 WT et la lignée Caspase 8 KO. Ces résultats, non attendus, indiquent que la voie d'apoptose dépendante de la Caspase 8 n'est pas essentielle, à la lyse des cellules Nalm6 par les cellules NK activées, figure 18-19. Activation des NK en annexe 5. La caspase 9 a ensuite été testée.



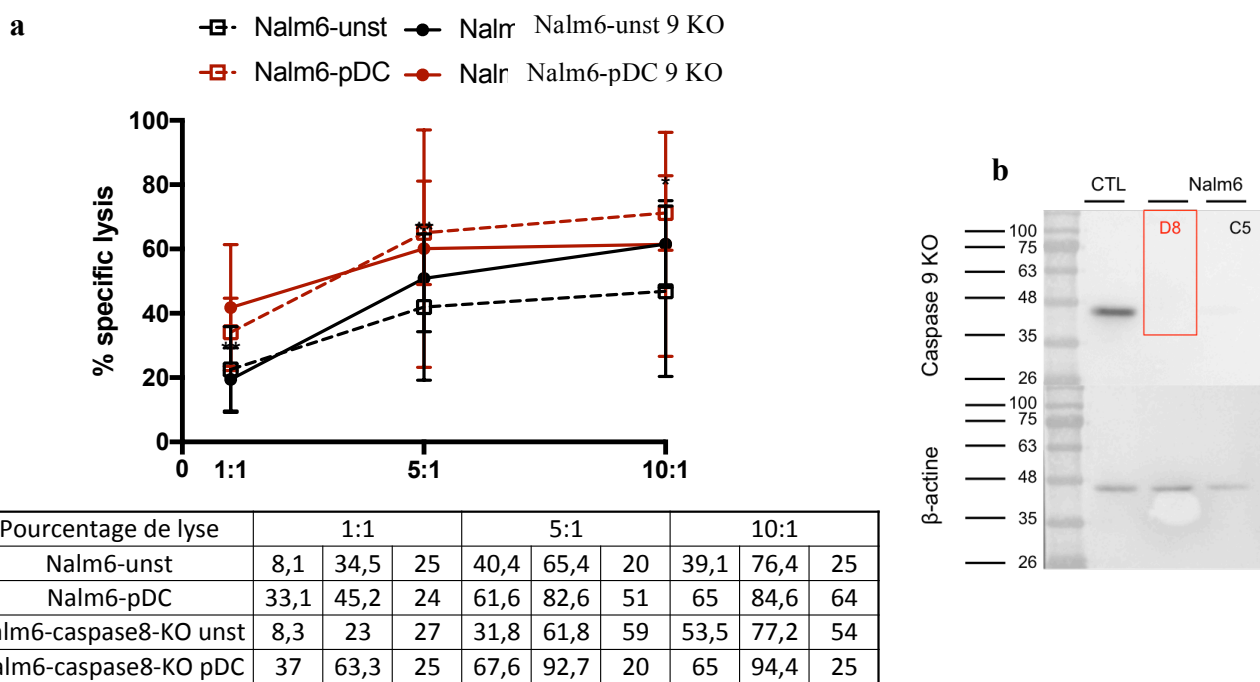
| Pourcentage de lyse    | 1:1  |      |    | 5:1  |      |    | 10:1 |      |    |
|------------------------|------|------|----|------|------|----|------|------|----|
| Nalm6-unst             | 8,1  | 34,5 | 25 | 40,4 | 65,4 | 20 | 39,1 | 76,4 | 25 |
| Nalm6-pDC              | 33,1 | 45,2 | 24 | 61,6 | 82,6 | 51 | 65   | 84,6 | 64 |
| Nalm6-caspase8-KO unst | 8,3  | 23   | 27 | 31,8 | 61,8 | 59 | 53,5 | 77,2 | 54 |
| Nalm6-caspase8-KO pDC  | 37   | 63,3 | 25 | 67,6 | 92,7 | 20 | 65   | 94,4 | 25 |



**Figure 18: La délétion du gène de la Caspase-8 n'altère pas la lyse des cellules Nalm6 par les cellules NK activées.** a) Les cellules NK et pDC ont été purifiées à partir d'échantillons de sang périphérique et les cellules NK ont été activées ou non avec les pDC stimulées par du CPG-2216 pendant 24h avant l'essai. Les cellules leucémiques ont ensuite été mises en contact avec les NK activées ou non pendant 2h puis la lyse cellulaire a été évaluée par cytométrie sur HTS (criblage à haut débit). b). La lignée a été testée par western blot et utilisée. N=3. 1:1 5:1 10:1 ratio 1 cellule NK pour 1 cellule leucémique; 5 pour 1 et 10 pour 1. Test non paramétrique, Mann-Whitney.  $p > 0,05$ , non significatif.

#### 4.1.2.2 Nalm6 Casp9-KO

La caspase 9, impliquée dans la voie mitochondriale, devrait jouer un rôle plus important pour la lyse cellulaire dans la lignée Nalm6 par les NK. Cependant, les expériences réalisées ne montrent aucune diminution de lyse en absence de la caspase 9. Il est donc probable que pour cette lignée, les deux voies, récepteur de mort cellulaires et de mitochondriale, se compensent. Les récepteurs TRAIL-R1 et R2 ont ensuite été testés (figure 19).

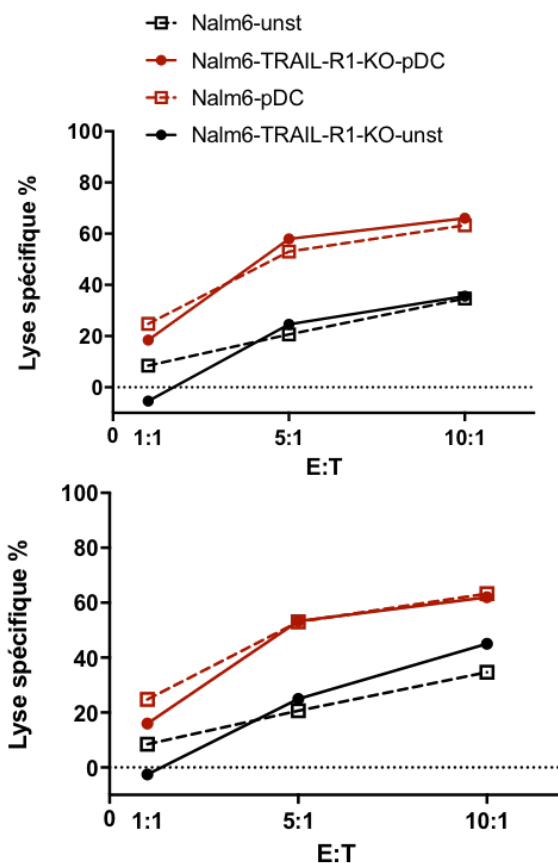


**Figure 19: La délétion du gène de la Caspase-9 n'altère pas la lyse des cellules Nalm6 par les cellules NK activées.** a). Des tests cytotoxiques *in vitro* ont été réalisés sur la lignée Nalm6. Les cellules NK et pDC ont été purifiées à partir d'échantillons de sang périphérique de donneurs et les cellules NK ont été activées ou non avec les pDC stimulées par du CPG-

2216 pendant 24h avant l'essai. Les cellules leucémiques ont ensuite été mises en contact avec les NK activées ou non pendant 2h puis la lyse cellulaire a été suivie par cytométrie sur HTS (criblage à haut débit). b). Le clone D8 vérifié par western blot a été utilisé pour la lignée Nalm6-Casp9-KO. N=3. 1:1 5:1 10:1 ratio 1 cellule NK pour 1 cellule leucémique; 5 pour 1 et 10 pour 1. Test non paramétrique, Mann-Whitney.  $p > 0,05$ , non significatif.

#### 4.1.2.3 Nalm6 TRAILR1-KO et TRAILR2-KO

Ici, sur la lignée Nalm6, suite aux résultats (figure 18 et 19), on s'attendait à observer aucun effet de diminution de lyse en absence des récepteurs TRAIL-R1 et R2. Nous avons effectué des essais de cytotoxicité avec des cellules NK stimulées ou non avec des pDC activées. Les résultats montrent que la délétion des récepteurs de mort (TRAIL-R1 et TRAIL-R2) n'a aucune influence sur la sensibilité des cellules Nalm6 à la lyse cellulaire induite par les cellules NK activées. Ce résultat est en accord avec ce que nous avons observé avec les lignées Nalm6 caspase 8 et caspase 9 KO et indique que la voie d'apoptose induite par les récepteurs de mort TRAIL-R1/R2 n'est pas essentielle à la lyse des cellules Nalm6 par les cellules NK activées (figure 20). Cependant, à l'image de la lignée REH, cette expérience réalisée une fois, nécessite des répétitions pour confirmer les conclusions. Activation des NK en annexe 6.



| Pourcentage de lyse   | 1:1  | 5:1  | 10:1 |
|-----------------------|------|------|------|
| Nalm6-unst            | 8,5  | 20,7 | 34,7 |
| Nalm6-pDC             | 24,4 | 52,9 | 63,3 |
| Nalm6-TRAILR1-KO unst | -5,4 | 24,6 | 35,6 |
| Nalm6-TRAILR1-KO pDC  | 18,5 | 58   | 66   |

| Pourcentage de lyse   | 1:1  | 5:1  | 10:1 |
|-----------------------|------|------|------|
| Nalm6-unst            | 8,5  | 20,7 | 34,7 |
| Nalm6-pDC             | 24,4 | 52,9 | 63,3 |
| Nalm6-TRAILR2-KO unst | -2,5 | 24,8 | 44,8 |
| Nalm6-TRAILR2-KO pDC  | 16   | 53,3 | 62,3 |

**Figure 20: La délétion des gènes TRAIL-R1 et TRAIL-R2 ne modifie pas la sensibilité des cellules Nalm6 à la lyse cellulaire médiée par les cellules NK activées.** Des tests cytotoxiques *in vitro* ont été réalisés sur la lignée Nalm6 mutée pour TRAIL-R1 ou R2 ou non mutée. Les cellules NK et pDC ont été purifiées à partir d'échantillons de sang périphérique et les cellules NK ont été activées ou non avec les pDC stimulées par du CPG-2216 pendant 24h avant l'essai. Les cellules leucémiques ont ensuite été mises en contact avec les NK activées ou non pendant 2h puis la lyse cellulaire a été suivie par cytométrie sur HTS (criblage à haut débit). N=1 1:1 5:1 10:1 ratio 1 cellule NK pour 1 cellule leucémique; 5 pour 1 et 10 pour 1. Aucun test statistique effectué, nombre d'expériences insuffisant.

En conclusion, nos résultats montrent que les voies de cytotoxicité, médiées par les cellules NK activées, diffèrent selon la cible leucémique. Pour les cellules REH, la voie d'apoptose médiée par les récepteurs de mort TRAIL-R1 et TRAIL-R2 est essentielle alors que pour les cellules Nalm6 d'autres voies de cytotoxicité peuvent être engagées lorsque la voie TRAIL est abrogée. Sur ces deux lignées sensibles, la lyse médiée par les NK présente des profils différents. Ces résultats mettent en évidence que pour chaque patient qui pourraient s'engager dans ce protocole (immunothérapie médiée par les NK), il faudrait vérifier la présence des récepteurs TRAIL pour prévoir l'efficacité du traitement. Les caspases 8 et 9 et les récepteurs TRAIL-R1 et R2 sont à vérifier en priorité. Des études complémentaires seront nécessaires pour déterminer quels autres marqueurs sont importants dans la sensibilité des cellules LLA à l'immunothérapie médiée par les cellules NK.

## **4.2 Objectif 2: Sensibilisation des cellules leucémiques par modifications épigénétiques**

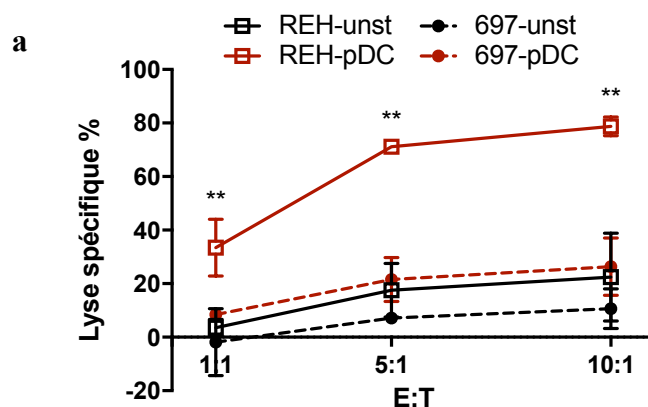
Les résultats précédents démontrent que plusieurs voies de cytotoxicité peuvent être engagées par les cellules NK activées par les pDC et que ces voies dépendent de la cible leucémique. Des observations au laboratoire ont permis d'établir que 7 lignées leucémiques sur 9 sont sensibles à l'immunothérapie basée sur les cellules NK activées par les pDC (Herblot et al., non publié). Il existe donc des leucémies résistantes à cette approche. Pour les lignées résistantes, nous proposons de déterminer si une combinaison de drogue à effets épigénétiques, pourrait permettre la réexpression de gènes impliqués dans les voies



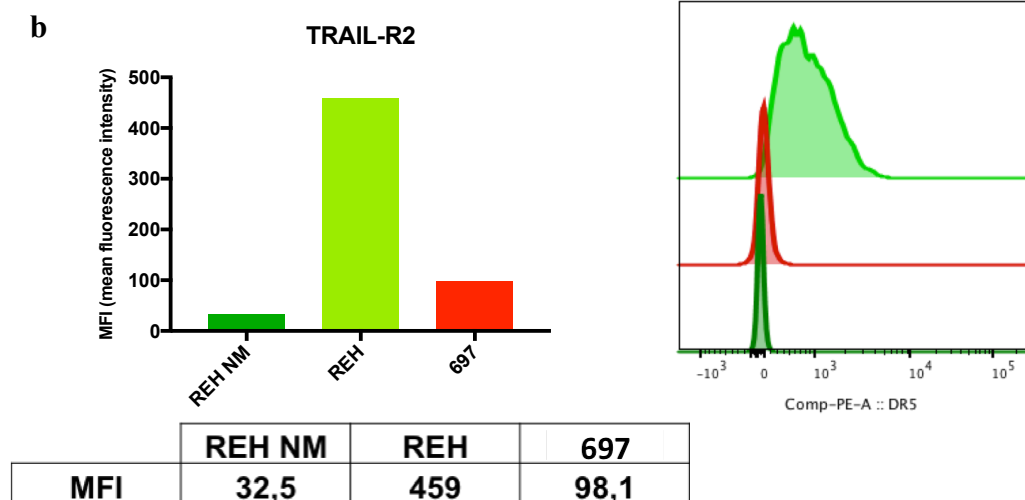
d'apoptoses, importants pour les cellules NK. La réexpression des récepteurs TRAIL pourrait permettre d'augmenter la lyse cellulaire médiée par les cellules NK activées par les pDC. Pour établir l'effet des agents à effets épigénétiques sur les cellules LLA, nous avons utilisé la lignée 697, qui est résistante à la lyse cellulaire médiée par les cellules NK activées. Pour cette lignée une déméthylation globale de l'ADN pourrait permettre la réexpression des marqueurs impliqués dans la voie TRAIL ou mitochondriale. Cette lignée va permettre d'identifier les effets épigénétiques et l'augmentation de la sensibilité des cellules leucémiques à la lyse cellulaire médiée par les cellules NK activées par les pDC.

#### 4.2.1 Lignée 697 résistante à la lyse médiée par les cellules NK

Ici, nous nous attendions à une réduction, voir absence, de lyse sur la lignée 697 comparée à la lignée REH avec une expression faible de TRAIL-R2 sur la lignée 697. Des essais de cytotoxicité ont été réalisés sur les 2 lignées. Les résultats montrent que la lignée 697 est résistante à la lyse médiée par les cellules NK activées par les pDC alors que les cellules REH sont sensibles (figure 21.a). Nous avons également mesuré, par cytométrie en flux, la présence du récepteur de mort TRAIL-R2 dans les 2 lignées et nous avons observé que la lignée 697 exprime très faiblement TRAIL-R2, (figure 22.b). Activation des NK en annexe 7. La résistance de la lignée 697 semble corrélée avec l'absence d'expression de TRAIL-R2. Par la suite, une expérience de cytotoxicité a été menée en présence de drogues épigénétiques.



| Pourcentage de lyse | 1:1  |     | 5:1 |      |    | 10:1 |      |    |    |
|---------------------|------|-----|-----|------|----|------|------|----|----|
| REH-unst            | 5,6  | 0   | 5   | 23,6 | 6  | 23   | 35,3 | 4  | 28 |
| REH-pDC             | 44,3 | 23  | 33  | 73,3 | 70 | 70   | 23   | 82 | 75 |
| 697-unst            | -0,7 | -15 | 10  | 6,3  | 7  | 8    | 7,8  | 19 | 5  |
| 697-pDC             | 7,3  | 8   | 10  | 17,7 | 31 | 16   | 38   | 24 | 17 |



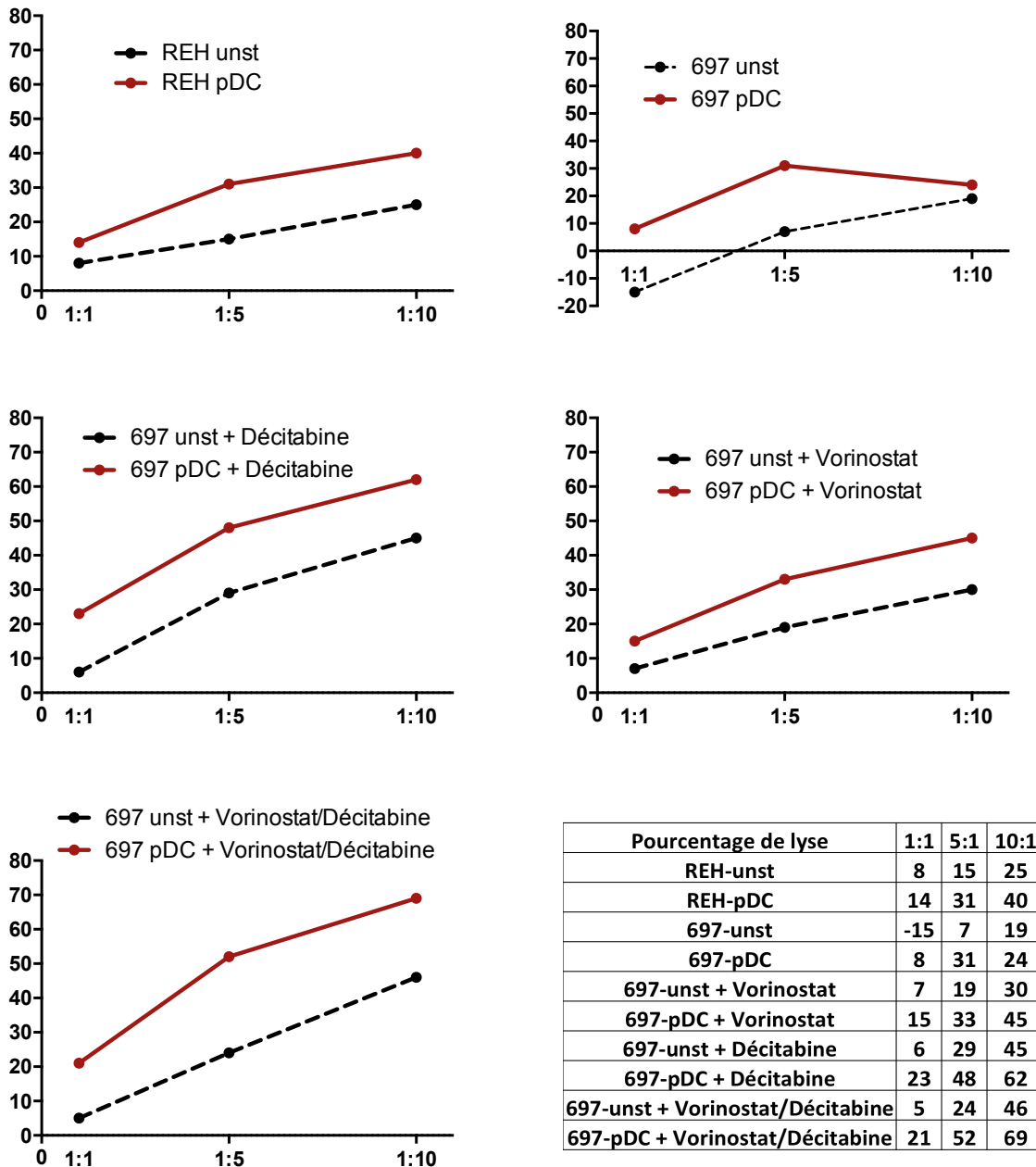
**Figure 21: Absence de lyse de la lignée 697 en présence de NK activées par les pDC.** a). Des essais de cytotoxicité *in vitro* ont été réalisés sur la lignée REH et 697. Les cellules NK et pDC ont été purifiées à partir d'échantillons de sang périphérique et les cellules NK ont été activées ou non avec les pDC stimulées par du CPG-2216 pendant 24h avant l'essai. Les cellules leucémiques ont ensuite été mises en contact avec les cellules NK activées ou non pendant 2h puis la lyse cellulaire a été évaluée par cytométrie sur HTS (criblage à haut débit). Test non paramétrique, Mann-Whitney  $**p<0,01$   $***p<0,001$ . b). Expression du récepteur TRAIL-R2 sur les lignées REH et 697, MFI exprimés sur le tableau de gauche. N=3. 1:1 5:1 10:1 ratio 1 cellule NK pour 1 cellule leucémique; 5 pour 1 et 10 pour 1. Test non paramétrique, Mann-Whitney.  $p<0,05$ .  $** p=0,0091$ .

#### 4.2.2 Levée de résistance sur la lignée 697 par effet épigénétique en amont

Nous avons postulé qu'un effet épigénétique non toxique pourrait permettre de réactiver les ligands de TRAIL-R1, R2, Fas, et de sensibilité des cellules leucémiques à la lyse cellulaire médiée par les cellules NK. Nous, nous attendions à une lyse plus importante en présence des drogues. Pour tester cette hypothèse, nous avons réalisée une expérience de cytotoxicité. Les cellules ont été traitées avec la décitabine et le Vorinostat (Burke et al., 2014; Young et al., 2017). La décitabine est un inhibiteur des méthyltransférases de l'ADN. Le Vorinostat est un inhibiteur des histones désacétylases. L'action combinée de ces 2 drogues permet une réactivation des gènes suppresseurs de tumeur (Young et al., 2017).

Les cellules 697 ont été traitées successivement avec 500 nM de Décitabine pendant 24h puis 50 nM de Vorinostat pendant 24h (une drogue après l'autre). Ce protocole a été

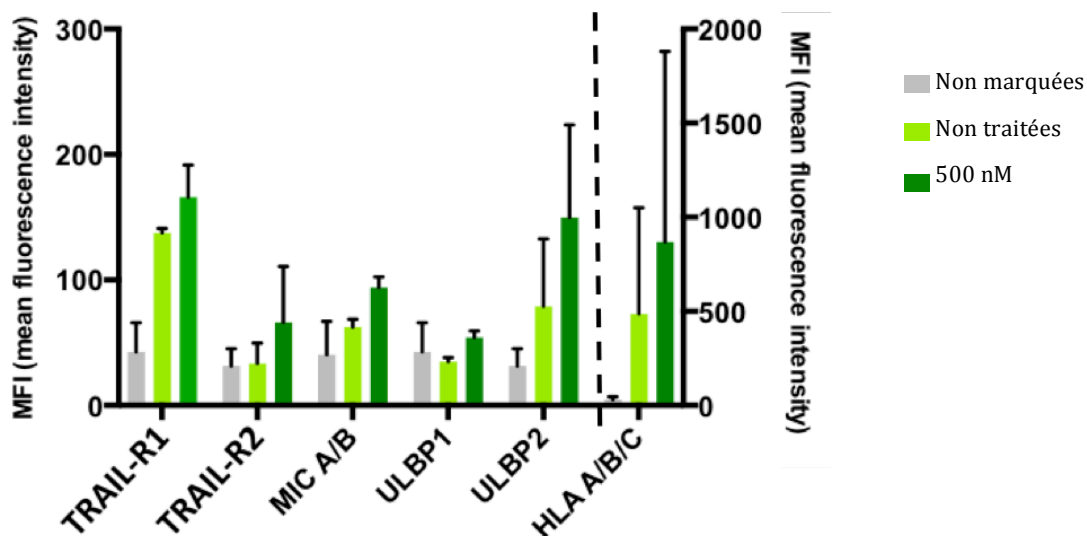
réalisé par le personnel du laboratoire du Dr. Raynal. Elles ont ensuite été lavées et l'essai de cytotoxicité avec cellules NK activées ou non avec les pDC a été réalisé le troisième jour. La lignée 697 sans traitement présente une lyse réduite. Comme précédemment elle ne dépasse pas 31% même en présence de cellules NK activées par les pDC. En revanche, en présence de Vorinostat, les cellules présentent une lyse cellulaire augmentée jusqu'à 45%. C'est en présence de Décitabine que la lyse augmente jusqu'à 62%. La présence des deux drogues pourrait donc avoir un effet synergique car la lyse monte jusqu'à 76%. En présence de traitement épigénétique les cellules sont visiblement plus sensibles à l'action des NK activées (figure 22). Cependant, nous n'avons pas testé les drogues en absence de cellules NK. Il s'agit maintenant de déterminer quels marqueurs, sont exprimés différemment en présence de la Décitabine.



**Figure 22: Sensibilisation des cellules 697 à la lyse médiée par les cellules NK par pré-traitement épigénétique.** Des essais de cytotoxicité *in vitro* ont été réalisés sur la lignée 697 préalablement traitée avec la décitabine et/ou le Vorinostat. Les cellules leucémiques sont mises en culture +/- Décitabine à 500 nM, 24h puis lavées et remises en culture +/- Vorinostat à 50 nM 24h et enfin lavées pour être mises en contact avec les cellules NK +/- activées. Les cellules NK et pDC ont été purifiées à partir d'échantillons de sang périphérique et les cellules NK ont été activées ou non avec les pDC stimulées par du CPG-2216 pendant 24h avant l'essai. Les cellules leucémiques ont ensuite été mises en contact avec les cellules NK activées ou non pendant 2h puis la lyse cellulaire a été suivie par cytométrie sur HTS. N=1 1:1 5:1 10:1 ratio 1 cellule NK pour 1 cellule leucémique; 5 pour 1 et 10 pour 1. Aucun test statistique effectué, nombre d'expériences insuffisant.

### 4.2.3 Expression similaire des marqueurs spécifiques de mort en présence de Décitabine

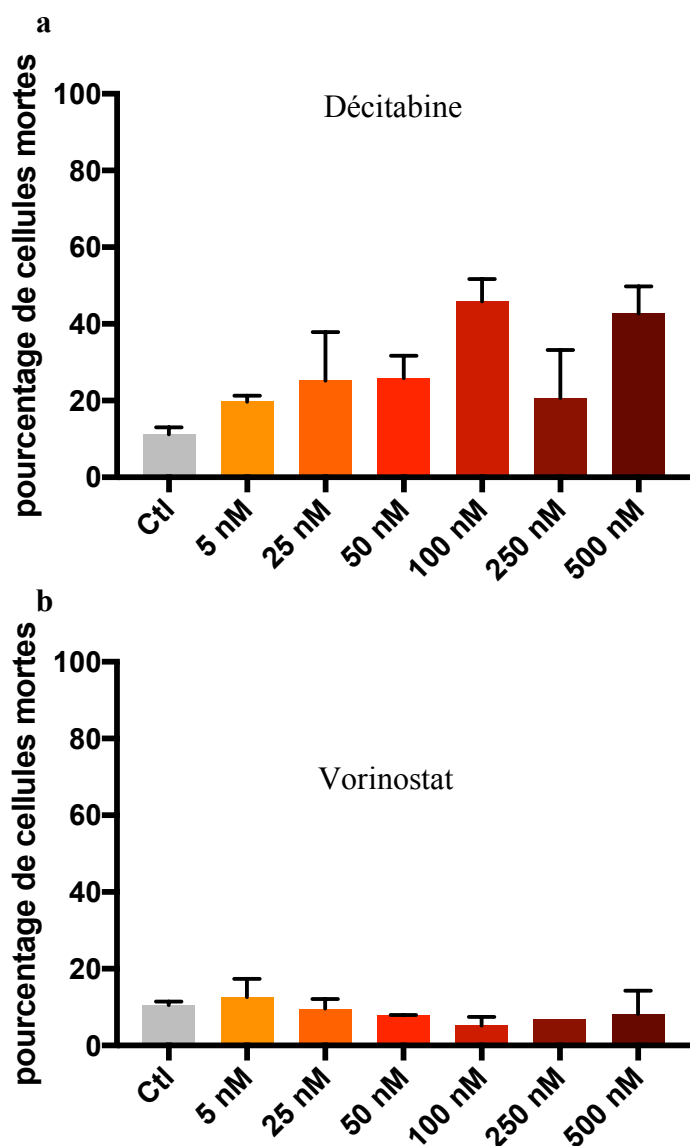
Pour cette expérience on s'attendait à observer l'augmentation de plusieurs marqueurs en présence de Décitabine, due à la déméthylation de l'ADN. Les marqueurs spécifiques à tester sont impliqués dans les voies d'apoptose. Ils ont été choisis car ceux sont des acteurs induisant la cytotoxicité des NK. (Figure 5). L'expression de TRAIL-R1, TRAIL-R2 (voie des récepteurs de mort), HLA A/B/C, puis MICA/B, ULBP1 et ULBP2 (voie mitochondriale) a été suivie après 48h de traitement à la Décitabine (500 nM) sur la lignée 697, en accord avec le protocole établi en collaboration avec le laboratoire du Dr. Noël Raynal. Nous n'avons observé aucune variation significative de l'expression de ces marqueurs. En particulier, l'expression de TRAIL-R2 n'est pas augmentée sur la lignée 697 après traitement à la Décitabine (figure 23). La lyse augmentée par la Décitabine sur la lignée 697 ne semble pas corrélée avec l'expression des marqueurs testés ici. Il serait intéressant de vérifier l'expression génique par PCR. Parallèlement, une observation sur la culture cellulaire a amené l'expérience suivante sur la toxicité potentielle de la Décitabine.



**Figure 23: Le traitement à la Décitabine ne modifie pas significativement l'expression des récepteurs de mort et des ligands des récepteurs activateurs des cellules NK.** Les cellules leucémiques ont été mises en culture en présence de Décitabine à 500 nM pendant 48h. Elles ont ensuite été marquées par des anticorps spécifiques (TRAIL-R1, TRAIL-R2, MIC A/B, ULBP1-PE, ULBP2 et HLA A/B/C) et l'intensité a été analysée par cytométrie en flux. N=2. Test non paramétrique, Mann-Whitney.  $p > 0,05$ , non significatif car pas assez de répétitions d'expériences.

#### **4.2.4 Effet cytotoxique de la Décitabine sur la lignée 697 et non toxique sur les cellules NK**

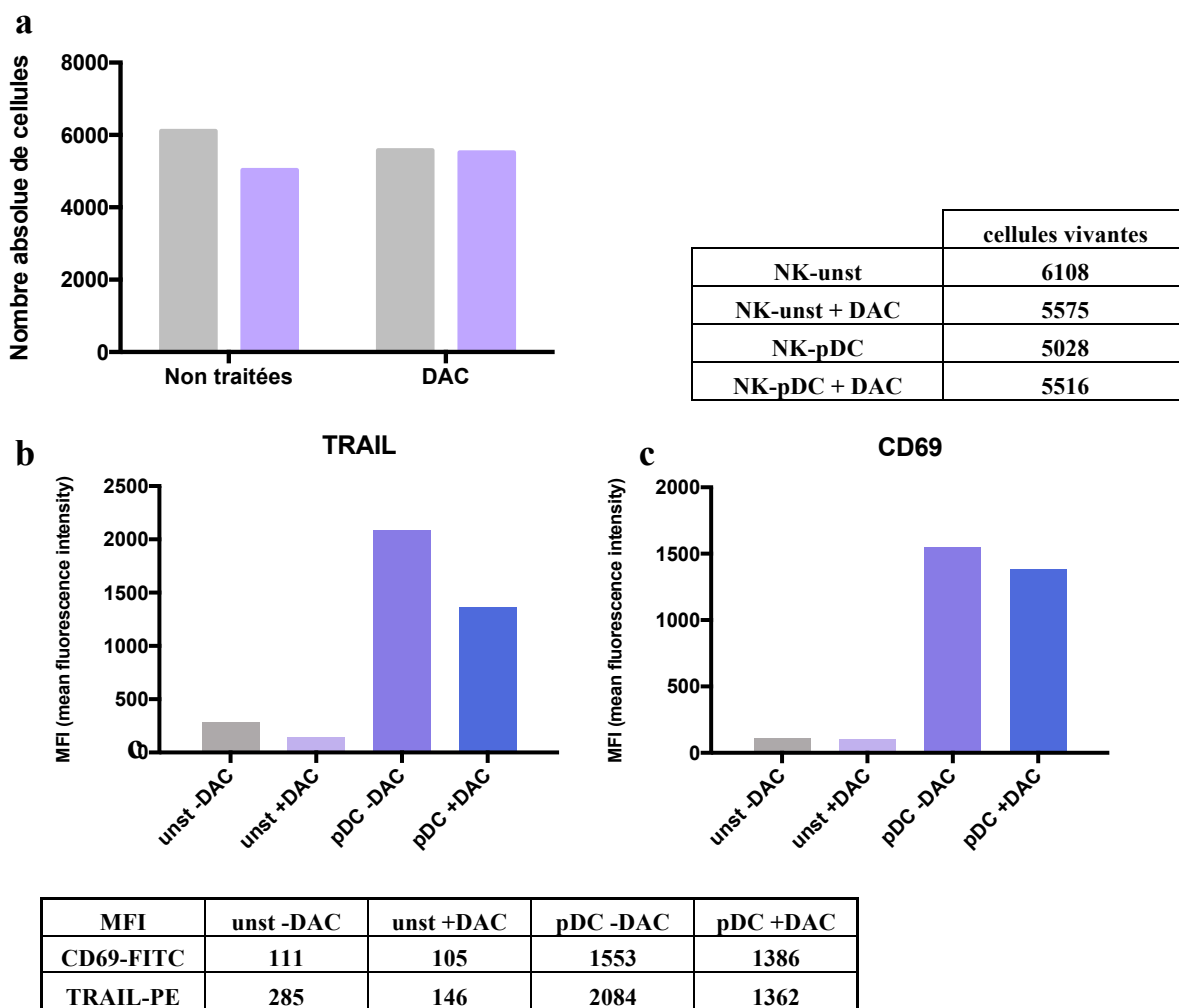
Ici, la toxicité potentielle de la Décitabine a été vérifiée sur les cellules leucémiques 697. En effet, à forte dose elle peut produire des adduits dans l'ADN (Jabbour et al., 2008). Le taux critique de toxicité étant entre 0,5 et 1  $\mu\text{g/ml}$  *in vitro* sur la lignée L1210 (lignée leucémique lymphocytaire) (Covey and Zaharko, 1985). Après 48h de traitement jusqu'à 50% des cellules sont mortes en présence de Décitabine à des concentrations de 100 nM à 500 nM. Seules les cellules exposées à des doses de 250 nM présente une plus grande variabilité. En revanche, en présence de Vorinostat aucune mort cellulaire significative n'est observée sur la lignée 697, (figure 24). Cela pose la question de l'origine de la lyse cellulaire observée en présence de Décitabine (figure 24). Par la suite, cet effet a été vérifié sur les cellules NK.



| Pourcentage de MORT cellulaire après 48h | 0 nM | 5 nM | 25 nM | 50 nM | 100 nM | 250 nM | 500 nM |
|--|------|------|-------|-------|--------|--------|--------|
| Décitabine                               | 9,8  | 20,8 | 34,1  | 30    | 50     | 11,8   | 47,7   |
|  | 12,5 | 18,6 | 16,3  | 21,8  | 41,8   | 29,57  | 37,68  |
| Vorinostat                               | 11,2 | 16   | 7,8   | 7,8   | 6,7    | 6,8    | 12,5   |
|  | 9,8  | 9,3  | 11,4  | 7,9   | 3,6    | 6,8    | 3,9    |

**Figure 24: Toxicité de la Décitabine sur la lignée 697.** Les cellules ont été mises en culture dans un milieu RPMI 10% FBS en présence de Décitabine à des concentrations variant de 5 à 500 nM pendant 48h en plaque 96 puits à 200 000 cellules/ml dans 200 µl a) (similaire pour le Vorinostat b)). La viabilité a ensuite été mesurée par compte cellulaire à l'hématimètre. N=2. Test non paramétrique, Mann-Whitney.  $p > 0,05$ , non significatif car pas assez de répétitions d'expériences.

Nous nous attendions à une possible toxicité de la Décitabine sur les cellules NK. Pour vérifier cela, des cellules NK ont été incubées avec 500 nM (la plus forte concentration utilisée) de Décitabine pendant 48h, les cellules ont ensuite été comptées par hématimètre **a**). Il n'y a aucun effet toxique de la Décitabine sur les cellules NK. Le marqueur CD69 ne présente pas de diminution significative, en revanche le récepteur TRAIL présente une diminution. Ayant été réalisée une seule fois, il s'agit de répéter l'expérience pour vérifier si les résultats sont reproductibles **b et c**). De plus, la lyse peut être due à la réexpression d'autres marqueurs impliqués dans les voies d'apoptose. C'est pourquoi un suivi de la déméthylation globale de l'ADN a été fait (figure 25).

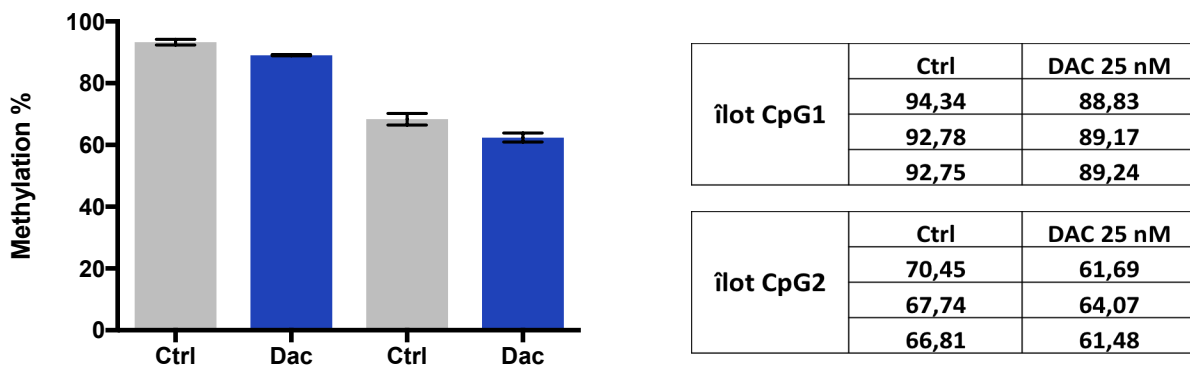


**Figure 25: La Décitabine ne présente aucun effet toxique sur les cellules NK mais une diminution du récepteur TRAIL.** a). Les cellules NK isolées à partir de sang périphérique ont été mises en culture en présence de Décitabine à 500 nM pendant 48h puis lavées. L'énumération des cellules a été effectuée par des compte cellulaire et cytométrie en flux. Les marqueurs TRAIL et CD69 ont été analysés par ajout d'anticorps dans les mêmes conditions b) c). N=1



## 4.2.5 Diminution de la méthylation de l'ADN génomique après traitement à la Décitabine

Nous avons déterminé si la présence de la Décitabine induisait un changement dans la méthylation globale de l'ADN. La méthylation de l'ADN a été suivie sur les cellules 697 après 48h de traitement à la Décitabine (à la plus faible concentration, 25nM pour éviter l'effet toxique). Deux îlots CpG ont été analysés (chapitre 3.5), LINE-1 et ERKV. Ces îlots sont normalement méthylés. Une diminution non significative de la méthylation a été observée sur les deux îlots en présence de Décitabine. A des doses non toxiques pour les cellules 697, l'effet déméthylant de la Décitabine est donc faible, (figure 26).



**Figure 26: Diminution de la méthylation de l'ADN sur la lignée 697 en présence de Décitabine.** Les cellules ont été mises en culture avec 25nM de Décitabine pendant 48h. L'ADN a ensuite été extrait et séquencé sur 2 îlots CpG, LINE-1 et ERKV (tableau 4). N=1. Test non paramétrique, Mann-Whitney.  $p > 0,05$ , non significatif car pas assez de répétitions d'expériences.

## 5. Discussion

Chez les enfants, la LLA est le cancer le plus commun. Environ 15-20 % des patients présentent une LLA réfractaire aux traitements de chimiothérapie ou rechute après une rémission initiale. Ces patients en rechute sont traités par une greffe de cellules souches hématopoïétiques. Cependant, environ 40-50% des patients greffés rechutent et aucun traitement n'est alors disponible. Il est donc essentiel de développer de nouvelles approches pour ces patients ayant des leucémies réfractaires. Une nouvelle approche thérapeutique a été développée dans le laboratoire du Dr. Duval et vise à stimuler le système immunitaire après la greffe de cellules souches hématopoïétiques, pour diminuer les risques de rechute. Les résultats montrent que la majorité des leucémies sont sensibles à cette approche mais nous avons mis en évidence que certaines leucémies étaient résistantes, dont la lignée 697.

Cette étude présentait deux volets :

- Le premier visait à définir les voies d'activation de mort cellulaire médiée par les cellules NK activées par les pDC, en vue de décrire des biomarqueurs prédictifs des patients réfractaires et donc, définir lesquels bénéficieront du transfert de pDC activées.
- Le deuxième volet visait à définir les effets de la drogue Décitabine pour augmenter la sensibilité des cellules leucémiques réfractaires à l'activité cytotoxique des cellules NK activées par les pDC.

D'après les résultats de cette étude, nous observons, une différence de sensibilité des lignées LLA à la lyse cellulaire médiée par les cellules NK activées par les pDC. La lignée REH, présente une lyse médiée majoritairement par les récepteurs de mort cellulaire TRAIL-R1 et TRAIL-R2 via la caspase 8 (Lelaidier et al., 2015), figure 15. Cependant les expériences impliquant les récepteurs TRAIL-R1/R2 nécessite des réplicas. Les résultats pour la lignée Nalm6, étaient inattendus car des expériences de blocage de l'interaction des récepteurs TRAIL avec ses ligands avaient montré une diminution significative de la lyse médiée par les cellules NK activées (Lelaidier et al., 2015). Il doit exister une redondance fonctionnelle entre TRAIL-R1 et TRAIL-R2 et un double KO de ces gènes dans les cellules Nalm6 permettrait de démontrer la redondance potentielle de ces 2 récepteurs. Par ailleurs,

une redondance fonctionnelle entre caspase-8 et 10 a été décrite et pourrait expliquer l'absence d'effet de la délétion de la caspase-8 (Kischkel et al., 2001; Sprick et al., 2002). La lignée Nalm6, contrairement à la lignée REH, présente une lyse cellulaire médiée à la fois par la voie des récepteurs de morts et de la voie mitochondriale. Ces deux lignées sensibles présentent un profil de réponse à la lyse cellulaire qui diffèrent. Le profil de la lignée Nalm6, peut s'expliquer par l'expression plus intense de NKG2D, provoquant une activation plus importante de la voie mitochondriale.

La compréhension fine des voies de mort cellulaire, pour chaque lignée, pourrait permettre de définir des biomarqueurs prédictifs de la sensibilité des leucémies au traitement par les pDC activées. La réponse immunitaire étant constituée d'évènements complexes (réponse immunitaire innée, adaptative), l'identification de ces biomarqueurs nécessite une approche plus globale (Cesano and Warren, 2018). Cette première approche dans l'identification de biomarqueurs a permis de mettre en évidence des premiers critères de sélection dans la thérapie menée par des cellules NK activées par des pDC. Les lignées présentant des mutations au niveau de la voie des récepteurs de mort devraient avoir une réponse faible à cette thérapie. De plus, cette technique d'immunothérapie par l'utilisation des cellules NK activées, pour traiter des cancers, a déjà été utilisée et validée (Salagianni et al., 2012). En effet, un transfert adoptifs de cellules NK de sang de cordon ou de sang périphérique, stimulées avec l'IL-2, montre une efficacité contre la leucémie myéloïde aigue (Bachanova et al., 2014; Yang et al., 2016). Une étude menée sur modèle murin a aussi montré la capacité des cellules NK (cultivées en présence d'IL-15), à éliminer les métastases pulmonaires (lignée cellulaire de carcinome du colon) (Salagianni et al., 2011).

L'activation des NK apparaît plus efficace en présence directe des pDC. Ces cellules produisent un taux important d'IFN- $\alpha$ , premier activateur des NK. Curieusement, les cellules NK activées avec de l'IFN- $\alpha$  présentent une lyse des cellules leucémiques réduite comparée à ceux activés par les pDC (données réalisées en laboratoire). Le contact avec les pDC permettrait une activation optimale des NK. Les cellules NK survivent peu après le transfert *in vivo* en absence de cytokines. Elles ont besoin d'IL-2, d'IL-15, mais ces cytokines induisent des effets secondaires importants (fièvres, frissons, myalgies) (Antony and Dudek, 2010), c'est pourquoi le transfert de pDC activées, après greffe de cellules souches hématopoïétiques, constitue une alternative intéressante aux thérapies à l'IL-2 et IL-15 (objectif long terme de cette étude). La production de pDC est faite en laboratoire à partir de

cellules CD34+, en présence de FLT3-L et TPO (Díaz-Rodríguez et al., 2017). De plus, le transfert adoptif de cellules NK activées ne présentent pas d'effet adverse sur la sévérité de la GvHD (Olson et al., 2010), contrairement aux transferts de cellules T alloréactives (Jacoby et al., 2016).

Cette approche d'immunothérapie par des cellules pDC activant les cellules NK, présente des avantages comparativement aux traitements par les cellules T-CAR. La thérapie par les cellules T-CAR est efficace pour les cancers résistants aux agents conventionnels. Dirigées contre le CD19 (retrouvées à la surface des lymphocytes B), elles montrent une réduction des tumeurs malignes lymphoïdes B (Mehta and Rezvani, 2018). Néanmoins, cette approche par les cellules T-CAR implique un risque élevé d'effet GvHD (Jacoby et al., 2016). De plus, le développement des T-CAR implique l'identification d'antigènes spécifiques à la tumeur, La méthode par transformation virale présente moins de 10% de succès.

Dans le deuxième volet de cette étude, la décitabine augmente la lyse de la lignée résistante 697 médiée par les cellules NK. Cependant, l'étude de partenaires épigénétiques potentiels n'a pas été concluante. Comme cela a été décrit précédemment, la lignée 697 ne présente pas de lyse même en présence de NK activées par les pDC (figure 21). Cette lignée, représentative, confirme que les patients ayant un sous-type de leucémie réfractaire, ayant une mutation des gènes impliqués dans la voie d'apoptose médiée par TRAIL, auraient un bénéfice limité d'un transfert adoptif de pDC activées pour stimuler l'activité cytotoxique des cellules NK. En effet, la lyse observée en présence des NK activées par les pDC passe principalement par la voie des récepteurs TRAIL.

En présence de Décitabine, l'expression des récepteurs de mort et des ligands des récepteurs activateurs des cellules NK n'est pas augmentée. Nous n'avons pas pu mettre en évidence les mécanismes impliqués dans l'augmentation de la cytotoxicité des cellules NK vis-à-vis des cellules 697 traitées à la Décitabine (figure 23). Cependant, dans la littérature, il a été rapporté que chez les patients AML traités avec la Décitabine, l'expression des ARN messagers d'ULBP1 et MICB sont augmentées (Vasu et al., 2016). Pour notre étude, il est possible que la réponse *in vitro* et *in vivo* diffère pour cette drogue, de plus, le protocole utilisé dans cette étude nécessite des ajustements au niveau de la durée d'exposition et de concentration pour obtenir l'effet épigénétique optimal de la Décitabine.

En revanche, en plus de cet effet épigénétique, nous avons constaté que la Décitabine était toxique pour les cellules 697. Des observations similaires ont déjà été effectuées dans d'autres études, entre 400-2000 mg/jour, notamment dans le cancer colorectal, glioblastome et tumeurs mixtes (tumeurs dérivant de plusieurs types de tissus) (Fang et al., 2010; Friday et al., 2012; Schneider et al., 2012). Nous avons déterminé, que la concentration de 25 nM était peu toxique puisque la mort cellulaire induite par la drogue était inférieure à 20%, proche de l'effet du Vorinostat (figure 24). En revanche, il s'est avéré que la méthylation globale de l'ADN génomique était peu affectée par le traitement. La concentration non toxique de Décitabine et ayant un effet déméthylant n'a pas pu être déterminée. Pourtant, une étude, montre qu'un traitement avec la Décitabine induit une réexpression de gènes hyperméthylés chez des patients en rechute (entre autres: PTPRO, GATA4, CLO6A2) (Bhatla et al., 2012). Cependant, cette étude a été menée avec 1  $\mu$ M de Décitabine et il n'est fait mention d'aucune toxicité sur la REH. Il serait donc, intéressant de tester d'autres lignées réfractaires, à l'action des cellules NK, et d'observer, ou non, le même effet. Une expérience préliminaire, confirmant l'étude citée, menée sur la lignée REH, n'a montré aucun effet toxique de la Décitabine (données non montrées). L'utilisation d'une autre lignée réfractaire est nécessaire pour comparer les réponses à la lyse cellulaire.

Cependant, la déméthylation globale de l'ADN, par des drogues épigénétiques est une voie prometteuse pour sensibiliser les leucémies réfractaires à l'action du système immunitaire. Une récente étude montre un lien entre la méthylation de l'ADN et la survie des patients pédiatriques après rechute dans la LLA B et T (Borssén et al., 2018). En effet, les patients CIMP- (phénotype de méthylation des îlots CpG) présentent une survie réduite comparée au groupe CIMP+. En revanche le profil CIMP au moment du diagnostic ne semble pas être associé au taux de rechute ultérieur (Borssén et al., 2018). De plus, cette étude montre une augmentation des sites CpG méthylés lors de la rechute leucémique par rapport aux cellules leucémiques au diagnostic.

La Décitabine, utilisée dans plusieurs études, montre différents effets. Dans le cancer de l'ovaire, en combinaison avec le Temozolomide ou le Carboplatin, la Décitabine montre une déméthylation globale des gènes (Matei et al., 2012; Tawbi et al., 2013). En revanche, dans certains mélanomes réfractaires, en combinaison avec le carboplatin ou le panobinostat et Temozolomide, il n'y a pas d'effet sur les promoteurs des gènes impliqués dans la réparation de l'ADN (Fang et al., 2010; Glasspool et al., 2014; Xia et al., 2014). Le

vorinostat, utilisé dans le cancer colorectal en combinaison avec la 5-fluorouracil-Leucovorin, présente une acétylation de l'histone H3 dans les PBMC. En combinaison avec le Paclitaxel et Bevacizumab, il permet, également, une augmentation de l'acétylation de la protéine Hsp90 (heat shock protein 90) et de la tubuline- $\alpha$  dans le cancer du sein, (Ramaswamy et al., 2012; Zardo et al., 2005).

Par la suite, des tests similaires de toxicité, ont été menés, cette fois sur les cellules NK, activées ou non activées par les pDC. Aucune mort cellulaire significative n'a été observée en présence de Décitabine (figure 25.a). Une étude de 2013, menée sur des cellules NK du sang périphérique, a montré une augmentation de l'expression du récepteur KIR et du récepteur NKp44 ainsi qu'une diminution de la viabilité, de la prolifération et de l'expression du récepteur NKG2D (Kopp et al., 2013). La viabilité et la prolifération des cellules NK étaient affectées à haute dose. Aussi, dans notre étude nous avons démontré que l'expression du récepteur TRAIL était diminuée (figure 25.b), il s'agit maintenant de vérifier la fonctionnalité de ces cellules NK activées par les pDC en présence de Décitabine.

En vue d'optimiser ce protocole de traitement épigénétique, une expérience préliminaire a été réalisée. Un criblage a été effectué sur la lignée 697 incubée 48 h avec des drogues provenant de la compagnie Cayman chemical. L'analyse au HTS (criblage à haut débit), n'a pu identifier de drogue qui présentait un effet sur la lignée 697. Les deux expériences réalisées ne présentaient pas de résultats similaires, elle nécessite d'être améliorée (concentration à déterminer) et répétée. Les drogues identifiées par le criblage seront ensuite testées par des expériences de cytotoxicité sur la lignée 697 (annexe 8).

## **5.1 Conclusion-Perspectives**

Le but de cette étude était de mettre en lumière les mécanismes d'apoptose, impliqués dans la mort des cellules leucémiques, par les NK activées par les pDC et de déterminer si la Décitabine pourrait améliorer l'efficacité de cette immunothérapie. Les résultats obtenus indiquent un effet cytotoxique des cellules NK par la voie TRAIL (voie directe pour l'apoptose). Par contre l'utilisation de cette voie varie en fonction des lignées de LLA utilisées. La voie mitochondriale semble jouer un rôle plus secondaire dans certaines lignées. De plus, la Décitabine, bien que cytotoxique, sur la lignée réfractaire, présente,

également, une toxicité importante. Pour cette raison, nous avons effectué un criblage de drogues épigénétiques. Par contre ces expériences préliminaires, n'ont pas été concluantes pour identifier de meilleures drogues.

Cette étude a permis d'initier un projet d'immunothérapie combinée à de l'épigénétique. En effet cette approche permet de combiner à la fois un aspect épigénétique et un aspect immunothérapeutique. Approche déjà étudiée, notamment par un transfert adoptif de cellule T et traitement préalable des cellules de carcinome mammaire murin par la Décitabine. Cette étude présente une inhibition de la croissance tumorale (Terracina et al., 2016). Cependant, notre approche, présente un avantage certains, notamment en cas de greffe, car les cellules NK ont peu d'effet GvHD. Elle pourrait permettre, d'augmenter la survie des patients, comparé au transfert adoptif de cellules NK seul (Rubnitz et al., 2015). Ces deux volets méritent d'être approfondis et leur combinaison pourrait permettre, à long terme, de développer un traitement chez les enfants atteints de leucémie lymphoblastique aigue réfractaire.

Il serait important de comprendre plus finement les changements induits par les cellules pDC aux cellules NK et de déterminer les cibles potentielles des cellules NK, sur les cellules leucémiques, exposées ou non à la Décitabine et autres drogues. Des expériences devraient être menées sur d'autres lignées leucémiques. Il s'agit, ensuite, de développer des modèles *in vivo*, en modèle murin, permettant d'évaluer la combinaison de ces agents déméthylants avec l'immunothérapie.

Dans un autre projet, il serait également intéressant de combiner les marqueurs et futurs marqueurs de l'apoptose avec des marqueurs déjà déterminés pour d'autres aspects, comme la chimiorésistance. Une étude a montré une résistance à l'agent dexaméthasone dans les lignées sous-exprimées pour les gènes VDAC1 (canal sélectif des anions dépendant de la tension), SNX3 (sorting nexine 3) et PFDN6 (sous-unité 6 de la prefoldine) (Dehghan-Nayeri et al., 2017). Ces marqueurs prédictifs permettraient d'orienter les patients vers des traitements plus ciblés à leurs sous-types.

## Références

- Anfossi, N., André, P., Guia, S., Falk, C.S., Roetynck, S., Stewart, C.A., Bresó, V., Frassati, C., Reviron, D., Middleton, D., et al. (2006). Human NK cell education by inhibitory receptors for MHC class I. *Immunity* 25, 331–342.
- Antony, G.K., and Dudek, A.Z. (2010). Interleukin 2 in cancer therapy. *Curr. Med. Chem.* 17, 3297–3302.
- Bachanova, V., Cooley, S., Defor, T.E., Verneris, M.R., Zhang, B., McKenna, D.H., Curtsinger, J., Panoskaltsis-Mortari, A., Lewis, D., Hippen, K., et al. (2014). Clearance of acute myeloid leukemia by haploidentical natural killer cells is improved using IL-2 diphtheria toxin fusion protein. *Blood* 123, 3855–3863.
- Ballas, Z.K., Rasmussen, W.L., and Krieg, A.M. (1996). Induction of NK activity in murine and human cells by CpG motifs in oligodeoxynucleotides and bacterial DNA. *J. Immunol.* 157, 1840–1845.
- Beagle, B.R., Nguyen, D.M., Mallya, S., Tang, S.S., Lu, M., Zeng, Z., Konopleva, M., Vo, T.-T., and Fruman, D.A. (2015). mTOR kinase inhibitors synergize with histone deacetylase inhibitors to kill B-cell acute lymphoblastic leukemia cells. *Oncotarget* 6, 2088–2100.
- Benton, C.B., Thomas, D.A., Yang, H., Ravandi, F., Rytting, M., O'Brien, S., Franklin, A.R., Borthakur, G., Dara, S., Kwari, M., et al. (2014). Safety and clinical activity of 5-aza-2'-deoxycytidine (decitabine) with or without Hyper-CVAD in relapsed/refractory acute lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol* 167, 356–365.
- Bhatla, T., Wang, J., Morrison, D.J., Raetz, E.A., Burke, M.J., Brown, P., and Carroll, W.L. (2012). Epigenetic reprogramming reverses the relapse-specific gene expression signature and restores chemosensitivity in childhood B-lymphoblastic leukemia. *Blood* 119, 5201–5210.
- Biron, C.A., Nguyen, K.B., Pien, G.C., Cousens, L.P., and Salazar-Mather, T.P. (1999). Natural killer cells in antiviral defense: function and regulation by innate cytokines. *Annu. Rev. Immunol.* 17, 189–220.
- Boatright, K.M., Renatus, M., Scott, F.L., Sperandio, S., Shin, H., Pedersen, I.M., Ricci, J.E., Edris, W.A., Sutherlin, D.P., Green, D.R., et al. (2003). A unified model for apical caspase activation. *Mol. Cell* 11, 529–541.
- Borssén, M., Nordlund, J., Haider, Z., Landfors, M., Larsson, P., Kanerva, J., Schmiegelow, K., Flaegstad, T., Jónsson, Ó.G., Frost, B.-M., et al. (2018). DNA methylation holds prognostic information in relapsed precursor B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Clin*



Epigenetics 10.

Braun, C.J., Witzel, M., Paruzynski, A., Boztug, K., von Kalle, C., Schmidt, M., and Klein, C. (2014). Gene therapy for Wiskott-Aldrich Syndrome—Long-term reconstitution and clinical benefits, but increased risk for leukemogenesis. *Rare Dis* 2.

Burke, M.J., Lamba, J.K., Pounds, S., Cao, X., Ghodke-Puranik, Y., Lindgren, B.R., Weigel, B.J., Verneris, M.R., and Miller, J.S. (2014). A therapeutic trial of decitabine and vorinostat in combination with chemotherapy for relapsed/refractory acute lymphoblastic leukemia. *Am. J. Hematol.* 89, 889–895.

Campbell, K.S., and Purdy, A.K. (2011). Structure/function of human killer cell immunoglobulin-like receptors: lessons from polymorphisms, evolution, crystal structures and mutations. *Immunology* 132, 315–325.

Cesano, A., and Warren, S. (2018). Bringing the Next Generation of Immuno-Oncology Biomarkers to the Clinic. *Biomedicines* 6.

Chaber, R., Gurgul, A., Wróbel, G., Haus, O., Tomoń, A., Kowalczyk, J., Szmatoła, T., Jasielczuk, I., Rybka, B., Ryczan-Krawczyk, R., et al. (2017). Whole-genome DNA methylation characteristics in pediatric precursor B cell acute lymphoblastic leukemia (BCP ALL). *PLoS ONE* 12, e0187422.

Charles A Janeway, J., Travers, P., Walport, M., and Shlomchik, M.J. (2001). The major histocompatibility complex and its functions. *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease*. 5th Edition.

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

Chester, C., Fritsch, K., and Kohrt, H.E. (2015). Natural Killer Cell Immunomodulation: Targeting Activating, Inhibitory, and Co-stimulatory Receptor Signaling for Cancer Immunotherapy. *Front Immunol* 6.

Chistiakov, D.A., Orekhov, A.N., Sobenin, I.A., and Bobryshev, Y.V. (2014). Plasmacytoid dendritic cells: development, functions, and role in atherosclerotic inflammation. *Front Physiol* 5.

Cooper, M.A., Fehniger, T.A., Turner, S.C., Chen, K.S., Ghaehri, B.A., Ghayur, T., Carson, W.E., and Caligiuri, M.A. (2001). Human natural killer cells: a unique innate immunoregulatory role for the CD56(bright) subset. *Blood* 97, 3146–3151.

Covey, J.M., and Zaharko, D.S. (1985). Comparison of the in vitro cytotoxicity (L1210) of 5-aza-2'-deoxycytidine with its therapeutic and toxic effects in mice. *Eur J Cancer Clin Oncol*

21, 109–117.

Crowder, R.N., and El-Deiry, W.S. (2012). Caspase-8 regulation of TRAIL-mediated cell death. *Exp. Oncol.* 34, 160–164.

Danby, R., and Rocha, V. (2014). Improving engraftment and immune reconstitution in umbilical cord blood transplantation. *Front Immunol* 5, 68.

Dehghan-Nayeri, N., Rezaei-Tavirani, M., Omrani, M.D., Gharehbaghian, A., Goudarzi Pour, K., and Eshghi, P. (2017). Identification of potential predictive markers of dexamethasone resistance in childhood acute lymphoblastic leukemia. *J Cell Commun Signal* 11, 137–145.

Deligezer, U., and Dalay, N. (2007). Expression of the TRAIL receptors in blood mononuclear cells in leukemia. *Pathol. Oncol. Res.* 13, 290–294.

Dhe-Paganon, S., Syeda, F., and Park, L. (2011). DNA methyl transferase 1: regulatory mechanisms and implications in health and disease. *Int J Biochem Mol Biol* 2, 58–66.

Díaz-Rodríguez, Y., Cordeiro, P., Belounis, A., Herblot, S., and Duval, M. (2017). In vitro differentiated plasmacytoid dendritic cells as a tool to induce anti-leukemia activity of natural killer cells. *Cancer Immunol Immunother* 66, 1307–1320.

van Dongen, J.J., Seriu, T., Panzer-Grümayer, E.R., Biondi, A., Pongers-Willemse, M.J., Corral, L., Stolz, F., Schrappe, M., Masera, G., Kamps, W.A., et al. (1998). Prognostic value of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukaemia in childhood. *Lancet* 352, 1731–1738.

Donhauser, N., Helm, M., Pritschet, K., Schuster, P., Ries, M., Korn, K., Vollmer, J., and Schmidt, B. (2010). Differential effects of P-class versus other CpG oligodeoxynucleotide classes on the impaired innate immunity of plasmacytoid dendritic cells in HIV type 1 infection. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 26, 161–171.

Ehrhardt, H., Wachter, F., Maurer, M., Stahnke, K., and Jeremias, I. (2011). Important role of caspase-8 for chemosensitivity of ALL cells. *Clin. Cancer Res.* 17, 7605–7613.

Einsiedel, H.G., Kawan, L., Eckert, C., Witt, O., Fichtner, I., Henze, G., and Seeger, K. (2006). Histone deacetylase inhibitors have antitumor activity in two NOD/SCID mouse models of B-cell precursor childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 20, 1435–1436.

Fang, F., Balch, C., Schilder, J., Breen, T., Zhang, S., Shen, C., Li, L., Kulesavage, C., Snyder, A.J., Nephew, K.P., et al. (2010). A phase 1 and pharmacodynamic study of decitabine in combination with carboplatin in patients with recurrent, platinum-resistant, epithelial ovarian cancer. *Cancer* 116, 4043–4053.

Faure, M., Barber, D.F., Takahashi, S.M., Jin, T., and Long, E.O. (2003). Spontaneous

clustering and tyrosine phosphorylation of NK cell inhibitory receptor induced by ligand binding. *J. Immunol.* *170*, 6107–6114.

Figueroa, M.E., Chen, S.-C., Andersson, A.K., Phillips, L.A., Li, Y., Sotzen, J., Kundu, M., Downing, J.R., Melnick, A., and Mullighan, C.G. (2013). Integrated genetic and epigenetic analysis of childhood acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Invest* *123*, 3099–3111.

Findley, H.W., Cooper, M.D., Kim, T.H., Alvarado, C., and Ragab, A.H. (1982). Two new acute lymphoblastic leukemia cell lines with early B-cell phenotypes. *Blood* *60*, 1305–1309.

Fischer, U., Forster, M., Rinaldi, A., Risch, T., Sungalee, S., Warnatz, H.-J., Bornhauser, B., Gombert, M., Kratsch, C., Stütz, A.M., et al. (2015). Genomics and drug profiling of fatal TCF3-HLF-positive acute lymphoblastic leukemia identifies recurrent mutation patterns and therapeutic options. *Nat. Genet.* *47*, 1020–1029.

Friday, B.B., Anderson, S.K., Buckner, J., Yu, C., Giannini, C., Geoffroy, F., Schwerkoske, J., Mazurczak, M., Gross, H., Pajon, E., et al. (2012). Phase II trial of vorinostat in combination with bortezomib in recurrent glioblastoma: a north central cancer treatment group study. *Neuro-Oncology* *14*, 215–221.

Gaynon, P.S., Steinherz, P.G., Bleyer, W.A., Finklestein, J.Z., Miller, D.R., Reaman, G.H., Sather, H.N., and Hammond, G.D. (1991). Association of delivered drug dose and outcome for children with acute lymphoblastic leukemia and unfavorable presenting features. *Med. Pediatr. Oncol.* *19*, 221–227.

Glasspool, R.M., Brown, R., Gore, M.E., Rustin, G.J.S., McNeish, I.A., Wilson, R.H., Pledge, S., Paul, J., Mackean, M., Hall, G.D., et al. (2014). A randomised, phase II trial of the DNA-hypomethylating agent 5-aza-2'-deoxycytidine (decitabine) in combination with carboplatin vs carboplatin alone in patients with recurrent, partially platinum-sensitive ovarian cancer. *Br. J. Cancer* *110*, 1923–1929.

Gross, O., Grupp, C., Steinberg, C., Zimmermann, S., Strasser, D., Hanneschläger, N., Reindl, W., Jonsson, H., Huo, H., Littman, D.R., et al. (2008). Multiple ITAM-coupled NK-cell receptors engage the Bcl10/Malt1 complex via Carma1 for NF- $\kappa$ B and MAPK activation to selectively control cytokine production. *Blood* *112*, 2421–2428.

Hagberg, N., Berggren, O., Leonard, D., Weber, G., Bryceson, Y.T., Alm, G.V., Eloranta, M.-L., and Rönnblom, L. (2011). IFN- $\alpha$  production by plasmacytoid dendritic cells stimulated with RNA-containing immune complexes is promoted by NK cells via MIP-1 $\beta$  and LFA-1. *J. Immunol.* *186*, 5085–5094.

Hanabuchi, S., Watanabe, N., Wang, Y.-H., Wang, Y.-H., Ito, T., Shaw, J., Cao, W., Qin, F.X.-F., and Liu, Y.-J. (2006). Human plasmacytoid predendritic cells activate NK cells

through glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor-ligand (GITRL). *Blood* *107*, 3617–3623.

Heltemes-Harris, L.M., Willette, M.J.L., Ramsey, L.B., Qiu, Y.H., Neeley, E.S., Zhang, N., Thomas, D.A., Koeuth, T., Baechler, E.C., Kornblau, S.M., et al. (2011). *Ebf1* or *Pax5* haploinsufficiency synergizes with *STAT5* activation to initiate acute lymphoblastic leukemia. *J. Exp. Med.* *208*, 1135–1149.

Hervas-Stubbs, S., Perez-Gracia, J.L., Rouzaut, A., Sanmamed, M.F., Le Bon, A., and Melero, I. (2011). Direct effects of type I interferons on cells of the immune system. *Clin. Cancer Res.* *17*, 2619–2627.

Hunger, S.P., Loh, M.L., Whitlock, J.A., Winick, N.J., Carroll, W.L., Devidas, M., Raetz, E.A., and COG Acute Lymphoblastic Leukemia Committee (2013). Children’s Oncology Group’s 2013 blueprint for research: acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Blood Cancer* *60*, 957–963.

Hurwitz, R., Hozier, J., LeBien, T., Minowada, J., Gajl-Peczalska, K., Kubonishi, I., and Kersey, J. (1979). Characterization of a leukemic cell line of the pre-B phenotype. *Int. J. Cancer* *23*, 174–180.

Jabbour, E., Issa, J.-P., Garcia-Manero, G., and Kantarjian, H. (2008). Evolution of Decitabine Development. *Cancer* *112*, 2341–2351.

Jacoby, E., Yang, Y., Qin, H., Chien, C.D., Kochenderfer, J.N., and Fry, T.J. (2016). Murine allogeneic CD19 CAR T cells harbor potent antileukemic activity but have the potential to mediate lethal GVHD. *Blood* *127*, 1361–1370.

Jarsova, M., Volejnikova, J., Porizkova, I., Holzerova, M., Pospisilova, D., Novak, Z., Vrbkova, J., and Mihal, V. (2016). Chromosomal aberrations in childhood acute lymphoblastic leukemia: 15-year single center experience. *Cancer Genet* *209*, 340–347.

Ji, B.T., Shu, X.O., Linet, M.S., Zheng, W., Wacholder, S., Gao, Y.T., Ying, D.M., and Jin, F. (1997). Paternal cigarette smoking and the risk of childhood cancer among offspring of nonsmoking mothers. *J. Natl. Cancer Inst.* *89*, 238–244.

Jongmans, M.C.J., Kuiper, R.P., Carmichael, C.L., Wilkins, E.J., Dors, N., Carmagnac, A., Schouten-van Meeteren, A.Y.N., Li, X., Stankovic, M., Kamping, E., et al. (2010). Novel *RUNX1* mutations in familial platelet disorder with enhanced risk for acute myeloid leukemia: clues for improved identification of the FPD/AML syndrome. *Leukemia* *24*, 242–246.

Kanda, J. (2013). Effect of HLA mismatch on acute graft-versus-host disease. *Int. J. Hematol.* *98*, 300–308.

- Karamitros, D., Stoilova, B., Aboukhalil, Z., Hamey, F., Reinisch, A., Samitsch, M., Quek, L., Otto, G., Repapi, E., Doondeea, J., et al. (2018). Heterogeneity of human lympho-myeloid progenitors at the single cell level. *Nat Immunol* *19*, 85–97.
- Kiefer, K., Oropallo, M.A., Cancro, M.P., and Marshak-Rothstein, A. (2012). Role of type I interferons in the activation of autoreactive B cells. *Immunol Cell Biol* *90*, 498–504.
- Kiessling, R., Klein, E., and Wigzell, H. (1975). “Natural” killer cells in the mouse. I. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Specificity and distribution according to genotype. *Eur. J. Immunol.* *5*, 112–117.
- Kischkel, F.C., Lawrence, D.A., Tinel, A., LeBlanc, H., Virmani, A., Schow, P., Gazdar, A., Blenis, J., Arnott, D., and Ashkenazi, A. (2001). Death receptor recruitment of endogenous caspase-10 and apoptosis initiation in the absence of caspase-8. *J. Biol. Chem.* *276*, 46639–46646.
- Kolb, H.-J. (2008). Graft-versus-leukemia effects of transplantation and donor lymphocytes. *Blood* *112*, 4371–4383.
- Kopp, L.M., Ray, A., Denman, C.J., Senyukov, V.S., Somanchi, S.S., Zhu, S., and Lee, D.A. (2013). Decitabine has a biphasic effect on natural killer cell viability, phenotype, and function under proliferative conditions. *Mol. Immunol.* *54*, 296–301.
- Kuba, A., and Raida, L. (2018). Graft versus Host Disease: From Basic Pathogenic Principles to DNA Damage Response and Cellular Senescence. *Mediators Inflamm.* *2018*, 9451950.
- Le Bon, A., Schiavoni, G., D’Agostino, G., Gresser, I., Belardelli, F., and Tough, D.F. (2001). Type I interferons potently enhance humoral immunity and can promote isotype switching by stimulating dendritic cells in vivo. *Immunity* *14*, 461–470.
- Leclerc, G.J., Mou, C., Leclerc, G.M., Mian, A.M., and Barredo, J.C. (2010). Histone deacetylase inhibitors induce FPGS mRNA expression and intracellular accumulation of long-chain methotrexate polyglutamates in childhood acute lymphoblastic leukemia: implications for combination therapy. *Leukemia* *24*, 552–562.
- Lelaidier, M., Diaz-Rodriguez, Y., Cordeau, M., Cordeiro, P., Haddad, E., Herblot, S., and Duval, M. (2015). TRAIL-mediated killing of acute lymphoblastic leukemia by plasmacytoid dendritic cell-activated natural killer cells. *Oncotarget* *6*, 29440–29455.
- Li, Y., and Sun, R. (2018). Tumor immunotherapy: New aspects of natural killer cells. *Chin J Cancer Res* *30*, 173–196.
- Li, P., Zhou, L., Zhao, T., Liu, X., Zhang, P., Liu, Y., Zheng, X., and Li, Q. (2017a). Caspase-9: structure, mechanisms and clinical application. *Oncotarget* *8*, 23996–24008.
- Li, Y., Zhou, M., Hu, Q., Bai, X., Huang, W., Scheres, S.H.W., and Shi, Y. (2017b).

Mechanistic insights into caspase-9 activation by the structure of the apoptosome holoenzyme. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *114*, 1542.

Li, Z., Li, S.-P., Li, R.-Y., Zhu, H., Liu, X., Guo, X.-L., Mu, L.-L., Cai, J.-J., Bai, F., Chen, G.-Q., et al. (2018). Leukaemic alterations of IKZF1 prime stemness and malignancy programs in human lymphocytes. *Cell Death Dis* *9*.

Ljungman, P., Urbano-Ispizua, A., Cavazzana-Calvo, M., Demirer, T., Dini, G., Einsele, H., Gratwohl, A., Madrigal, A., Niederwieser, D., Passweg, J., et al. (2006). Allogeneic and autologous transplantation for haematological diseases, solid tumours and immune disorders: definitions and current practice in Europe. *Bone Marrow Transplant*. *37*, 439–449.

Ma, X., Buffler, P.A., Gunier, R.B., Dahl, G., Smith, M.T., Reinier, K., and Reynolds, P. (2002). Critical windows of exposure to household pesticides and risk of childhood leukemia. *Environ. Health Perspect.* *110*, 955–960.

Mahoney, M.C., Moysich, K.B., McCarthy, P.L., McDonald, R.C., Stepanenko, V.F., Day, R.W., and Michalek, A.M. (2004). The Chernobyl childhood leukemia study: background & lessons learned. *Environ Health* *3*, 12.

Matei, D., Fang, F., Shen, C., Schilder, J., Arnold, A., Zeng, Y., Berry, W.A., Huang, T., and Nephew, K.P. (2012). Epigenetic resensitization to platinum in ovarian cancer. *Cancer Res.* *72*, 2197–2205.

Mathan, T.S.M.M., Figdor, C.G., and Buschow, S.I. (2013). Human plasmacytoid dendritic cells: from molecules to intercellular communication network. *Front Immunol* *4*, 372.

McWilliams, E.M., Mele, J.M., Cheney, C., Timmerman, E.A., Fiazuddin, F., Strattan, E.J., Mo, X., Byrd, J.C., Muthusamy, N., and Awan, F.T. (2016). Therapeutic CD94/NKG2A blockade improves natural killer cell dysfunction in chronic lymphocytic leukemia. *Oncoimmunology* *5*.

Mehta, R.S., and Rezvani, K. (2018). Chimeric Antigen Receptor Expressing Natural Killer Cells for the Immunotherapy of Cancer. *Front Immunol* *9*, 283.

Meinhardt, K., Kroeger, I., Bauer, R., Ganss, F., Ovsy, I., Rothamer, J., Büttner, M., Atreya, I., Waldner, M., Bittrich, M., et al. (2015). Identification and characterization of the specific murine NK cell subset supporting graft-versus-leukemia- and reducing graft-versus-host-effects. *Oncoimmunology* *4*.

Merindol, N., Salem Fourati, I., Brito, R.-M., Grenier, A.-J., Charrier, E., Cordeiro, P., Caty, M., Mezziani, S., Malette, B., Duval, M., et al. (2012). Reconstitution of protective immune responses against cytomegalovirus and varicella zoster virus does not require disease

development in pediatric recipients of umbilical cord blood transplantation. *J. Immunol.* *189*, 5016–5028.

Milani, L., Lundmark, A., Kiialainen, A., Nordlund, J., Flaegstad, T., Forestier, E., Heyman, M., Jonmundsson, G., Kanerva, J., Schmiegelow, K., et al. (2010). DNA methylation for subtype classification and prediction of treatment outcome in patients with childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* *115*, 1214–1225.

Momparler, R.L. (2005). Pharmacology of 5-Aza-2'-deoxycytidine (decitabine). *Semin. Hematol.* *42*, S9-16.

Momparler, R.L., Bouffard, D.Y., Momparler, L.F., Dionne, J., Belanger, K., and Ayoub, J. (1997). Pilot phase I-II study on 5-aza-2'-deoxycytidine (Decitabine) in patients with metastatic lung cancer. *Anticancer Drugs* *8*, 358–368.

Moore, T.B., and Sakamoto, K.M. (2005). Topics in Pediatric Leukemia – Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *MedGenMed* *7*, 19.

Moosavi, A., and Ardekani, A.M. (2016). Role of Epigenetics in Biology and Human Diseases. *Iran Biomed J* *20*, 246–258.

Morales, V., Giamarchi, C., Chailleux, C., Moro, F., Marsaud, V., Le Ricousse, S., and Richard-Foy, H. (2001). Chromatin structure and dynamics: functional implications. *Biochimie* *83*, 1029–1039.

Morishima, S., Kashiwase, K., Matsuo, K., Azuma, F., Yabe, T., Sato-Otsubo, A., Ogawa, S., Shiina, T., Satake, M., Saji, H., et al. (2016). High-risk HLA alleles for severe acute graft-versus-host disease and mortality in unrelated donor bone marrow transplantation. *Haematologica* *101*, 491–498.

Nie, J., Liu, L., Li, X., and Han, W. (2014). Decitabine, a new star in epigenetic therapy: the clinical application and biological mechanism in solid tumors. *Cancer Lett.* *354*, 12–20.

Nigro, J.M., Baker, S.J., Preisinger, A.C., Jessup, J.M., Hostetter, R., Cleary, K., Bigner, S.H., Davidson, N., Baylin, S., and Devilee, P. (1989). Mutations in the p53 gene occur in diverse human tumour types. *Nature* *342*, 705–708.

O'Leary, J.G., Goodarzi, M., Drayton, D.L., and von Andrian, U.H. (2006). T cell- and B cell-independent adaptive immunity mediated by natural killer cells. *Nat. Immunol.* *7*, 507–516.

Olson, J.A., Leveson-Gower, D.B., Gill, S., Baker, J., Beilhack, A., and Negrin, R.S. (2010). NK cells mediate reduction of GVHD by inhibiting activated, alloreactive T cells while retaining GVT effects. *Blood* *115*, 4293–4301.

Oshima, T., Sato, S., Kato, J., Ito, Y., Watanabe, T., Tsuji, I., Hori, A., Kurokawa, T., and

Kokubo, T. (2013). Nectin-2 is a potential target for antibody therapy of breast and ovarian cancers. *Mol. Cancer* *12*, 60.

Öz, S., Raddatz, G., Rius, M., Blagitko-Dorfs, N., Lübbert, M., Maercker, C., and Lyko, F. (2014). Quantitative determination of decitabine incorporation into DNA and its effect on mutation rates in human cancer cells. *Nucleic Acids Res* *42*, e152.

Paulsson, K., and Johansson, B. (2009). High hyperdiploid childhood acute lymphoblastic leukemia. *Genes Chromosomes Cancer* *48*, 637–660.

Pende, D., Rivera, P., Marcenaro, S., Chang, C.-C., Biassoni, R., Conte, R., Kubin, M., Cosman, D., Ferrone, S., Moretta, L., et al. (2002). Major histocompatibility complex class I-related chain A and UL16-binding protein expression on tumor cell lines of different histotypes: analysis of tumor susceptibility to NKG2D-dependent natural killer cell cytotoxicity. *Cancer Res.* *62*, 6178–6186.

Phillips, C.L., Davies, S.M., McMasters, R., Absalon, M., O'Brien, M., Mo, J., Broun, R., Moscow, J.A., Smolarek, T., Garzon, R., et al. (2013). Low dose decitabine in very high risk relapsed or refractory acute myeloid leukaemia in children and young adults. *Br. J. Haematol.* *161*, 406–410.

Pogue, S.L., Preston, B.T., Stalder, J., Bebbington, C.R., and Cardarelli, P.M. (2004). The receptor for type I IFNs is highly expressed on peripheral blood B cells and monocytes and mediates a distinct profile of differentiation and activation of these cells. *J. Interferon Cytokine Res.* *24*, 131–139.

Pordzik, S., Petrovici, K., Schmid, C., Kroell, T., Schweiger, C., Köhne, C.-H., and Schmetzer, H. (2011). Expression and prognostic value of FAS receptor/FAS ligand and TrailR1/TrailR2 in acute myeloid leukemia. *Hematology* *16*, 341–350.

Puchalapalli, M., Zeng, X., Mu, L., Anderson, A., Hix Glickman, L., Zhang, M., Sayyad, M.R., Mosticone Wangenstein, S., Clevenger, C.V., and Koblinski, J.E. (2016). NSG Mice Provide a Better Spontaneous Model of Breast Cancer Metastasis than Athymic (Nude) Mice. *PLoS One* *11*.

Pui, C.-H., Yang, J.J., Hunger, S.P., Pieters, R., Schrappe, M., Biondi, A., Vora, A., Baruchel, A., Silverman, L.B., Schmiegelow, K., et al. (2015). Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia: Progress Through Collaboration. *J. Clin. Oncol.* *33*, 2938–2948.

Ramaswamy, B., Fiskus, W., Cohen, B., Pellegrino, C., Hershman, D.L., Chuang, E., Luu, T., Somlo, G., Goetz, M., Swaby, R., et al. (2012). Phase I-II study of vorinostat plus paclitaxel and bevacizumab in metastatic breast cancer: evidence for vorinostat-induced tubulin acetylation and Hsp90 inhibition in vivo. *Breast Cancer Res. Treat.* *132*, 1063–1072.



- Robinson, R.T. (2015). IL12R $\beta$ 1: The cytokine receptor that we used to know. *Cytokine* *71*, 348–359.
- Roof, C., Richter, A., Konkolefski, C., Knuebel, G., Sekora, A., Krohn, S., Stenzel, J., Krause, B.J., Vollmar, B., Murua Escobar, H., et al. (2018). Decitabine demonstrates antileukemic activity in B cell precursor acute lymphoblastic leukemia with MLL rearrangements. *J Hematol Oncol* *11*, 62.
- Rosenfeld, C., Goutner, A., Choquet, C., Venuat, A.M., Kayibanda, B., Pico, J.L., and Greaves, M.F. (1977). Phenotypic characterisation of a unique non-T, non-B acute lymphoblastic leukaemia cell line. *Nature* *267*, 841–843.
- Rubnitz, J.E., Inaba, H., Kang, G., Gan, K., Hartford, C., Triplett, B.M., Dallas, M., Shook, D., Gruber, T., Pui, C.-H., et al. (2015). Natural Killer Cell Therapy in Children with Relapsed Leukemia. *Pediatr Blood Cancer* *62*, 1468–1472.
- Ruggeri, L., Capanni, M., Casucci, M., Volpi, I., Tosti, A., Perruccio, K., Urbani, E., Negrin, R.S., Martelli, M.F., and Velardi, A. (1999). Role of natural killer cell alloreactivity in HLA-mismatched hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* *94*, 333–339.
- Salagianni, M., Lekka, E., Moustaki, A., Iliopoulou, E.G., Baxevanis, C.N., Papamichail, M., and Perez, S.A. (2011). NK cell adoptive transfer combined with Ontak-mediated regulatory T cell elimination induces effective adaptive antitumor immune responses. *J. Immunol.* *186*, 3327–3335.
- Salagianni, M., Baxevanis, C.N., Papamichail, M., and Perez, S.A. (2012). New insights into the role of NK cells in cancer immunotherapy. *Oncoimmunology* *1*, 205–207.
- Satpathy, A.T., Wu, X., Albring, J.C., and Murphy, K.M. (2012). Re(de)fining the dendritic cell lineage. *Nat Immunol* *13*, 1145–1154.
- Schmelz, K., Sattler, N., Wagner, M., Lübbert, M., Dörken, B., and Tamm, I. (2005). Induction of gene expression by 5-Aza-2'-deoxycytidine in acute myeloid leukemia (AML) and myelodysplastic syndrome (MDS) but not epithelial cells by DNA-methylation-dependent and -independent mechanisms. *Leukemia* *19*, 103–111.
- Schneider, B.J., Kalemkerian, G.P., Bradley, D., Smith, D.C., Egorin, M.J., Daignault, S., Dunn, R., and Hussain, M. (2012). Phase I study of vorinostat (suberoylanilide hydroxamic acid, NSC 701852) in combination with docetaxel in patients with advanced and relapsed solid malignancies. *Invest New Drugs* *30*, 249–257.
- Seth, R.B., Sun, L., and Chen, Z.J. (2006). Antiviral innate immunity pathways. *Cell Res.* *16*, 141–147.
- Sivori, S., Carlomagno, S., Pesce, S., Moretta, A., Vitale, M., and Marcenaro, E. (2014).

- TLR/NCR/KIR: Which One to Use and When? *Front Immunol* 5, 105.
- Smith, B.C., and Denu, J.M. (2009). Chemical mechanisms of histone lysine and arginine modifications. *Biochim Biophys Acta* 1789, 45–57.
- Spitzer, J.H., and Meadows, G.G. (1999). Modulation of perforin, granzyme A, and granzyme B in murine natural killer (NK), IL2 stimulated NK, and lymphokine-activated killer cells by alcohol consumption. *Cell. Immunol.* 194, 205–212.
- Sprick, M.R., Rieser, E., Stahl, H., Grosse-Wilde, A., Weigand, M.A., and Walczak, H. (2002). Caspase-10 is recruited to and activated at the native TRAIL and CD95 death-inducing signalling complexes in a FADD-dependent manner but can not functionally substitute caspase-8. *EMBO J* 21, 4520–4530.
- Srinivasula, S.M., Ahmad, M., Fernandes-Alnemri, T., and Alnemri, E.S. (1998). Autoactivation of procaspase-9 by Apaf-1-mediated oligomerization. *Mol. Cell* 1, 949–957.
- Stresemann, C., and Lyko, F. (2008). Modes of action of the DNA methyltransferase inhibitors azacytidine and decitabine. *Int. J. Cancer* 123, 8–13.
- Strichman-Almashanu, L.Z., Lee, R.S., Onyango, P.O., Perlman, E., Flam, F., Frieman, M.B., and Feinberg, A.P. (2002). A Genome-Wide Screen for Normally Methylated Human CpG Islands That Can Identify Novel Imprinted Genes. *Genome Res* 12, 543–554.
- Tarakhovsky, A. (2010). Tools and landscapes of epigenetics. *Nat. Immunol.* 11, 565–568.
- Tawbi, H.A., Beumer, J.H., Tarhini, A.A., Moschos, S., Buch, S.C., Egorin, M.J., Lin, Y., Christner, S., and Kirkwood, J.M. (2013). Safety and efficacy of decitabine in combination with temozolomide in metastatic melanoma: a phase I/II study and pharmacokinetic analysis. *Ann. Oncol.* 24, 1112–1119.
- Terracina, K.P., Graham, L.J., Payne, K.K., Manjili, M.H., Baek, A., Damle, S.R., and Bear, H.D. (2016). DNA methyltransferase inhibition increases efficacy of adoptive cellular immunotherapy of murine breast cancer. *Cancer Immunol. Immunother.* 65, 1061–1073.
- Terwilliger, T., and Abdul-Hay, M. (2017). Acute lymphoblastic leukemia: a comprehensive review and 2017 update. *Blood Cancer J* 7, e577.
- Torelli, G.F., Peragine, N., Raponi, S., Pagliara, D., De Propris, M.S., Vitale, A., Bertaina, A., Barberi, W., Moretta, L., Basso, G., et al. (2014). Recognition of adult and pediatric acute lymphoblastic leukemia blasts by natural killer cells. *Haematologica* 99, 1248–1254.
- Tough, D.F., Sun, S., and Sprent, J. (1997). T Cell Stimulation In Vivo by Lipopolysaccharide (LPS). *J Exp Med* 185, 2089–2094.
- Uckelmann, M., and Sixma, T.K. (2017). Histone ubiquitination in the DNA damage response. *DNA Repair (Amst.)* 56, 92–101.

- Ullah, M.A., Hill, G.R., and Tey, S.-K. (2016). Functional Reconstitution of Natural Killer Cells in Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Front Immunol* 7.
- Urlaub, D., Höfer, K., Müller, M.-L., and Watzl, C. (2017). LFA-1 Activation in NK Cells and Their Subsets: Influence of Receptors, Maturation, and Cytokine Stimulation. *J. Immunol.* 198, 1944–1951.
- Varon, R., Reis, A., Henze, G., von Einsiedel, H.G., Sperling, K., and Seeger, K. (2001). Mutations in the Nijmegen Breakage Syndrome gene (NBS1) in childhood acute lymphoblastic leukemia (ALL). *Cancer Res.* 61, 3570–3572.
- Vasu, S., He, S., Cheney, C., Gopalakrishnan, B., Mani, R., Lozanski, G., Mo, X., Groh, V., Whitman, S.P., Konopitzky, R., et al. (2016). Decitabine enhances anti-CD33 monoclonal antibody BI 836858-mediated natural killer ADCC against AML blasts. *Blood* 127, 2879–2889.
- Verneris, M.R. (2013). NK Cell - KIR-TREGs: How to Manipulate a Graft for Optimal GVL. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2013, 335–341.
- de Vries, J.F., Wammes, L.J., Jedema, I., van Dreunen, L., Nijmeijer, B.A., Heemskerk, M.H.M., Willemze, R., Falkenburg, J.H.F., and Barge, R.M.Y. (2007). Involvement of caspase-8 in chemotherapy-induced apoptosis of patient derived leukemia cell lines independent of the death receptor pathway and downstream from mitochondria. *Apoptosis* 12, 181–193.
- Walczak, H., Degli-Esposti, M.A., Johnson, R.S., Smolak, P.J., Waugh, J.Y., Boiani, N., Timour, M.S., Gerhart, M.J., Schooley, K.A., Smith, C.A., et al. (1997). TRAIL-R2: a novel apoptosis-mediating receptor for TRAIL. *EMBO J* 16, 5386–5397.
- Wang, C., and Youle, R.J. (2009). The Role of Mitochondria in Apoptosis. *Annu Rev Genet* 43, 95–118.
- Weissman, I.L., and Shizuru, J.A. (2008). The origins of the identification and isolation of hematopoietic stem cells, and their capability to induce donor-specific transplantation tolerance and treat autoimmune diseases. *Blood* 112, 3543–3553.
- Wu, G.S., and Ding, Z. (2002). Caspase 9 is required for p53-dependent apoptosis and chemosensitivity in a human ovarian cancer cell line. *Oncogene* 21, 1–8.
- Xia, C., Leon-Ferre, R., Laux, D., Deutsch, J., Smith, B.J., Frees, M., and Milhem, M. (2014). Treatment of resistant metastatic melanoma using sequential epigenetic therapy (decitabine and panobinostat) combined with chemotherapy (temozolomide). *Cancer Chemother. Pharmacol.* 74, 691–697.
- Yang, Y., Lim, O., Kim, T.M., Ahn, Y.-O., Choi, H., Chung, H., Min, B., Her, J.H., Cho,

- S.Y., Keam, B., et al. (2016). Phase I Study of Random Healthy Donor-Derived Allogeneic Natural Killer Cell Therapy in Patients with Malignant Lymphoma or Advanced Solid Tumors. *Cancer Immunol Res* 4, 215–224.
- Young, C.S., Clarke, K.M., Kettyle, L.M., Thompson, A., and Mills, K.I. (2017). Decitabine-Vorinostat combination treatment in acute myeloid leukemia activates pathways with potential for novel triple therapy. *Oncotarget* 8, 51429–51446.
- Zardo, G., Fazi, F., Travaglini, L., and Nervi, C. (2005). Dynamic and reversibility of heterochromatic gene silencing in human disease. *Cell Res.* 15, 679–690.
- Zeis, M., Uharek, L., Glass, B., Steinmann, J., Dreger, P., Gassmann, W., and Schmitz, N. (1997). Allogeneic MHC-mismatched activated natural killer cells administered after bone marrow transplantation provide a strong graft-versus-leukaemia effect in mice. *Br. J. Haematol.* 96, 757–761.
- Zhang, C., Zhong, J.F., Stucky, A., Chen, X.-L., Press, M.F., and Zhang, X. (2015). Histone acetylation: novel target for the treatment of acute lymphoblastic leukemia. *Clin Epigenetics* 7.
- Zheng, Y., Joyce, B.T., Liu, L., Zhang, Z., Kibbe, W.A., Zhang, W., and Hou, L. (2017). Prediction of genome-wide DNA methylation in repetitive elements. *Nucleic Acids Res* 45, 8697–8711.

## Annexes

### Annexe 1. Paramètre d'acquisition.

| HTS                 |            |
|---------------------|------------|
| Vitesse de flow     | 2 µl/sec   |
| Volume prélevé      | 20 µl      |
| Mixing volume       | 40 µl      |
| Nombre de mix       | 2          |
| Vitesse d'agitation | 180 µl/sec |
| Wash volume         | 200 µl     |

| Canto           |          |
|-----------------|----------|
| Vitesse de flow | 2 µl/sec |
| Billes acquises | 2000     |

### Annexe 2. Activation des NK. Le test d'activation a été réalisé pour la première expérience. Figure 15

| MFI     | FITC_CD69 | PE_Trail |
|---------|-----------|----------|
| NK_pDC  | 2826      | 2107     |
| NK_unst | 13        | 88,7     |
| NK_Nm   | 118       | 77,1     |

### Annexe 3. Activation des NK. Le test d'activation a été réalisé pour la première expérience. Figure 16

| MFI     | FITC_CD69 | PE_Trail |
|---------|-----------|----------|
| NK_pDC  | 661       | 925      |
| NK_unst | 107       | 82,2     |
| NK_Nm   | 100       | 69,4     |

### Annexe 4. Activation des NK. Figure 17

| MFI     | FITC_CD69 | PE_Trail |
|---------|-----------|----------|
| NK_pDC  | 3386      | 1964     |
| NK_unst | 136       | 75,8     |
| NK_Nm   | 92,5      | 61,6     |

### Annexe 5. Activation des NK. Le test d'activation a été réalisé pour la première expérience. Figure 18-19

| MFI     | FITC_CD69 | PE_Trail |
|---------|-----------|----------|
| NK_pDC  | 597       | 812      |
| NK_unst | 96,4      | -1211    |
| NK_Nm   | 95,1      | 62,9     |

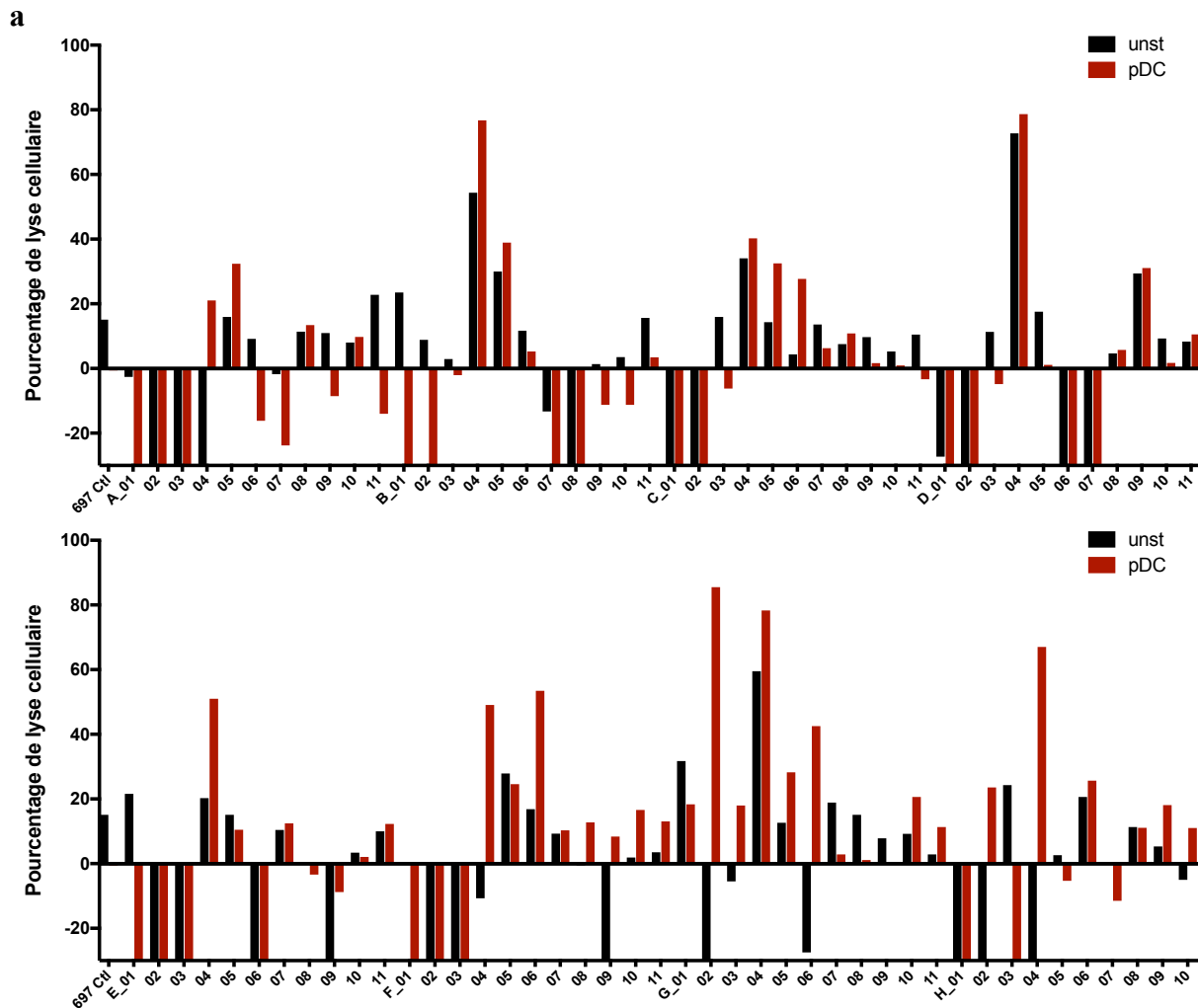
**Annexe 6.** Activation des NK. Figure 20

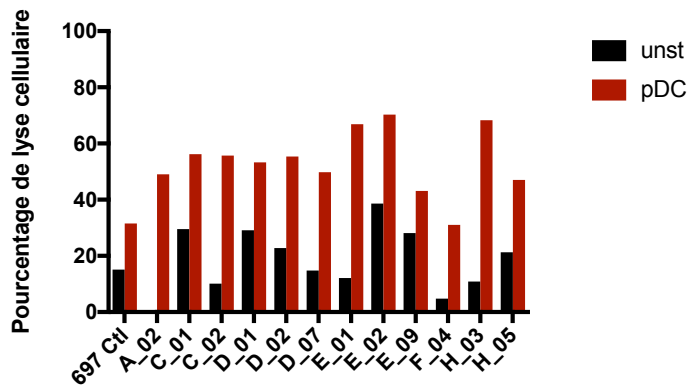
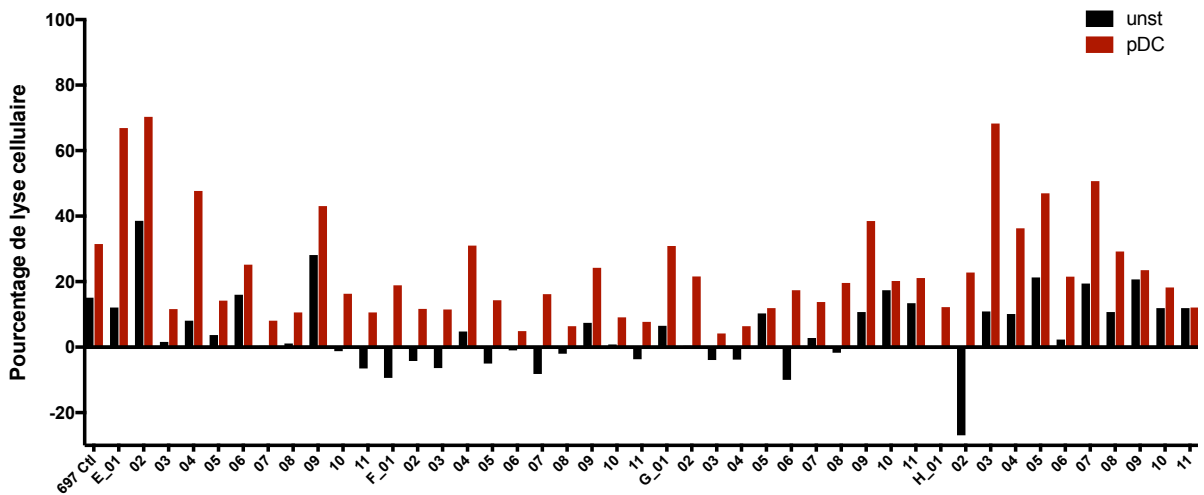
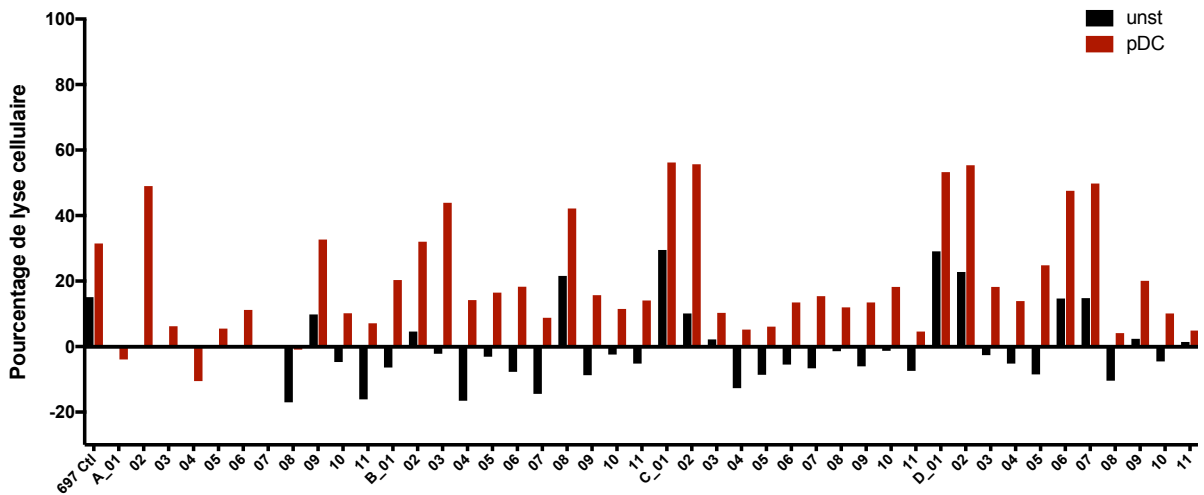
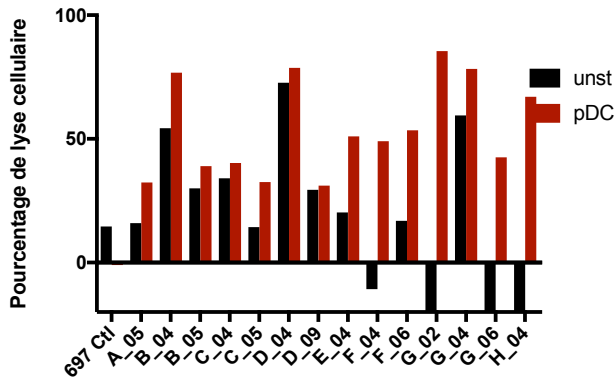
| MFI     | FITC_CD69 | PE_Trail |
|---------|-----------|----------|
| NK_pDC  | 3004      | 1822     |
| NK_unst | 171       | 194      |
| NK_Nm   | 89,9      | 62,9     |

**Annexe 7.** Activation des NK. Le test d'activation a été réalisé pour la première expérience. Figure 21

| MFI     | FITC_CD69 | PE_Trail |
|---------|-----------|----------|
| NK_pDC  | 4662      | 2549     |
| NK_unst | 978       | 758      |
| NK_Nm   | 594       | 800      |

**Annexe 8.** Expérience de criblage épigénétique sur la lignée 697.





b

|          | 1  | 2  | 3  | 4   | 5   | 6                                      | 7  | 8                                      | 9  | 10  | 11   | 12    |
|----------|--|--|--|---|---|--|--|--|--|---|--|-------|
| <b>a</b> | <b>S1004</b><br>Veliparib<br>(ABT-888)                   | <b>S1085</b><br>Belinostat<br>(PXD101)                       | <b>S1107</b><br>Danusertib<br>(PHA-73935<br>8)   | <b>S1154</b><br>SNS-314<br>Mesylate                                   | <b>S1249</b><br>JNJ-770662<br>1                 | <b>S1463</b><br>Ofloxacin              | <b>S2018</b><br>ENMD-2076<br>L-(+)-<br>Tartaric acid | <b>S2219</b><br>CYT387                 | <b>S2718</b><br>TAK-901  | <b>S2796</b><br>WP1066  | <b>S2902</b><br>S-Ruxolitinib<br>(INCB01842<br>4)      | Empty |
| <b>b</b> | <b>S1007</b><br>FG-4592                                  | <b>S1087</b><br>Iniparib<br>(BSI-201)                        | <b>S1122</b><br>Mocetinostat<br>(MGCD0103<br>)   | <b>S1168</b><br>Valproic acid<br>sodium salt<br>(Sodium<br>valproate) | <b>S1327</b><br>Ellagic acid                    | <b>S1484</b><br>MC1568                 | <b>S2158</b><br>KW-2449                              | <b>S2244</b><br>AR-42                  | <b>S2719</b><br>AMG-900  | <b>S2804</b><br>Sirtinol                                      | <b>S2919</b><br>IOX2                                   | Empty |
| <b>c</b> | <b>S1030</b><br>Panobinostat<br>(LBH589)                 | <b>S1090</b><br>PCI-24781<br>(Abexinostat<br>)               | <b>S1129</b><br>SRT1720                          | <b>S1171</b><br>CYC116  | <b>S1378</b><br>Ruxolitinib<br>(INCB01842<br>4) | <b>S1509</b><br>Norfloxacin            | <b>S2162</b><br>AZD1480                              | <b>S2391</b><br>Quercetin              | <b>S2736</b><br>TG101348<br>(SAR30250<br>3)                        | <b>S2806</b><br>CEP-33779                                     | <b>S3001</b><br>Clevudine                              | Empty |
| <b>d</b> | <b>S1045</b><br>Trichostatin<br>A (TSA)                  | <b>S1095</b><br>LAQ824<br>(Dacinostat)                       | <b>S1132</b><br>INO-1001                         | <b>S1181</b><br>ENMD-2076   | <b>S1393</b><br>Pirarubicin                     | <b>S1515</b><br>Pracinostat<br>(SB939) | <b>S2170</b><br>Givosstat<br>(ITF2357)               | <b>S2554</b><br>Daphnetin              | <b>S2740</b><br>GSK107091<br>6                                     | <b>S2818</b><br>CI994<br>(Tacedinalin<br>e)                   | <b>S3147</b><br>Entacapone                             | Empty |
| <b>e</b> | <b>S1047</b><br>Vorinostat<br>(SAHA,<br>MK0683)          | <b>S1096</b><br>Quisinostat<br>(JNJ-26481<br>585)            | <b>S1133</b><br>Alisertib<br>(MLN8237)           | <b>S1194</b><br>CUDC-101  | <b>S1396</b><br>Resveratrol                     | <b>S1529</b><br>Hesperadin             | <b>S2178</b><br>AG-14361                             | <b>S2627</b><br>Tubastatin A<br>HCl    | <b>S2759</b><br>CUDC-907   | <b>S2821</b><br>RG108   | <b>S4125</b><br>Sodium<br>Phenylbutyr<br>ate           | Empty |
| <b>f</b> | <b>S1048</b><br>VX-680<br>(Tozasertib,<br>MK-0457)       | <b>S1098</b><br>Rucaparib<br>(AG-014699<br>,PF-013673<br>38) | <b>S1134</b><br>AT9283                           | <b>S1200</b><br>Decitabine  | <b>S1422</b><br>Droxinostat                     | <b>S1541</b><br>EX 527<br>(Selisistat) | <b>S2179</b><br>LY2784544                            | <b>S2686</b><br>NVP-<br>BSK805<br>2HCl | <b>S2770</b><br>MK-5108<br>(VX-689)                                | <b>S2851</b><br>Baricitinib<br>(LY3009104,<br>INCB02805<br>0) | <b>S4246</b><br>Tranylcypro<br>mine (2-<br>PCPA) HCl   | Empty |
| <b>g</b> | <b>S1053</b><br>Entinostat<br>(MS-275)                   | <b>S1100</b><br>MLN8054                                      | <b>S1143</b><br>AG-490<br>(Tyrophostin<br>B42)   | <b>S1216</b><br>PFI-1<br>(PF-640576<br>1)                             | <b>S1451</b><br>Aurora A<br>Inhibitor I         | <b>S1782</b><br>Azacitidine            | <b>S2198</b><br>SGL-1776<br>free base                | <b>S2692</b><br>TG101209               | <b>S2779</b><br>M344   | <b>S2867</b><br>WHI-P154                                      | <b>S4294</b><br>Procainamid<br>e HCl                   | Empty |
| <b>h</b> | <b>S1060</b><br>Olaparib<br>(AZD2281,<br>Ku-0059436<br>) | <b>S1103</b><br>ZM 447439                                    | <b>S1147</b><br>Barasertib<br>(AZD1152-<br>HQPA) | <b>S1233</b><br>2-<br>Methoxyestr<br>adiol (2-<br>MeOE2)              | <b>S1454</b><br>PHA-68063<br>2                  | <b>S2012</b><br>PCI-34051              | <b>S2214</b><br>AZ 960                               | <b>S2693</b><br>Resminostat            | <b>S2789</b><br>Tofacitinib<br>(CP-690550,<br>PJ34<br>Tasocitinib) | <b>S2886</b><br>PJ34  | <b>S5001</b><br>Tofacitinib<br>(CP-690550<br>) Citrate | Empty |



**Figure : Criblage épigénétique sur la lignée 697.** a. Les cellules ont été mises en culture en plaque 96 puits à 50 000 cellules/puit. Elles sont ensuite mises en contact avec les drogues à 0,5µM pendant 48h. Elles sont ensuite divisées (5000 cellules par puit) et misent en contact avec des cellules NK +/- activées (même donneurs) au ratio 5:1 (25 000 cellules) pendant 2h. Les contrôles 697 – unst, pDC et REH – unst, pDC en triplicata sont ajoutés aux plaques. L'analyse est ensuite réalisée par cytométrie en flux. Représentation graphique des 88 drogues testées et représentation graphique des drogues présentant un résultat notable. N=2  
b. Plaque Des drogues épigénétiques utilisées dans ce criblage, (banque Cayman chemical).