

Université de Montréal

Immunothérapie cellulaire de la leucémie aiguë lymphoblastique de
l'enfant à partir de sang de cordon dans un modèle murin xénogénique

Par

Ludovic Durrieu

Département de microbiologie et immunologie

Faculté de médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de doctorat (Ph.D)
en microbiologie et immunologie

Juin 2013

© Ludovic Durrieu, 2013

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :

Immunothérapie cellulaire de la leucémie aiguë lymphoblastique de l'enfant à partir de sang de cordon dans un modèle murin xénogénique

présentée par :

Ludovic Durrieu

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Jean-Sébastien Delisle, président-rapporteur

Elie Haddad, directeur de recherche

John Stagg, membre du jury

Alan Spatz, examinateur externe

Azemi Barama, représentant du doyen de la FES

RÉSUMÉ

La leucémie aigüe lymphoblastique de précurseurs des cellules B (pré-B LAL) est le cancer le plus fréquent chez l'enfant. La transplantation de cellules souches hématopoïétiques (TCSH) est nécessaire dans environ 20 à 30 % des enfants ayant une pré-B LAL. Les rechutes après TCSH sont habituellement réfractaires aux thérapies actuelles, et par conséquent, il est important de développer et d'optimiser de nouvelles stratégies thérapeutiques. Dans cette étude, nous nous sommes intéressés aux cellules « cytokine-induced killer » (CIK). En effet, ces cellules ont été montrées comme hautement cytotoxique contre beaucoup de types de cancers. Cependant, leur activité cytotoxique contre les pré-B LAL n'est pas vraiment efficace. Par conséquent, nous avons étudié la possibilité de combiner l'immunothérapie des cellules CIK avec l'interféron alpha (IFN- α) afin d'optimiser l'activité lytique de ces cellules contre les cellules pré-B LAL. De plus, vu qu'il a été démontré que l'activité cytotoxique des cellules CIK provient de la fraction CD56⁺, plus particulièrement les cellules CD3⁺CD56⁺, nous avons décidé d'utiliser la fraction CD56⁺ (cellules CD56⁺) dans l'ensemble de nos expériences. Nous avons observé *in vitro* que les cellules CD56⁺ lysent mieux les lignées cellulaires pré-B LAL comparativement aux cellules CIK non purifiées. Aussi, leur activité cytotoxique peut être augmentée par le traitement avec l'IFN- α . Par ailleurs, nous avons démontré l'efficacité des cellules CD56⁺ traitées par l'IFN- α contre les lignées cellulaires pré-B LAL *in vivo*, dans le modèle de souris NOD/SCID/gamma c⁻ (NSG). La survie des souris est significativement prolongée lorsqu'elles reçoivent les cellules pré-B LAL avec les cellules CD56⁺ traitées par l'IFN- α . Nous avons par la suite étudié le mécanisme d'action des cellules CD56⁺ contre les lignées cellulaires pré-B LAL. Nous avons observé que les cellules CD56⁺ provenant de sang de cordon sont plus efficaces que les cellules CD56⁺ provenant de sang

périphérique pour tuer les lignées cellulaires pré-B LAL. Nous avons également montré que les cellules CD56⁺ utilisent seulement la voie NKG2D ou bien les voies NKG2D et TRAIL selon la lignée cellulaire pré-B LAL cible et selon la provenance de la source des cellules CD56⁺. Par ailleurs, nous avons remarqué que les cellules CIK sont sensibles à l'apoptose par Fas, et que cette sensibilité influence leur activité cytotoxique contre les cellules tumorales. En conclusion, les cellules CD56⁺ sont cytotoxiques contre les lignées cellulaires pré-B LAL, et leur effet lytique est augmenté par l'IFN- α aussi bien *in vitro* qu'*in vivo* dans le modèle de souris NSG. Ces données précliniques sont encourageantes pour tester cette nouvelle approche d'immunothérapie dans le traitement contre la pré-B LAL.

Mots clés : Cellules tueuses induites par cytokines (cellules CIK), leucémie aiguë lymphoblastique, souris NSG, immunothérapie, sang de cordon, sang périphérique, NKG2D et TRAIL.

ABSTRACT

Precursor B-cell acute lymphoblastic leukemia (B-ALL) is the most common form of leukemia in children. Hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) is required in around 20 to 30% of children with a B-ALL. The relapses occurring post-HSCT are usually insensitive to current therapy. Therefore, it is important to develop and optimize a new therapeutic strategy. In this study, we were interested to study « cytokine-induced killer » (CIK) cells. These cells have been shown to be very cytotoxic against many types of tumor. However, their cytotoxic activity against B-ALL cells is not very efficient. Consequently, we have studied the effect of combining adoptive immunotherapy of CIK cells with the interferon alpha (IFN- α) to increase their lytic activity against B-ALL cells. In addition, in the literature, the cytotoxic activity of CIK cells has been shown to come from the CD56⁺ fraction (CD56⁺ CIK), in particular CD3⁺CD56⁺ cells. Therefore, we used the CD56⁺ fraction in all the experiments. We have observed *in vitro* that CD56⁺ CIK cells killed more efficiently B-ALL cell lines than did non-purified CIK cells. Also, their cytotoxic activity could be enhanced with IFN- α . Moreover, we have demonstrated the efficacy of IFN- α -treated-CD56⁺ CIK cells against B-ALL cell lines *in vivo* in the model of NOD/SCID/gamma c⁻ (NSG) mice by showing that the survival of mice injected with B-ALL cell lines was significantly increased when they were injected with IFN- α -treated-CD56⁺ CIK cells. Subsequently, we have studied the lytic mechanism of CD56⁺ CIK cells against B-ALL cell lines. We have observed that CD56⁺ CIK cells from cord blood were more efficient than CD56⁺ CIK cells from peripheral blood to kill B-ALL cell lines. CD56⁺ CIK cells used only the NKG2D pathway or the both NKG2D and TRAIL pathways depending on the B-ALL cell line and the source of CIK cells. In addition, we showed that CIK cells were sensitive to Fas apoptosis. This sensitivity

influenced the cytotoxic activity of CIK cells against tumor cells. In conclusion, CD56⁺ CIK cells are cytotoxic against B-ALL cell lines, and their effect can be increased with IFN- α *in vitro* and *in vivo*. Taken together, our pre-clinical data are very interesting for testing the potential clinical utility of purified CD56⁺ CIK cells as an immunotherapeutic strategy for B-ALL patients.

Keywords: Cytokine-induced killer cells, acute lymphoblastic leukemia, NSG mice, immunotherapy, cord blood, peripheral blood, NKG2D and TRAIL.

TABLE DES MATIÈRES

Chapitre 1 : Introduction.....	1
I- La leucémie aiguë lymphoblastique.....	2
I. 1. Mise en contexte.....	2
I. 2. Définition.....	3
I. 3. Signes et symptômes.....	4
I. 4. Diagnostic.....	6
I. 5. Traitements.....	8
I. 5. a. Traitement d'induction.....	8
I. 5. b. Traitement dirigé contre le système nerveux central.....	9
I. 5. c. Traitement de consolidation et d'entretien.....	9
II- Transplantation de cellules souches hématopoïétiques.....	10
II. 1. Complexe majeur d'histocompatibilité.....	10
II. 2. Conditionnement du patient.....	12
II. 3. Différentes sources de donneurs pour la TCSH.....	13
II. 4. Prise et échec de la greffe.....	16
II. 5. Reconstitution immunitaire.....	17
II. 6. La maladie du greffon contre l'hôte.....	18
II. 6. a. Dommages tissulaires liés au conditionnement.....	19
II. 6. b. Activation des cellules T du donneur.....	20
II. 6. c. Dommages tissulaires provoqués par les cellules et cytokines.....	21
II. 7. Rôles de la transplantation des cellules souches hématopoïétiques.....	22
III- La rechute de la leucémie et l'immunothérapie.....	23

III. 1. La rechute de la leucémie et l'effet de la greffe contre la leucémie.....	23
III. 2. L'immunothérapie.....	24
III. 2. a. Infusion des leucocytes du donneur.....	25
III. 2. b. Les cellules dendritiques.....	26
III. 2. B. 1. Les différentes sous-populations des cellules dendritiques.....	27
III. 2. b. 2. Les cellules dendritiques chargées avec des antigènes tumoraux...	29
III. 2. c. Les cellules T modifiées.....	30
III. 2. c. 1. Les cellules T modifiées dans la LAL.....	31
III. 2. c. 2. Les essais cliniques avec le CAR spécifique du récepteur CD19 dans la LAL.....	33
III. 2. d. Les cellules tueuses naturelles.....	34
III. 2. e. Les cellules tueuses activées par lymphokines.....	36
IV- Les cellules tueuses induites par des cytokines.....	37
IV. 1. Expansion et caractérisation des cellules tueuses induites par des cytokines.....	38
IV. 2. Mécanisme d'action des cellules tueuses induites par des cytokines.....	41
IV. 3. Activité cytotoxique des cellules tueuses par des cytokines <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i>	44
IV. 4. Effet de la maladie du greffon contre l'hôte des cellules tueuses induites par des cytokines.....	45
IV. 5. Amélioration de l'amplification et de l'activité cytotoxique des cellules tueuses induites par des cytokines.....	49
IV. 6. Essais cliniques des cellules tueuses induites par des cytokines.....	51
IV. 7. Les cellules tueuses induites par des cytokines dans le cadre de la leucémie aiguë lymphoblastique.....	56

V- Objectifs.....	57
VI- Hypothèses.....	58
Chapitre 2.....	59
Introduction du deuxième chapitre.....	60
ABSTRACT.....	62
INTRODUCTION.....	63
METHODS.....	65
RESULTS.....	72
DISCUSSION.....	77
DISCLOSURE OF CONFLICTS OF INTEREST.....	82
REFERENCES.....	83
SUPPLEMENTARY LEGEND.....	91
LEGENDS.....	91
SUPPLEMENTARY FIGURE.....	97
FIGURES.....	98
Chapitre 3.....	105
Mise en context du troisième chapitre.....	106
ABSTRACT.....	109
INTRODUCTION.....	110
MATERIALS AND METHODS.....	112
RESULTS.....	118
DISCUSSION.....	123
ACKNOWLEDGEMENTS.....	128

DISCLOSURE OF INTEREST.....	128
REFERENCES.....	129
SUPPLEMENTARY LEGEND	134
LEGENDS	134
SUPPLEMENTARY FIGURE.....	137
FIGURES.....	138
Chapitre 4.....	143
Mise en context du quatrième chapitre.....	144
ABSTRACT.....	147
INTRODUCTION.....	148
MATERIAL AND METHODS.....	149
RESULTS.....	151
DISCUSSION.....	153
ACKNOWLEDGEMENTS.....	157
REFERENCES.....	158
LEGENDS.....	160
FIGURES.....	162
Chapitre 5 : Discussion.....	166
I- Utilisation des cellules tueuses induites par des cytokines dans le cadre de l'immunothérapie.....	167
II- Stratégie d'une meilleure utilisation des cellules tueuses induites par des cytokines.....	169
III- Développement de l'immunothérapie dans un modèle murin xénogénique.....	178
IV- Absence de toxicité des cellules tueuses induites par des cytokines.....	182

V- Mécanisme d'action des cellules tueuses induites par des cytokines.....	183
VI- Sensibilité de l'apoptose par Fas des cellules tueuses induites par des cytokines.....	190
VII- Conclusions.....	191
Références.....	193
Annexe.....	212

LISTE DES FIGURES

Chapitre 1

Figure 1.1. Leucémie aiguë lymphoblastique : taux et incidence spécifique de l'âge (2005-2009) aux Etats-Unis.....	2
Figure 1.2. Courbe de survie dans un échantillon de 2226 enfants ayant une LAL.....	3
Figure 1.3. Transplantation de cellules hématopoïétiques d'un donneur à un receveur après traitement chimiothérapie/irradiation.....	12
Figure 1.4. Transplantation du Programme National des donneurs de moelle osseuse (NMDP) chez les patients pédiatriques selon la source de cellules souches hématopoïétiques.....	15
Figure 1.5. Cinétique de la reconstitution immunitaire chez les patients pédiatriques après TCH de sang de cordon.....	18
Figure 1.6. Expansion et différenciation des cellules CIK.....	39
Figure 1.7. Amplification et différenciation des cellules CIK.....	40

Chapitre 2

Figure 2.1. Expansion, phenotype and lytic activity of CB-CIK cells.....	97
Figure 2.2. Comparison of the cytotoxic activity of bulk CB-CIK cells to CD56 ⁺ CB-CIK cells against B-ALL cell lines.....	98
Figure 2.3. Cytotoxic activity of different CB-CIK cell subpopulations.....	99
Figure 2.4. Human IFN- α increases the cytotoxic activity of CD56 ⁺ CB-CIK cells against B-ALL cell lines.....	100

Figure 2.5. Human IFN- α induces the phosphorylation of STAT1 in CD3 ⁺ CD56 ⁺ CB-CIK cells.....	101
Figure 2.6. Human IFN- α up-regulates TRAIL and CD69 expression on CD3 ⁺ CD56 ⁺ CB-CIK cells.....	102
Figure 2.7. Effect of CD56 ⁺ CB-CIK cells on GvL.....	103
Figure 2.8. CD56 ⁺ CB-CIK cells treated +/- hIFN- α do not induce severe GvHD in NSG mice.....	104

Chapitre 3

Figure 3.1. Expansion of CD3 ⁺ CD56 ⁺ CB and PB-CIK cells.....	137
Figure 3.2. Phenotype of CD56 ⁺ CB-CIK compared to CD56 ⁺ PB-CIK cells.....	138
Figure 3.3. Cytotoxic activity of CD56 ⁺ CB-CIK compared to CD56 ⁺ PB-CIK cells.....	139
Figure 3.4. Expression of MICA, MICB, DR4 and DR5 on B-ALL cell lines, and sensibility of these cells to TRAIL pathways.....	140
Figure 3.5. Inhibition of cytotoxic activity of CD56 ⁺ CB and PB-CIK cells by both the NKG2D and TRAIL pathways.....	141
Figure 3.6. Sensibility of B-ALL cell lines to CD95-mediated apoptosis.....	142

Chapitre 4

Figure 4.1. Expression of Fas on CB and PB-CIK cells and sensitivity of CB and PB-CIK cells to Fas-mediated apoptosis.....	162
Figure 4.2. Fas engagement inhibits the cytotoxic activity of CD56 ⁺ CB and PB-CIK cells against the SU-DHL-4 cell line.....	165

Annexe

Figure 1. Influence de l'IL-2 lors de l'injection des cellules CIK dans les souris NSG.....213

Figure 2. Activité cytotoxique des cellules CD56⁺ contre les lignées cellulaires pré-B LAL en présence ou absence de EGTA/MgCl₂.....214

Figure 3. Activité cytotoxique des cellules CD56⁺ contre les lignées cellulaires pré-B LAL en présence ou absence de Concanamycine A.....215

Figure 4. Dégranulation des cellules CIK contre les trois lignées cellulaires pré-B LAL.....216

Figure 5. Capacité de dégranulation des cellules CIK à travers les récepteurs CD3 et NKG2D.....219

Figure 6. Expression de Fas ligand sur les cellules K562.....220

Figure 7. Expression des récepteurs KIR sur les cellules CB-CIK.....221

LISTE DES TABLEAUX

Chapitre 1

Tableau 1.1. Essais cliniques utilisant les cellules CIK selon le type de cancer et avec le nombre de patients inclus.....	52
-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADCC	antibody-dependent cellular cytotoxicity
ADN	acide désoxyribonucléique
ARN	acide ribonucléique
ATG	globuline anti-thymocyte
ATP	adenyltriphosphatase
cAMP	cyclic adenosine monophosphate
BCR	B receptor cell
CAR	chimeric antigen receptor
CD	cluster de différenciation
CIK	cytokine-induced killer
CMA	concanamycine A
CMH	complexe majeur d'histocompatibilité
CPA	cellule présentatrice d'antigènes
CSH	cellule souche hématopoïétique
DAP	DNAX activating protein
DC	dendritic cell
DLI	donor leukocyte infusion
DNAM-1	DNAX accessory molecule 1
DR	death receptor
EGTA	ethylene glycol tetraacetic acid
EMRA	effecteur mémoire RA
FasL	Fas ligand

Fc	fragment constant
FcR	récepteur du fragment constant des immunoglobulines
G-CSF	granulocyte colony stimulating factor
GM-CSF	granulocyte macrophage colony stimulating factor
GVH	graft-versus-host
GVHD	graft-versus-host disease
GvL	graft-versus-leukemia
GVT	graft-versus-tumor
HLA	human leucocyte antigen
ICAM	intracellular cell adhesion molecule
IFN	interféron
Ig	immunoglobuline
IL	interleukine
KIR	killer immunoglobulin-like receptor
LAK	lymphokine-activated killer
LAL	leucémie aiguë lymphoblastique
LAM	leucémie aiguë myéloblastique
LCR	liquide céphalo-rachidien
LFA	lymphocyte function-associated antigen
LMC	leucémie myéloïde chronique
LPS	lipopolysaccharide
LTC	lymphocyte T cytotoxique
MgCl ₂	chlorure de magnésium

MIC	MHC class I chain-related gene
MLR	mixed lymphocyte reaction
MM	multiple de myélome
MMR	macrophage mannose receptor
MO	moelle osseuse
NOD	non obese diabetic
NK	natural killer
NKG2D	natural killer group 2, member D
NKT	natural killer T
NSG	NOD/SCID/ γ c-
OKT3	anticorps anti-CD3
PI3-kinase	phosphatidyl-inositol-3-kinase
Pré-B	précurseur des cellules B
Pré-B LAL	leucémie aiguë lymphoblastique de précurseurs des cellules B
SCID	severe combined immunodeficiency
scFv	single-chain variable-fragment
siRNA	small interfering ribonucleic acid
STAT-1	signal transducer and activator of transcriptor-1
TCR	T cell receptor
TCSH	transplantation de cellules souches hématopoïétiques
TGF	transforming growth factor
Th1	cellules T helper
TNF	tumor necrosis factor

TRAIL	TNF-related apoptosis-inducing ligand
UI	unité internationale
ULBP	UL16 binding protein
VLA	very late antigen

REMERCIEMENTS

Après cinq ans d'un long travail qui a été à la fois laborieux, difficile, un peu démoralisant, mais bien sûr très stimulant, magique, rempli de joies et de bonheurs, je tiens à remercier une coupe de personnes qui sans elles, je n'aurais sans doute jamais pu accomplir mon doctorat.

Je tiens à remercier d'abord mon directeur de recherche, Dr Elie Haddad, qui m'a offert la possibilité de réaliser mon doctorat au sein de son laboratoire. Tout au long de ces quelques années, il m'a enseigné son savoir-faire de chercheur, afin que je puisse mener à bien mon projet de recherche. Il m'a donné beaucoup de liberté pour que je puisse tester certaines de mes hypothèses, et que je puisse développer mon intérêt pour le monde scientifique. De plus, les charmantes, stimulantes et quelques fois étranges réunions de laboratoire m'ont permis de m'enrichir intellectuellement au niveau scientifique grâce aux diverses projets de recherche réalisés dans le laboratoire. Dr Elie Haddad m'a donné la possibilité d'exprimer mon point de vue sur ces autres projets en apportant certaines critiques ou de nouvelles idées. Enfin, il m'a permis de présenter mes travaux à des congrès internationaux pour que je puisse communiquer mes résultats aux autres chercheurs, que je puisse approfondir mes connaissances pour mieux mener à bien mon projet de recherche, et que je puisse essayer de développer des collaborations avec d'autres chercheurs.

Je tiens aussi à remercier les membres de mon comité de suivi, Dr Jacques Thibodeau, Dr Christian Beauséjour et Dr Françoise Le Deist, qui m'ont conseillé et aidé afin que je puisse mener à bien mon projet de recherche. Je tiens à remercier en particulier Dr Françoise Le Deist qui m'a donné énormément de son temps aussi bien pour analyser mes résultats que pour réaliser mes expériences. Son expertise, ses critiques, ses conseils et tout le reste m'ont énormément stimulé tout le long de mon doctorat. Je remercie également Dr Françoise Le

Deist d'avoir pris le temps de relire mes articles avant que je les soumette. Ses corrections ont permis de mieux valoriser mon travail afin que les articles soient moins critiquables lors des soumissions.

Je remercie aussi les membres de mon jury de ma thèse, Dr Jean-Sébastien Delisle, Dr John Stagg, Dr Alan Spatz et Dr Azemi Barama, d'avoir accepté d'être les membres de mon jury, et d'avoir pris le temps de lire et critiquer ce manuscrit de 200 pages environ.

Je remercie les organismes qui m'ont financé tout le long de mon doctorat : le département de Microbiologie et Immunologie, et la fondation du CHU Saint-Justine et la fondation des Étoiles.

De plus, je tiens à remercier l'ensemble de l'équipe du laboratoire, François, Massar, Silvia, Joëlle, Arnaud, Sandra, Clémence et Simon. Sans cette merveilleuse équipe, je n'aurais jamais pu réaliser au complet mon doctorat. Je me levais chaque matin en sachant que j'allais rejoindre des personnes sympathiques, d'une bonté exceptionnelle, et qu'ils allaient pouvoir illuminer ma journée de travail.

Je remercie aussi les membres du laboratoire du Dr Christian Beauséjour, en particulier Oanh et Geneviève. Nous avons partagé le même local pendant trois/quatre ans, et je les remercie de leur patience, et d'avoir eu une oreille attentive quand nécessaire.

Je remercie également les membres du laboratoire du Dr Michel Duval pour leur bon accueil, et de m'avoir permis d'effectuer les tests de cytotoxicité dans leur laboratoire.

Je tiens à remercier mes trois merveilleuses amies, Joëlle, Geneviève et Rose-Marie, qui m'ont soutenu au cours de mes cinq années de doctorat. Leur bonne humeur et leur générosité m'ont permis de trouver en moi la force nécessaire pour mener à bien mon projet de recherche.

Je remercie bien sûr ma formidable famille du Canada ainsi que ma belle famille de Val d'Or (oncles, tantes, cousins, cousines) qui m'ont accueilli généreusement au sein du pays québécois. Je remercie en particulier ma tante Christine et mon oncle Éric, qui m'ont hébergé pendant un an et demi et m'ont considéré comme leur fils adoptif.

Je remercie mes parents pour leur amour qui m'a permis d'avancer dans la vie, et d'être devenu la personne que je suis maintenant. Sans eux, je n'aurais jamais pu réaliser mes rêves.

Je remercie ma sœur et sa petite famille (Élio et Aloïse) qui malgré la distance qui nous sépare, je pense énormément à vous.

Enfin, je tiens à remercier mon conjoint que j'ai rencontré à mon arrivée au Canada, et qui a suivi mon évolution au cours de mon doctorat. Il y a su supporter mes changements d'humeurs aussi joyeuses que coléreuses. Sans lui, certaines périodes auraient été difficiles à surmonter.

Et je tiens à me remercier, même si c'est un peu orgueilleux, mais sans ma forte volonté et mon désir de réussir, je n'aurais jamais pu réaliser mon projet de doctorat.

CHAPITRE 1 : INTRODUCTION

I- La leucémie aiguë lymphoblastique

I. 1. Mise en contexte

Chaque année, de nouveaux cas de leucémie aiguë lymphoblastique (LAL) sont diagnostiqués au Canada et aux États-Unis (Canada 2012; USA 2012). Bien qu'une LAL puisse se développer à n'importe quel âge, on la retrouve surtout chez les enfants et jeunes adultes âgés 19 ans et moins (Figure 1.1). La LAL demeure le cancer le plus fréquent chez les enfants et représente 26% de tous les cancers pédiatriques, et est responsable de 28% des décès parmi les enfants atteints de cancers. Les avancements dans le traitement de LAL ont amélioré le taux de rémission. Le nombre de patients, qui sont en rémission ou considérés guéris après une LAL, a augmenté au cours des ans. Le pronostic de la LAL est globalement bon, avec un taux de survie à cinq ans de plus de 80% (Figure 1.2).

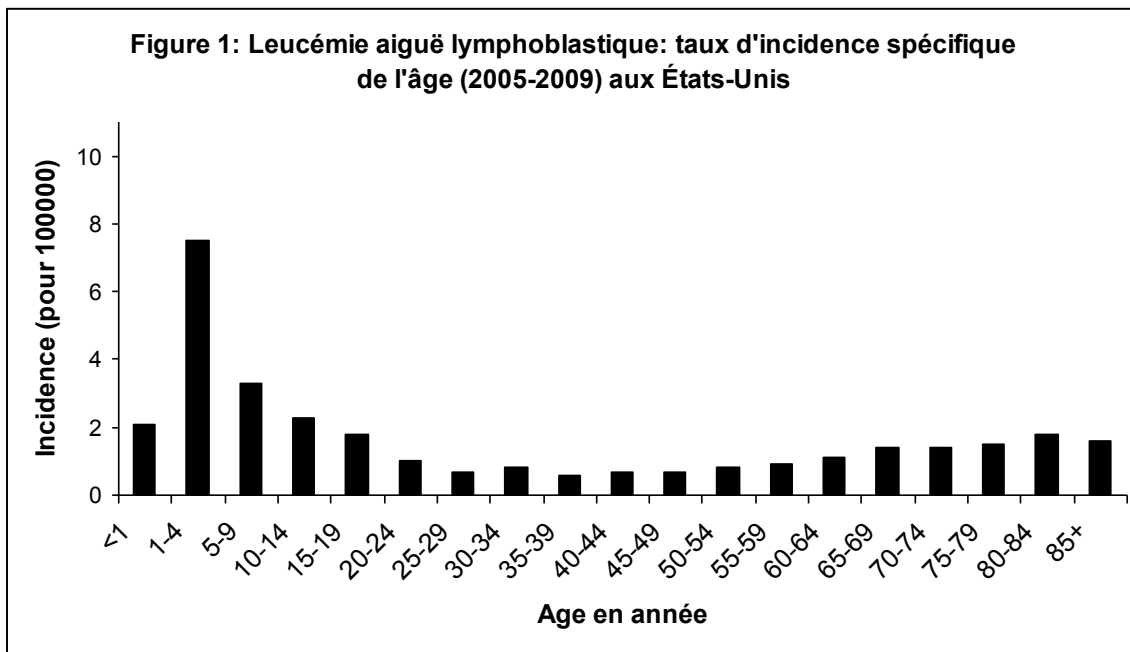


Figure 1.1 : L'axe horizontal montre les intervalles de l'âge chaque 5 ans. L'axe vertical montre la fréquence de nouveaux cas de LAL pour 100000 cas dans un groupe d'âge donné. Le risque de LAL est plus grand dans les 5 premières années de la vie. Une augmentation est aussi observée chez les individus plus âgés après 60 ans (source : Surveillance, Epidemiology and End Results (SEER) Program, 2005-2009, National Cancer Institut, 2012). <http://www.cancer.gov/>

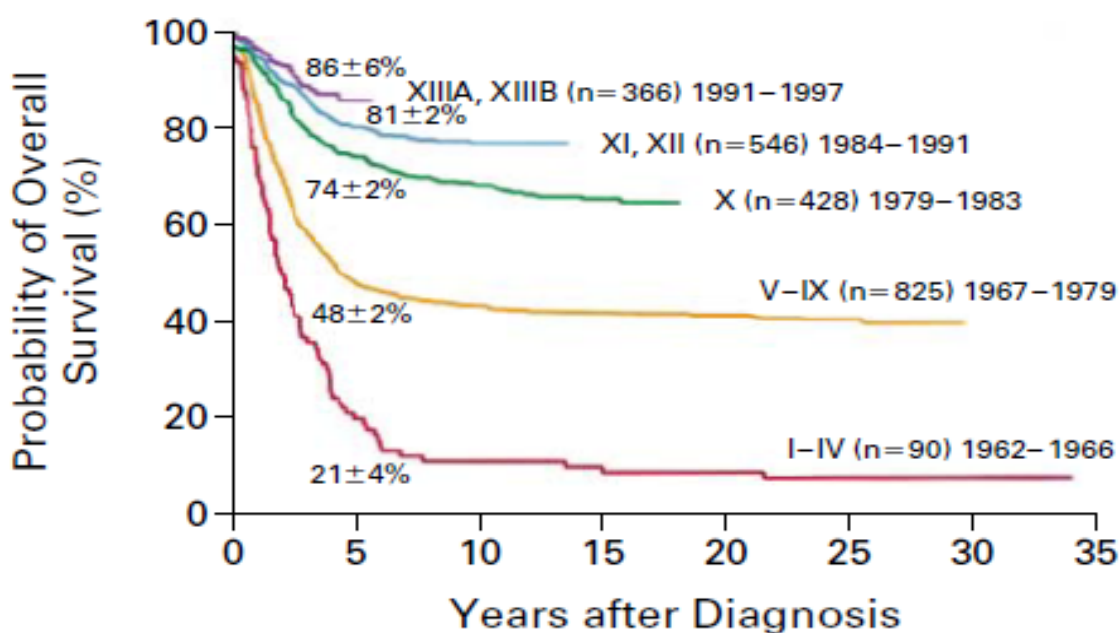


Figure 1.2 : Courbe de survie dans un échantillon de 2255 enfants ayant une LAL dans 13 études consécutives effectuées au ST. Jude Children's Research Hospital de 1962 à 1997. Les données montrent une augmentation de la survie au cours du temps (Pui and Evans 1998).

I. 2. Définition

La LAL prend naissance dans la moelle osseuse (MO) des os plats, tels que le crâne, les côtes, le sternum ou la colonne vertébrale, où sont produits les différents types de cellules

sanguines (globules rouges, globules blancs et plaquettes). Lors de l'hématopoïèse, ces cellules se différencient à partir de cellules souches.

La LAL est causée par la prolifération de cellules cancéreuses d'origine lymphoïde qui ressemble morphologiquement et phénotypiquement aux précurseurs des cellules des lignées lymphoïdes T et B. Elle peut se développer à n'importe quel âge, mais plus fréquemment chez l'enfant que chez l'adulte (Pui and Evans 1998). Ce type de cancer affecte le système sanguin et se traduit par l'infiltration de cellules cancéreuses dans la MO, ainsi que dans le sang du patient atteint. La LAL se déclenche lorsque les cellules en cours de différenciation dans la MO ont subi des changements génomiques au sein de gènes impliqués dans la croissance et le développement de la cellule. De ce fait, la LAL est caractérisée par une prolifération accrue et non contrôlée de lymphocytes anormaux dans la MO, appelés lymphoblastes ou blastes leucémiques. Il s'agit de cellules leucocytaires dont le développement est bloqué à un stade donné (Pui, Behm et al. 1993; Pui 1995). Les blastes leucémiques demeurent à un état non différenciés et sont incapables de jouer le rôle immunitaire des cellules normales. Part la suite, les blastes leucémiques vont envahir complètement la MO, puis l'ensemble des organes, en particulier le foie et la rate.

I. 3. Signes et symptômes

La présence de blastes leucémiques dans la MO bloque la production de cellules normales. En conséquence, quand une LAL est diagnostiquée, le nombre de cellules du sang est habituellement plus faible que la normale. Le plus souvent, la LAL se déclenche rapidement en quelques jours sans aucun signe au préalable, avec une altération rapide de l'état général et de symptômes variés qui dépendent principalement de la localisation de l'envahissement

tumoral dans l'organisme. Il n'existe pas de symptôme spécifique de la LAL. Ces différents symptômes tels qu'une faiblesse d'énergie, une pâleur du visage, des saignements prolongés lors de coupures mineures, de la fièvre, des infections mineures fréquentes, traduisent souvent l'incapacité de la MO à produire normalement les cellules sanguines, en raison d'une prolifération accrue des blastes leucémiques. Ainsi, la diminution des globules rouges va entraîner une anémie dont les signes sont essentiellement la pâleur, la fatigue, l'essoufflement (Onciu 2009). Aussi, la diminution des plaquettes expose le patient aux saignements, aux ecchymoses. Enfin, la réduction du nombre de globules blancs peut entraîner une augmentation du risque d'infection.

Les différents symptômes peuvent être classés en plusieurs catégories. Il y a tout d'abord le syndrome d'insuffisance médullaire qui englobe le syndrome anémique, le syndrome hémorragique et le syndrome infectieux. Le syndrome anémique comprend des signes fonctionnels tels que la pâleur cutané-conjonctivale, l'asthénie (fatigue physique), la dyspnée (difficulté respiratoire), l'angor fonctionnel (angine de poitrine), et la tachycardie (accélération du rythme cardiaque). Le syndrome hémorragique inclut des signes comme des lésions hémorragiques de la peau et des muqueuses, des saignements de nez, des saignements au niveau des gencives, des saignements au niveau buccal, des hémorragies rétinienne, des saignements urinaires, et de l'hypertension intracrânienne. Le syndrome infectieux se manifeste par de la fièvre essentiellement. Deuxièmement, il y a le syndrome tumoral qui se manifeste par une hypertrophie des organes hématopoïétiques tels que principalement l'adénopathie (inflammation des ganglions lymphatiques), et l'hépatosplénomégalie (augmentation du volume du foie et de la rate). Il peut aussi avoir des localisations particulières comme par exemple l'hypertrophie gingivale (bourrelets au niveau des

gencives), l'hypertrophie testiculaire et l'atteinte cutanée (grosesur au niveau de la peau). Troisièmement, il y a le syndrome de lyse cellulaire tumorale. Les cellules tumorales sont capables d'induire spontanément des complications métaboliques liées à la libération massives de produits liés à la lyse cellulaire. Le syndrome de lyse cellulaire tumorale englobe une hyperuricémie (taux excessif d'acide urique dans le sang), une hyperphosphorémie (augmentation du phosphore dans le sang), ou une hyperkalémie (excès de potassium dans le sang). Quatrièmement, il y a le syndrome de défibrination. Ceci consiste à la coagulation intravasculaire disséminée. Ce phénomène est lié à un catabolisme excessif du fibrinogène dû à une libération massive de substances pro-coagulantes dans l'espace vasculaire, entraînant une activation excessive du processus de coagulation et une activation systémique de la thrombine. Enfin, il y a le syndrome d'hyperviscosité et de leucostase. Ceci est un envahissement massif des blastes dans la circulation sanguine.

I. 4. Diagnostic

La LAL pourra être suspectée lors d'un prélèvement sanguin sur l'étude de la numération leucocytaire. Habituellement, une ponction de MO est réalisée afin de faire une analyse morphologique des cellules. Cette analyse permet de définir la sous-catégorie de leucémie aiguë : la LAL ou la leucémie aiguë myéloblastique (LAM). Le diagnostic précis du type de leucémie est fondamental puisqu'il permettra de déterminer le type de traitement et d'estimer le pronostic. La LAL a beaucoup de sous-types et peut être classifiée par des tests immunologiques, cytogénétiques et de génétiques moléculaires (Pui and Evans 1998; Onciu 2009). L'immunophénotypage, un processus utilisé pour identifier les cellules grâce à l'étude des protéines (antigènes) à leur surface, est essentiel pour établir si les cellules leucémiques

sont des lymphocytes B ou des lymphocytes T. De plus, un phénotypage approfondi pourra déterminer le stade de la différenciation en précisant si la cellule leucémique est en stade précoce ou tardive de la différenciation lymphoïde. On peut ainsi distinguer principalement la LAL de précurseur des cellules B (pré-B LAL) dont 85% des patients sont atteints, de la LAL de cellules B différenciées, et de la LAL de cellules T. La classification génétique de la LAL est aussi importante. Environ 75% des cas peuvent être classés en sous-groupes basés sur le nombre de chromosome, les réarrangements chromosomiques spécifiques, et les changements génétiques moléculaires. La détermination du caryotype et d'analyses cytogénétiques sont utilisées pour identifier ces modifications chromosomiques. Comme type d'anomalies génétiques qui se retrouvent dans la LAL, il peut y avoir une hyperdiploïdie (plus de 46 chromosomes) laquelle est associée avec un bon pronostic et une hypodiploïdie (moins de 46 chromosomes) laquelle est associée avec un mauvais pronostic. Pour les réarrangements chromosomiques, il y a la translocation entre les chromosomes 9 et 22, appelé chromosome Philadelphie. C'est une translocation entre les gènes *bcr* et *abl* qui donne au final une protéine de fusion possédant une activité tyrosine kinase. Il y a la translocation du chromosome 12 avec le chromosome 21 qui touche les gènes *etv6* et *runx1*. Il y a la translocation des chromosomes 1 et 19 qui induit une fusion entre le gène *tcf3* et le gène *pbx1*.

Dans les altérations génétiques, beaucoup de gènes impliqués codent pour des protéines jouant des rôles clés dans le développement lymphoïde tels que les gènes *pax5*, *izkf1*, *ebf1* et *lmo2*, dans la régulation du cycle cellulaire comme les gènes *cdkn2A/cdkn2B*, *pten* et *rb1*, dans la signalisation lymphocytaire, et dans la régulation transcriptionnelle et co-activation tels que *tbllxr1*, *etv6* et *erg* (Mullighan 2012; Inaba, Greaves et al. 2013).

I. 5. Traitements

La reconnaissance du caractère hétérogène de la LAL a permis d'utiliser des traitements ciblés selon le phénotype, le génotype et le pronostic. Aussi, de nombreux facteurs affectent le choix et le résultat du traitement incluant le sous-type de LAL, le dénombrement de cellules leucémiques dans le sang, l'immunophénotype ou la composition chromosomique de la LAL, les antécédents du patient, l'atteinte du système nerveux central, l'âge et la santé du patient. Ainsi, la LAL de cellules B matures est le seul sous-type qui est traité avec une chimiothérapie intensive de courte durée. Pour les autres formes, les approches de traitements spécifiques diffèrent, mais consistent généralement en un traitement d'induction (par chimiothérapie), suivi par un traitement de consolidation et d'entretien pour éliminer la leucémie résiduelle (Pui and Evans 2006).

I. 5.a. Traitement d'induction

La phase initiale de la chimiothérapie est appelée induction. Les drogues spécifiques, les doses utilisées et la durée de leur administration, dépendent sur plusieurs facteurs incluant l'âge du patient, les caractéristiques spécifiques de la LAL et la santé du patient. Normalement, la sévérité de la maladie et les effets secondaires de la thérapie rendent nécessaire une hospitalisation du patient entre quatre et six semaines. L'objectif du traitement d'induction est donc d'éradiquer plus de 99% du nombre initial de cellules leucémiques, et de restaurer une hématopoïèse et une forme physique normales. Dans la plupart des centres, ce traitement d'induction consiste en l'administration d'une chimiothérapie, c'est-à-dire à l'utilisation d'une combinaison de plusieurs médicaments (méthotrexate, cytarabine, cyclophosphamide, dexaméthasone ou prednisone, vincristine, L-asparaginase, et/ou un

anthracycline) (Pui and Evans 1998; Onciu 2009) qui vise à tuer les cellules cancéreuses ou du moins à bloquer leur croissance.

I. 5.b. Traitement dirigé contre le système nerveux central

De plus, les cellules leucémiques peuvent se retrouver au niveau de la moelle épinière et du cerveau. Une ponction lombaire permet de vérifier la présence des cellules leucémiques dans le liquide céphalo-rachidien (LCR). Tous les patients atteints de LAL reçoivent un traitement préventif contre l'atteinte du système nerveux central (Pui and Evans 1998). Comme la moelle épinière et le cerveau sont des parties difficiles à être ciblées par la chimiothérapie, les drogues sont injectées directement dans le LCR. Pour les patients souffrant de LAL avec présence de cellules blastiques dans le LCR, en plus d'une chimiothérapie, ils peuvent recevoir une radiothérapie (Onciu 2009). L'irradiation crânienne peut causer beaucoup de complications à court et long termes, incluant des cancers secondaires, des déficits neurocognitifs, et des endocrinopathies (Pui and Evans 2006). Malgré cela, dans la plupart des centres cliniques, l'irradiation est toujours recommandée pour les patients à très haut risque de rechute ayant des blastes leucémiques dans le LCR.

I. 5.c. Traitement de consolidation et d'entretien

Même lorsqu'un patient est en rémission, il subsiste toujours quelques cellules leucémiques qui ne pourront être détectées par les analyses habituelles. De ce fait, d'autres traitements, à savoir le traitement de consolidation et le traitement d'entretien, sont nécessaires pour éradiquer les cellules leucémiques et éviter les rechutes. Quand l'hématopoïèse est revenue à la normale, les patients en rémission reçoivent un traitement de consolidation. Ce traitement

est administré en cycles de quatre à six mois. De plus, les patients avec une LAL doivent généralement recevoir une thérapie d'entretien pour des raisons qui sont encore mal comprises. Cette thérapie d'entretien s'étend sur une période de deux ans (Pui and Evans 1998). Les médicaments utilisés pendant ces deux phases sont en général différents de ceux utilisés lors du traitement d'induction.

II- Transplantation de cellules souches hématopoïétiques

La transplantation de cellules souches hématopoïétiques (TCSH) est habituellement indiquée pour les patients qui ne répondent pas au traitement d'induction initial et ceux qui sont en deuxième rémission, après une première rechute de la leucémie (Pui and Evans 1998). La transplantation durant la première rémission demeure controversée. Cependant, du fait de leur pronostic défavorable, les patients avec un gène de fusion BCR-ABL ou MLL-AF4 sont généralement traités avec une TCSH allogénique durant la première rémission.

II. 1. Complexe majeur d'histocompatibilité

Avant d'effectuer une TCSH, la compatibilité de certains antigènes entre le receveur et le donneur doit être vérifiée, afin d'éviter le rejet de greffe ou la maladie du greffon contre l'Hôte (graft-versus-host disease = GVHD). Cette compatibilité des antigènes fait intervenir essentiellement le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) qui est défini génétiquement. Le terme histocompatibilité majeur est historique, basé sur les premiers effets biologiques mis

en évidence dans la première moitié du 20^{ème} siècle, à savoir l'acceptation ou le rejet rapide de greffe tissulaire entre individus d'une même espèce, selon que ces individus possèdent ou non le même CMH. Ce n'est que beaucoup plus tard, en 1974, que la fonction physiologique des produits des gènes d'histocompatibilité majeur du CMH, à savoir la présentation aux lymphocytes T des antigènes de l'organisme (soi) et des antigènes étrangers (non-soi), fut appréhendée. Le CMH est une région riche en gènes de 7 mégabases sur le chromosome 6p21 dont les gènes codent pour les molécules d'histocompatibilité, qui ont pour fonction de présenter les antigènes aux cellules du système immunitaire, lesquelles doivent ensuite discriminer les antigènes du soi des antigènes du non-soi. Les molécules d'histocompatibilité sont regroupés sous le nom de HLA (human leucocyte antigen = HLA) et qui sont autant l'obstacle principal lors de transplantation de greffes tissulaires, que lors de greffes de cellules hématopoïétiques. Le CMH a évolué en un complexe multigénique polymorphe, ce qui permet sa très grande variabilité. L'ensemble des allèles du CMH sur un chromosome d'un individu est appelé haplotype. Chaque haplotype parental s'exprime chez la progéniture de manière co-dominante sur la totalité des cellules de l'organisme, à l'exception des globules rouges. La majorité des individus est hétérozygote pour les loci du CMH, qui se séparent en deux classes : le CMH de classe I (HLA-A, B et C) et le CMH de classe II (HLA-D avec de nombreuses catégories). Ces différents HLA codent pour des récepteurs hétérodimériques avec des architectures similaires et sont composés de deux chaînes de polypeptides liées de manière non-covalente. Il est donc important de caractériser génétiquement le CMH du receveur et du donneur avant la transplantation afin d'éviter tout rejet de greffe ou GVHD.

II. 2. Conditionnement du patient

Avant d'effectuer une TCSH, le patient doit être préparé à recevoir les cellules du donneur. Il faut éliminer les cellules hématopoïétiques de la MO, éradiquer au maximum les cellules tumorales, et détruire les cellules du système immunitaire. Ce processus va permettre d'éliminer au maximum les cellules tumorales, les blastes leucémiques dans notre cas, de faire le plus de place dans la MO pour les futures cellules du donneur, et d'empêcher le rejet des cellules du donneur par le système immunitaire du receveur, tout ceci permettant d'optimiser la prise de greffe (Figure 1.3).

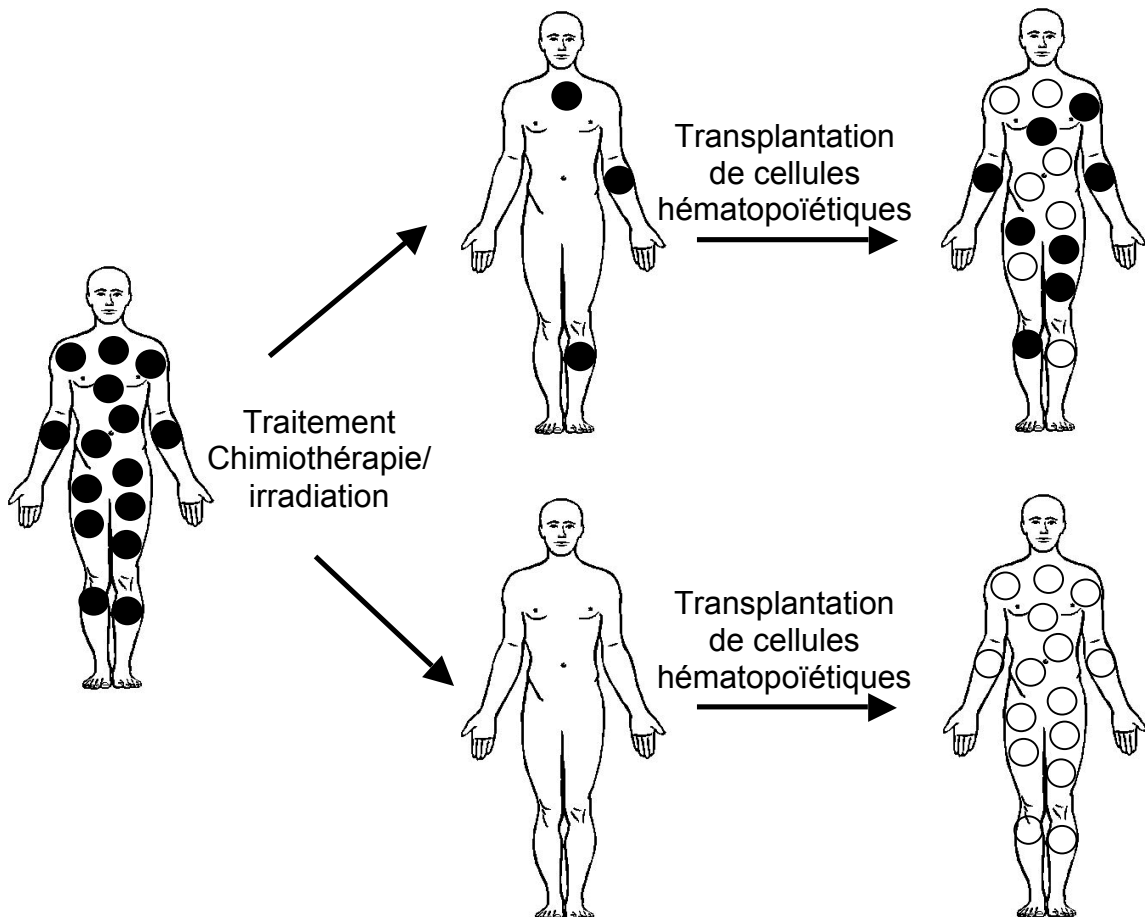


Figure 1.3 : Transplantation de cellules hématopoïétiques d'un donneur à un receveur après traitement chimiothérapie/irradiation. Les cercles en noirs sont les cellules hématopoïétiques du receveur et ceux en blancs

sont les cellules hématopoïétiques du donneur. Après transplantation, le receveur peut avoir 100% des cellules hématopoïétiques du donneur, ou encore un chimérisme de cellules hématopoïétiques appartenant au receveur et au donneur s'il n'y a pas eu élimination complète de toutes ses cellules lors du traitement.

Le potentiel curatif de la TCSH est donc supporté par un conditionnement myéloablatif à base de chimiothérapie et/ou radiothérapie et l'induction d'une réaction immunitaire des cellules du donneur contre les cellules du receveur. Cependant, en raison de sa toxicité, ce type de conditionnement est réservé aux jeunes patients. Pour le régime myéloablatif, une irradiation totale du corps à forte dose et l'administration de cyclophosphamide à hautes doses sont utilisées depuis de nombreuses années (Thomas, Buckner et al. 1977; Beutler, Blume et al. 1979). L'introduction du busulfan dans le régime de conditionnement a permis sa combinaison à la cyclophosphamide à la place de l'irradiation (Santos, Tutschka et al. 1983). Vu que ces régimes sont restreints à certains patients, de nouveaux protocoles de conditionnement ont été mis en place. Ils sont appelés conditionnements non-myéloablatifs, ou d'intensités réduites. Ces nouveaux conditionnements entraînent peu de mortalité, même chez des patients plus âgés. Ces régimes d'intensité réduite sont basés sur l'utilisation de différents agents de chimiothérapies en association ou seul, comme la fludarabine, avec ou sans irradiation totale du corps à faible dose. De plus, il peut y avoir l'utilisation de la globuline anti-thymocyte (ATG) afin d'éliminer les lymphocytes T du receveur.

II. 3. Différentes sources de donneurs pour la TCSH

Le premier choix de donneur pour la TCSH est un individu de la même fratrie compatible au niveau du système HLA (greffe HLA identique apparentée). Quand un tel donneur n'est pas

trouvé, un autre donneur non apparenté HLA-compatible doit être cherché. Depuis plusieurs années, il existe un registre informatique des donneurs de MO. Malgré la rapide augmentation du nombre de donneurs dans ce fichier au cours des vingt dernières années, la possibilité de trouver un donneur non apparenté avec le même HLA que le receveur demeure limitée, essentiellement pour les génotypes de HLA non communs. Si ce type de donneur non apparenté HLA-compatible ne peut pas être trouvé, des donneurs alternatifs peuvent être considérés. Ceux-ci incluent les donneurs apparentés HLA partiellement incompatibles, les donneurs non apparentés HLA partiellement incompatibles, les sangs de cordon ombilical HLA-compatibles ou partiellement incompatibles, et les donneurs haplo-identique apparentés. La TCSH implique une infusion de cellules contenant des cellules souches (les plus importantes) et des progéniteurs de cellules hématopoïétiques avec ou sans cellules T. Une des méthodes pour éliminer les cellules T du greffon est l'utilisation des anticorps monoclonaux dirigés contre les cellules T et en ajoutant du complément afin d'induire la lyse cellulaire. Les anticorps monoclonaux peuvent être également couplés avec une immunotoxine afin d'éliminer les cellules T. Enfin, une sélection positive des cellules souches par l'anticorps anti-CD34 peut être un moyen de ne plus avoir les cellules T. Les cellules souches hématopoïétiques (CSH) peuvent être obtenues de MO, de sang périphérique enrichi en CSH, ou de sang de cordon ombilical. La MO obtenue par aspiration des crêtes iliaques postérieures a longtemps été la seule source de CSH. L'inconfort de la procédure pour le donneur disparaît habituellement en deux semaines, et des effets sérieux sont très rares (Anderlini, Rizzo et al. 2001). Comme les CSH quittent continuellement la MO, pour entrer dans la circulation sanguine, et ensuite retourner dans la MO, le sang périphérique est une source possible pour remplacer la MO. Néanmoins, afin d'avoir un grand nombre de CSH

dans le sang périphérique, le donneur est traité par le G-CSF (granulocyte colony stimulating factor). Ce facteur de croissance permet de faire migrer les CSH de la MO vers le sang périphérique. La troisième source de CSH utilisée est le sang de cordon. Le sang de cordon est riche en CSH, mais est limité en volume. Il est récolté immédiatement après la naissance de l'enfant et ensuite congelé. Au fil des ans, le sang de cordon a été de plus en plus utilisé comme source de donneur pour la TCSH particulièrement chez les patients pédiatriques (Figure 1.4).

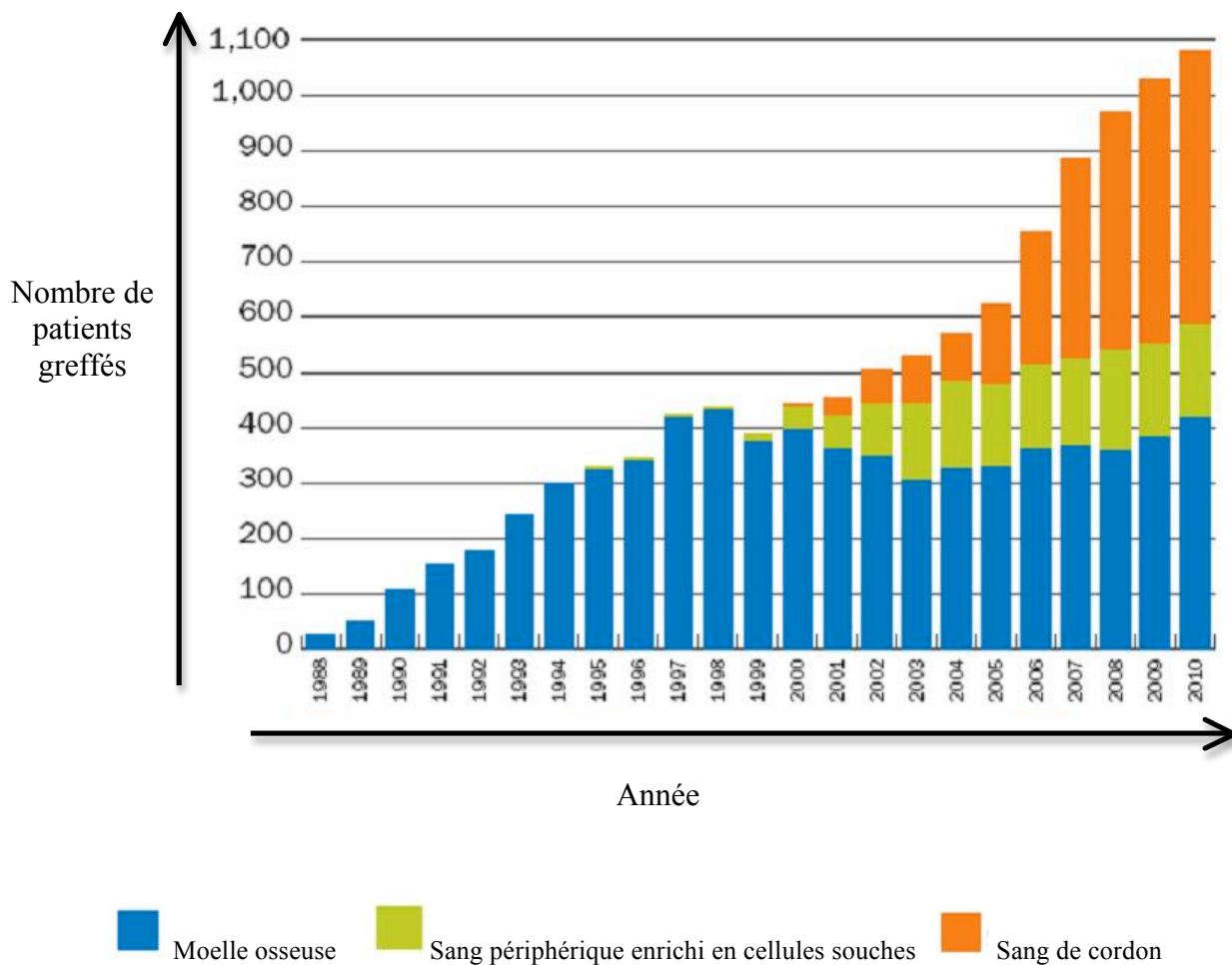


Figure 1.4 : Transplantation du Programme National des donneurs de moelle osseuse (NMDP) chez les patients pédiatriques selon la source de cellules souches hématopoïétiques.

http://marrow.org/Physicians/Unrelated_Search_and_Transplant/Trends_in_Allo_Transplants.aspx

II. 4. Prise et échec de la greffe

Lors de la TCSH, la prise de la greffe va résulter de la migration des CSH du sang périphérique vers la MO, et de leur implantation dans celle-ci afin de pouvoir reconstituer le système hématopoïétique et immunitaire. Cette prise est évaluée par l'apparition des neutrophiles et des plaquettes, puis par l'étude du chimérisme entre les cellules du donneur et celles du receveur (Figure 1.3). Une prise de greffe complète est définie lorsque le patient n'est plus en neutropénie et que le chimérisme est de plus de 90% de type du donneur. Comme les patients reçoivent un conditionnement qui élimine leur système immunitaire, la TCSH est souvent associée à une immunodéficience prolongée post-transplantation. Ceci se produit surtout après des traitements de conditionnements intensifs ou lors d'utilisation de greffes dépourvues en cellules T. Le temps nécessaire pour régénérer complètement le compartiment des cellules T et B est d'un ou deux ans, surtout lorsque le thymus a perdu la plupart de ses fonctions du fait de l'âge du receveur, des thérapies utilisées, et/ou de l'existence d'une GVH (voir ci-dessous).

Après transplantation, le premier échec d'une greffe est l'absence de prise et/ou la perte des cellules du donneur. Ces dernières sont rejetées principalement par les lymphocytes T du receveur dans le contexte d'une réaction allo-immune. Les cellules du donneur sont reconnues comme non-soi par les cellules du receveur, d'où la nécessité d'éliminer ces cellules avant transplantation (Marijt, Kernan et al. 1995; Mattsson, Ringden et al. 2008). L'échec de prise de la greffe peut aussi être dû à un faible nombre de cellules injectées (Gluckman, Rocha et al. 1997; Rocha, Cornish et al. 2001). Ceci survient surtout lors de transplantation avec du sang de cordon, où le nombre de cellules injectées est plus faible qu'avec de la MO. Cette source de CSH est donc utilisée essentiellement pour transplanter les patients pédiatriques.

Néanmoins, la transplantation de deux unités de sang de cordon au lieu d'une unité afin d'augmenter le nombre de cellules injectées permet une amélioration de la prise de greffe, et rend possible la stratégie de la greffe de sang de cordon chez les adultes (Barker, Weisdorf et al. 2005; Ballen, Spitzer et al. 2007).

II. 5. Reconstitution immunitaire

La TCSH est principalement utilisée pour restaurer les populations cellulaires hématopoïétiques chez des patients recevant de hautes doses d'irradiation et/ou de chimiothérapie pour traiter les maladies du sang telles que la LAL. Les radiothérapies et chimiothérapies causent une destruction de l'hématopoïèse, et donc les CSH provenant d'un donneur reconstituent le système hématopoïétique du receveur. Par conséquent, selon l'âge du patient et le conditionnement utilisé, la reconstitution immunitaire peut plus ou moins être retardée. De plus, les drogues immunosuppressives utilisées pour prévenir la GVHD peuvent retarder la reconstitution immunitaire. Ainsi, durant cette période, les patients transplantés sont exposés aux infections opportunistes, lesquelles dans plusieurs cas peuvent être fatales. Chez les patients pédiatriques, la reconstitution lymphocytaire lors d'une TCSH de sang de cordon est comparable à celle observée lors d'une TCSH de MO (Locatelli, Maccario et al. 1996; Moretta, Maccario et al. 2001). Les cellules NK vont apparaître en première dans les premières semaines et vont atteindre des niveaux normaux dès un mois post-transplantation (Figure 1.5). Les lymphocytes B apparaissent vers trois mois et les lymphocytes T CD4 atteignent des niveaux normaux vers six à neuf mois post-transplantation. Par contre, les lymphocytes T CD8 apparaissent à des niveaux normaux plus tardivement, pas avant neuf

mois post-transplantation, ce qui est différent lors d'une TCSH de MO (Renard, Barlogis et al. 2011).

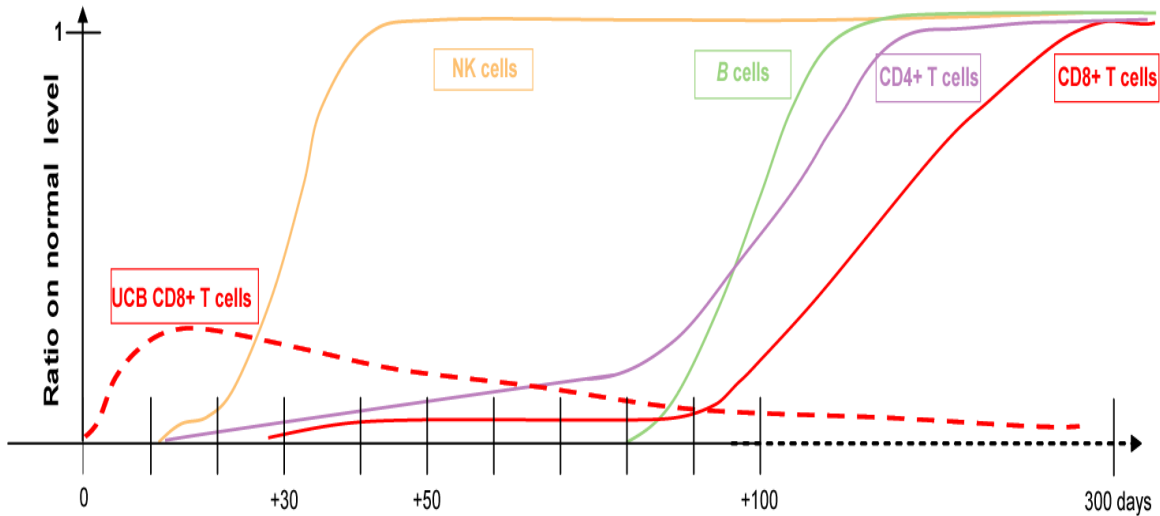


Figure 1.5 : Cinétique de la reconstitution immunitaire chez les patients pédiatriques après TCH de sang de cordon (Merindol, Charrier et al. 2011).

II. 6. La maladie du greffon contre l'hôte

Des études cliniques et des études *in vitro* ont clairement montré que la TCSH allogénique peut induire un effet appelé «greffe contre la tumeur» (graft-versus-tumor = GVT) durant lequel les cellules immunitaires dérivées du donneur attaquent les cellules tumorales du receveur et participent à la guérison de la maladie maligne. Cependant, cet effet bénéfique provient des cellules T et est souvent associé avec la GVHD, qui est un processus durant lequel les tissus normaux du receveur sont attaqués par les cellules T du donneur. La morbidité et la mortalité dues à la GVHD demeurent des barrières majeures à l'avancement de la TCSH. Environ 35 à 50% des patients pédiatriques ayant une TCSH développeront une

GVHD, malgré l'utilisation d'agents immunosuppresseurs. Cette complication survient lorsque les cellules du donneur reconnaissent les cellules du receveur comme étrangères, et les tuent. Il s'agit également d'une réaction immunitaire allogénique. Ainsi, la disparité du HLA entre le receveur et le donneur est un facteur important à prendre en considération. La pathophysiologie de la GVHD peut être divisée en trois phases distinctes, mais qui demeurent toutefois liées entre elles. La première phase est représentée par les dommages tissulaires consécutives au conditionnement, ce qui amplifie l'activation des cellules T du donneur lors de la seconde phase, pour aboutir lors de la troisième phase aux lésions tissulaires cibles induites par les cellules et cytokines du donneur.

II. 6.a. Dommage tissulaire lié au conditionnement

Le dommage tissulaire est le déclencheur du développement de la GVHD, et se produit souvent bien avant l'injection du greffon. En effet, les diverses thérapies antérieures que le patient a reçues et qui ont provoquées des lésions tissulaires et cellulaires et le nouveau dommage induit par le conditionnement, induisent la libération de grandes quantités de cytokines inflammatoires. Ces cytokines vont stimuler l'activation des cellules présentatrices d'antigènes (CPA) du receveur (Zhang, Louboutin et al. 2002; Ferrara, Cooke et al. 2003). De plus, l'irradiation totale du corps déclenche la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires incluant le tumor necrosis factor (TNF), l'interleukine 1 (IL-1), et l'interleukine 6 (IL-6) (Xun, Thompson et al. 1994), et provoque également des lésions de l'épithélium du système gastro-intestinal (Paris, Fuks et al. 2001). Tout ceci entraîne la libération de lipopolysaccharide (LPS) et d'autres glycolipides dérivés de bactéries à travers la muqueuse

intestinale endommagée qui activent le système immunitaire inné et provoquent une tempête cytokinique inflammatoire (Hill, Crawford et al. 1997; Hill and Ferrara 2000).

II. 6.b. Activation des cellules T du donneur

Des études ont montré que les cellules T naïves, et non mémoires, du donneur sont capables d'induire une GVHD aiguë (Anderson, McNiff et al. 2003; Zhang, Joe et al. 2004). Devant cette constatation, certains ont proposé d'éliminer les cellules T naïves du donneur du greffon, tout en conservant les cellules T mémoires qui permettront de contrôler les infections opportunistes. Néanmoins, une étude contredit ces données en montrant que des cellules T alloréactives mémoires peuvent être aussi responsables de GVHD (Zhang, Joe et al. 2005). Cependant, d'autres études indiquent que ce sont essentiellement les cellules T naïves qui provoquent une GVHD, contrairement aux cellules T mémoires qui sont moins alloréactives (Foster, Marangolo et al. 2004; Chen 2008; Distler, Bloetz et al. 2011), ce qui soutient qu'elles sont capables d'induire une GVHD mais moins intensément. De plus, des études montrent que l'utilisation de greffons provenant de femmes multipares provoque plus de GVHD (James, Chai et al. 2003; Randolph, Gooley et al. 2004), laissant supposer un rôle de cellules mémoires dans le greffon.

L'induction de la GVHD nécessite la stimulation des cellules T naïves du donneur par les CPA qui présentent des alloantigènes (antigènes provenant du receveur). Ces antigènes sont issus des lésions tissulaires et cellulaires avant transplantation, et sont captés par les CPA du donneur. La GVHD se déclencherait différemment selon la population lymphocytaire T : cellules T CD4 et cellules T CD8. Les CPA résiduelles du receveur seraient nécessaires pour l'induction de la GVHD dépendant des cellules T CD8 (Shlomchik, Couzens et al. 1999),

mais une fois la GVHD déclenchée, elle pourrait être amplifiée par les CPA du donneur. Par contre, la présentation des antigènes du receveur par le CMH de classe II sur les CPA du donneur serait suffisante pour induire une GVHD dépendante des cellules T CD4 (Anderson, McNiff et al. 2005). Cependant tous ces travaux ont été effectués dans le modèle murin, et pourraient être donc différents chez l'homme.

Après l'interaction avec les CPA activées, les cellules T CD4 se différencient en cellules T helper (Th1) productrices de cytokines permettant la prolifération de cellules T et leur différenciation. Ces cellules Th1 produisent de grandes quantités de cytokines pro-inflammatoires incluant l'interféron γ (IFN- γ) et le TNF, lesquelles induisent des dommages tissulaires indépendants du CMH (Teshima, Ordemann et al. 2002). En opposition, les cellules T CD8 du donneur se différencient en lymphocytes T cytotoxiques (LTC) qui ont la capacité d'entraîner des lésions tissulaires dépendant du CMH via les voies de perforine, granzyme B et Fas ligand (FasL) (Kagi, Vignaux et al. 1994; Shresta, Pham et al. 1998).

II. 6.c. Dommages tissulaires provoqués par les cellules et cytokines

La phase finale de la GVHD est caractérisée par l'apoptose des tissus cibles provoquée directement par les cellules effectrices cytotoxiques, et indirectement par les cytokines. Les cellules effectrices du donneur, comprenant les cellules T CD4, les LTC et les cellules NK (natural killer), déclenchent leurs activités cytotoxiques à travers la sécrétion de perforine et granzyme B, ou à travers les interactions de Fas-FasL, TNF, ou TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand) (Kagi, Vignaux et al. 1994; Shresta, Pham et al. 1998; Kayagaki, Yamaguchi et al. 1999). Les cellules T activées vont tuer les CPA principalement à travers les

voies de perforine, granzyme B et Fas-FasL. Les deux cytokines principales, IL-1 et TNF, jouent un rôle critique dans le développement de la GVHD. L'IL-1 est une cytokine pro-inflammatoire dans les réponses immunitaires qui a des effets importants sur l'incidence et la sévérité de la GVHD (Cullup and Stark 2005). Le TNF a plusieurs rôles centraux à différentes étapes de la GVHD, incluant l'amélioration de la maturation des CPA, la migration des cellules, l'amélioration des réponses des cellules T (Hill, Teshima et al. 2000), et l'induction directe des lésions tissulaires (Laster, Wood et al. 1988). Le TNF pourrait stimuler aussi la production de plusieurs cytokines telles que l'IL-1, l'IL-6, l'IL-10 et l'IL-12 ce qui augmenterait la réaction (Jacobsohn and Vogelsang 2007). De plus, quelques cytokines en particulier l'IL-6, l'IL-8, le TNF- α , l'IFN- γ et l'IL-2 sont libérées et jouent un rôle important dans l'amplification de la GVHD (Bryson, Jennings et al. 2007; Ho and Cutler 2008; Toubai, Sun et al. 2008) par les cellules T CD4⁺ du greffon. Par ailleurs, l'implication de la voie TRAIL joue un rôle bénéfique en faisant diminuer l'effet GVHD lorsque les cellules T sont transduites par TRAIL (Ghosh, Dogan et al. 2013).

II. 7. Rôles de la transplantation des cellules souches hématopoïétiques

En résumé, la TCSH va agir à différents points chez le patient faisant intervenir principalement les lymphocytes T comme vu ci-dessus. La première fonction de la TCSH est d'obtenir un effet GVL. Une partie des lymphocytes T du greffon vont donc intervenir et agir dans la reconnaissance des cellules leucémiques de l'hôte. Elles vont par conséquent contrôler la rechute du patient, et pouvoir éliminer les cellules leucémiques qui n'ont pas été tuées lors du conditionnement du patient avant transplantation. Ensuite, une autre fonction de la TCSH est la reconstitution immunitaire faisant intervenir les cellules souches du greffon. Ces

cellules vont coloniser la MO du patient et reconstituer tout le système hématopoïétique dont les lymphocytes T qui apparaîtront en dernier. Aussi, la TCSH agit au niveau des infections opportunistes. Ces infections vont pouvoir être contrôlées grâce à une partie des cellules T du greffon. Vu que le patient est immunodéprimé au moyen de la transplantation, il est vulnérable à tout type d'infection, en particulier les infections opportunistes incluant le virus Epstein Barr, le cytomégalovirus et le virus de la varicelle. Les cellules T du greffon reconnaissant ces virus jouent donc un rôle important afin de protéger le patient contre ces infections. Enfin, la TCSH intervient dans la GVHD qui est une des complications critiques. Ceci implique les lymphocytes T du greffon où une partie d'entre eux vont reconnaître les cellules de l'hôte comme étranger, et par conséquent vont les tuer pouvant entraîner la mort du patient s'il n'est pas traité.

III- La rechute de la leucémie et l'immunothérapie

III. 1. La rechute de la leucémie et l'effet de la greffe contre la leucémie

Environ la moitié des patients pédiatriques ayant une LAL vont présenter une rechute de la maladie après TCSH. La rechute de la leucémie est souvent associée avec une faible GVHD. Inversement, les patients ayant une forte GVHD vont souvent avoir une bonne réponse de la greffe contre la leucémie (graft-versus-leukemia = GvL) et présenter moins de rechute. Par contre, la disparité HLA ne va pas influencer l'effet GvL à savoir qu'une plus grande disparité

HLA ne l'augmente pas (Weisdorf, Nelson et al. 2009; Weisdorf 2010). Les patients dont la GvL est efficace vont rentrer en rémission complète. À noter, qu'une rémission complète peut aussi avoir lieu lors d'une chimiothérapie. Ceci ne signifie pas que les cellules leucémiques sont totalement éliminées du corps, mais que leur nombre se situe en-dessous du seuil de détection par les méthodes conventionnelles utilisées. De ce fait, un nombre minimal de cellules leucémiques peut encore résider dans le patient. Ceci est défini comme la maladie résiduelle, où on suppose qu'il peut y avoir encore quelques cellules leucémiques. Il est donc important de suivre la maladie résiduelle chez les patients en rémission complète afin de détecter une possible rechute de la leucémie et de la prévenir. De plus, le suivi de la maladie résiduelle est un facteur de fort pronostic de rechute (Jacquy, Delepaut et al. 1997; Biondi, Valsecchi et al. 2000).

La GvL se produit lorsqu'une partie des cellules transplantées réagissent contre les cellules leucémiques du patient. Ce sont principalement les lymphocytes T et les cellules NK qui pourront éliminer les cellules leucémiques. Il a été montré qu'un chimérisme complet est associé à un risque plus faible de rechute de la leucémie (Keil, Prinz et al. 2003; Huisman, de Weger et al. 2007). De plus, il a été observé que la déplétion des lymphocytes T lors de TCSH afin d'éviter un effet GVHD augmente le risque de rechute de la leucémie (Rocha, Cornish et al. 2001). Aussi, l'élimination des lymphocytes T avant la TCSH augmente les risques d'infections opportunistes chez les patients.

III. 2. L'immunothérapie

La TCSH est utilisée chez les patients avec une LAL qui ont une maladie considérée comme à haut risque de rechute. La plupart du temps, les patients ont déjà rechuté de la leucémie avant

d'avoir une TCSH. Cette dernière va permettre aux lymphocytes T provenant du donneur de tuer les cellules leucémiques résiduelles. Cependant, il y a encore une proportion significative de patients qui rechutent après la TCSH. Une des solutions pour traiter ces rechutes de leucémie après une TCSH est l'immunothérapie cellulaire. De multiples stratégies d'immunothérapies ont été mises en place en utilisant différents types cellulaires. L'immunothérapie cellulaire a pour but de transfuser des cellules pouvant tuer directement les cellules leucémiques ou stimuler le système immunitaire pour qu'il puisse tuer les cellules tumorales.

III. 2.a. Infusion des leucocytes du donneur

L'infusion de leucocytes du donneur (donor leukocyte infusion = DLI) a été montrée efficace chez des patients ayant une leucémie myéloïde chronique (LMC) et rechutant après une TCSH. Néanmoins, l'injection des DLI a été montrée nettement moins efficace dans le cas d'une LAL avec un taux d'efficacité entre 0 et 13% (Kolb, Schattenberg et al. 1995; Collins, Goldstein et al. 2000; Choi, Lee et al. 2005), bien que le premier patient traité avec succès par les DLI était un enfant avec une LAL (Slavin, Naparstek et al. 1996). Les réponses de LAL après injection de DLI sont donc rares, et les quelques rémissions prolongées ont été observées chez les patients traités par chimiothérapie intensive ou radiothérapie. Pour que l'effet GvL soit efficace, il faut qu'il se produise très tôt après la TCSH. La limite de l'efficacité des DLI contre la leucémie pourrait être associée avec un manque de molécules de co-stimulation sur les cellules leucémiques et une induction de la tolérance immunitaire. (Cardoso, Schultze et al. 1996). De plus, l'injection des DLI augmente le risque de GVHD, puisque parmi les lymphocytes injectés, il y a ceux qui reconnaîtront les cellules leucémiques

et ceux qui attaqueront les cellules normales du patient (Collins, Goldstein et al. 2000). Enfin, l'immunothérapie par les DLI n'est pas possible chez des patients qui sont transplantés avec des CSH provenant de sang de cordon ombilical, puisque ce dernier a été entièrement utilisé pour la transplantation et qu'il n'est par conséquent pas possible de disposer de cellules du donneur.

III. 2.b. Les cellules dendritiques

Les cellules dendritiques (dendritic cell = DC) jouent un rôle majeur dans l'initiation et l'induction des réponses immunitaires. Elles sont impliquées dans l'activation des lymphocytes T et B, et dans l'induction de la tolérance immunitaire. De ce fait, leurs interactions dans les réponses immunitaires les rendent intéressantes pour diverses situations cliniques faisant intervenir les lymphocytes T, telles que la transplantation, l'allergie, les maladies auto-immunes, la résistance aux infections et cancer, et la vaccination (Banchereau and Steinman 1998). Les DC expriment de nombreux récepteurs à leur surface comprenant ceux impliqués dans la migration cellulaire (CD11a,b,c, CD49d, CD44 et B-catherine), dans l'absorption des antigènes (MMR, DEC-205 et FcR (récepteur du fragment constant des immunoglobulines) pour les IgG et IgE), dans la présentation antigénique (CMH de classe I et II, et CD1), dans l'adhésion et la co-stimulation (CD50, CD54, CD58, CD80 et CD86), dans la signalisation cellulaire (récepteur au TNF, CD40 et CD120) et dans la réponse aux cytokines (récepteurs de cytokines incluant le GM-CSF (Granulocyte macrophage colony stimulating factor), IL-1, IL-4, IL-10 et TGF- β (Transforming growth factor)).

Les DC peuvent se trouver sous deux formes, dites soit immature ou mature. Les DC immatures sont caractérisées par une forte expression de CMH de classe II intracellulaire, et

une faible expression de CD54, CD58, CD80, CD86 et CD40. Elles possèdent des FcR et sont capables d'englober des corps étrangers ou apoptotiques. Cette fonctionnalité les rend extrêmement efficaces pour capter les antigènes et les présenter à leur surface. À ce stade de différenciation, elles stimulent faiblement les lymphocytes T. En opposition, les DC matures expriment de hauts niveaux de CD1, CMH de classe II, CD54, CD80, CD86 et CD83, et elles sont inefficaces pour capter les antigènes. Elles sont par contre d'excellents stimulateurs pour activer les lymphocytes T.

III. 2.b.1. Les différentes sous-populations des cellules dendritiques

Les DC sont une population hétérogène avec des rôles clés dans l'immunité adaptative. Généralement, elles captent les antigènes, les processent, et les présentent aux cellules T, afin d'induire soit une réponse immunitaire ou soit une tolérance contre l'antigène présenté. L'induction par la présentation antigénique est en partie déterminée selon le type de DC.

Nous pouvons tout d'abord inclure les monocytes qui peuvent être considérés comme des précurseurs des DC. Ce sont des cellules phagocytaires immatures qui proviennent de la MO, et se retrouvent dans différents tissus dont le sang et la rate (Grage-Griebenow, Flad et al. 2000). Les monocytes expriment les récepteurs CD14, CCR2 et CD62L (Tacke and Randolph 2006). Ils migrent au niveau des sites d'inflammation, et peuvent par la suite se différencier en macrophages. Ils peuvent aussi se différencier en DC inflammatoires qui interviennent dans la réponse innée (Geissmann, Auffray et al. 2008). Parmi les monocytes, il y a une sous-population cellulaire exprimant le récepteur CD16. Cette population possède plusieurs caractéristiques des DC, telles que l'expression du CMH de classe II, les molécules de co-stimulation, et le CD11c (Ancuta, Weiss et al. 2000). Lors d'une infection virale ou

bactérienne, cette population monocytaire se différencie en DC matures, et déclenche une réponse cellulaire de type Th1 (Ancuta, Weiss et al. 2000).

Ensuite, il y a les DC retrouvées au niveau des muqueuses. Leur rôle est de maintenir l'équilibre entre la tolérance et la génération de réponses immunes (Dhodapkar, Steinman et al. 2001; Mahnke, Schmitt et al. 2002). Dans la muqueuse intestinale, les DC sont localisées au niveau de la lamina propria, et également dans les ganglions mésentériques et les plaques de Peyer.

Il y a aussi les DC de Langerhans qui sont un sous-type des DC des muqueuses. Ces cellules de Langerhans ont été décrites en 1868 par Paul Langerhans (Merad and Manz 2009). Ces cellules résident dans l'épiderme et les muqueuses. Elles effectuent un rôle de surveillance immunitaire afin de prévenir l'infection (Dieu-Nosjean, Massacrier et al. 2000). Lors d'une infection, elles vont capter le microorganisme, se différencier en DC matures, et migrer vers les organes lymphoïdes pour présenter les antigènes aux cellules T (Romani, Holzmann et al. 2003). Elles ont également une capacité tolérogénique (Enk, Jonuleit et al. 1997).

Il y a aussi les DC myéloïdes. Cette sous-population se localise dans les tissus afin de jouer le rôle de surveillance (Manz, Traver et al. 2001). En périphérie, les DC myéloïdes font la liaison entre l'immunité innée et l'immunité adaptative. Par conséquent, lors d'une infection, les DC myéloïdes vont se différencier et devenir matures, et vont pouvoir par la suite stimuler les cellules T. Elles ont aussi un rôle tolérogénique en favorisant la différenciation et l'activation des cellules T régulatrices (Kubach, Becker et al. 2005).

Enfin, il y a les DC plasmacytoïdes qui sont très importantes et font le lien entre l'immunité innée et l'immunité adaptative (Siegal, Kadowaki et al. 1999). On les retrouve dans le sang, mais aussi dans les organes en périphérie. En cas d'infection, les DC plasmacytoïdes

produisent de grande quantité d'IFN de type I entraînant l'activation des DC myéloïdes, l'induction de réponses T, et la production d'IFN- γ (Luft, Pang et al. 1998; Kadowaki, Antonenko et al. 2000). De plus, les DC plasmacytoïdes non-stimulées jouent un rôle dans la tolérance en périphérie (Krug, Veeraswamy et al. 2003).

III. 2.b.2. Les cellules dendritiques chargées avec des antigènes tumoraux

Cette approche utilise des DC normaux immatures en les chargeant avec des antigènes tumoraux afin de permettre une présentation antigénique de la LAL (ou autre tumeur) aux cellules T pour les activer. Les DC du donneur de la TCSH sont chargées avec des antigènes provenant de la LAL. Elles sont ensuite infusées aux patients afin de stimuler les cellules T provenant de la transplantation afin que ces dernières puissent par la suite éliminer la LAL. Des DC chargées avec des fragments apoptotiques de cellules tumorales sont plus efficaces que les DC chargées avec des lysats de cellules tumorales dans des expériences d'induction des LTC contre la LAM (Galea-Lauri, Darling et al. 2002). Dans une autre étude, des DC chargées avec des blastes LAM apoptotiques autologues peuvent générer des lymphocytes T qui possèdent une activité contre la LAM. Cette activité cytotoxique n'a pas été observé contre une LAM allogénique ou en utilisant des DC non chargées (Spisek, Chevallier et al. 2002). De plus, une étude a montré que les lysats de LAL peuvent induire une différenciation des DC en stade mature, une production de cytokines, et une activité cytotoxique des lymphocytes T contre les blastes leucémiques (Pospisilova, Borovickova et al. 2002). Les LTC générés sont principalement des cellules CD3⁺ CD8⁺ qui n'ont aucun effet sur les cellules non leucémiques des patients.

III. 2.c. Les cellules T modifiées

Étant donné les effets limités de GvL observés avec des cellules T de donneur dans la LAL avec ou sans infusion de DC, plusieurs équipes ont étudié une nouvelle forme d'immunothérapie cellulaire en modifiant génétiquement les cellules T autologues afin qu'elles puissent reconnaître spécifiquement des antigènes tumoraux.

Une des voies pour modifier les cellules T est le transfert génique des sous-unités des chaînes α et β du récepteur de cellule T (T cell receptor = TCR). Les TCR utilisés sont dérivés de clones de cellules T spécifiques contre des antigènes tumoraux (Sadelain, Riviere et al. 2003; Brentjens 2004; Sadelain, Brentjens et al. 2009). La faisabilité de cette approche a été montrée dans des essais cliniques chez des patients ayant des mélanomes métastatiques (Morgan, Dudley et al. 2006; Johnson, Morgan et al. 2009). Cependant, les données publiées en utilisant cette approche thérapeutique sont peu nombreuses mais toutefois efficaces dans les cancers hématopoïétiques (Xue, Gao et al. 2005; Dossett, Teague et al. 2009). En plus, cette approche permet seulement de reconnaître les antigènes tumoraux qui sont présentés sur les molécules HLA. De ce fait, la spécificité du TCR est restreinte au phénotype HLA du patient. Par conséquent, elle ne peut pas être appliquée de façon universelle pour tous les patients en utilisant les mêmes cellules T qui ont été modifiées, ce qui implique que des manipulations complexes et onéreuses doivent être développées pour chaque individu. De plus, beaucoup de cellules tumorales diminuent l'expression des molécules HLA et/ou ont un défaut dans le mécanisme de présentation antigénique (Gottschalk, Ng et al. 2001; Khong and Restifo 2002). De ce fait, les cellules T modifiées ne pourront pas reconnaître ces cellules tumorales et les éliminer.

Une autre stratégie pour modifier les cellules T est l'utilisation de récepteurs antigéniques chimériques (chimeric antigen receptor = CAR). Les CAR sont composés du fragment variable de l'anticorps (single-chain variable-fragment = scFv) spécifique pour un antigène tumoral. Ce scFv est fusionné à un domaine transmembranaire et à une partie du domaine de signal intracellulaire des cellules T comme le CD3- ζ (Park and Brentjens 2010). Le récepteur ainsi obtenu, exprimé sur la surface des cellules T, permettra de lier l'antigène tumoral à travers le domaine scFv, lequel entraînera un signal d'activation dans la cellule T pour tuer la cellule cible.

L'utilisation de cellules T modifiées exprimant un CAR spécifique d'un antigène a plusieurs avantages. Tout d'abord, cette approche utilise les cellules T provenant du patient, évitant ainsi un risque de GVHD. Ensuite, les cellules T modifiées peuvent être facilement et rapidement générées *ex vivo* (Hollyman, Stefanski et al. 2009). De plus, la reconnaissance du CAR vis-à-vis de l'antigène est HLA indépendant. Les cellules T modifiées avec un CAR peuvent être utilisées pour tous les types de HLA. Enfin, les CAR peuvent être modifiés afin d'insérer des gènes additionnels, comme des molécules de co-stimulation ou de cytokines pour améliorer l'efficacité anti-tumorale des cellules T modifiées (Kowolik, Topp et al. 2006; Tammana, Huang et al. 2010; Singh, Figliola et al. 2011).

III. 2.c.1. Les cellules T modifiées dans la LAL

Tandis que l'utilisation des cellules T modifiées par un TCR spécifique contre des antigènes de LAL ont montré une faible efficacité, plusieurs équipes ont étudié l'utilisation des CAR comme un moyen de thérapie cellulaire pour la LAL.

La première étape est de choisir la molécule cible appropriée sélectivement exprimée sur les cellules cancéreuses. Pour les LAL de la lignée B, le récepteur CD19 est une molécule idéale pour plusieurs raisons. Tout d'abord, contrairement au récepteur CD20 qui est la cible utilisée pour l'immunothérapie basée sur les anticorps monoclonaux, le récepteur CD19 est exprimé très tôt dans le stade de différenciation des cellules B, au niveau des précurseurs précoces des lymphocytes B. De plus, ce récepteur reste exprimé sur les cellules tumorales leucémiques. Enfin, le récepteur CD19, comme le récepteur CD20, est absent sur les cellules souches hématopoïétiques pluripotentes (Cooper, Al-Kadhimi et al. 2004; Cooper, Al-Kadhimi et al. 2005; Loskog, Giandomenico et al. 2006) évitant ainsi d'éliminer les autres populations cellulaires. De plus, une équipe a montré l'efficacité d'un anticorps bispécifique ciblant l'antigène CD19 (blinatumomab) chez les patients ayant une LAL (Topp, Kufer et al. 2011). Ceci laisse suggérer que le récepteur CD19 est une cible très attractive pour l'immunothérapie cellulaire dans la LAL.

En effet, il a été montré que les cellules T modifiées avec un CAR spécifique pour cibler le récepteur CD19 lysent efficacement *in vitro* les cellules tumorales exprimant le récepteur CD19 à leur surface, et éradiquent les tumeurs systémiques exprimant le récepteur CD19 dans le modèle de souris SCID-beige (Brentjens, Latouche et al. 2003). D'autres études ont montré que l'efficacité et la persistance de ces cellules T modifiées *in vivo* peuvent être améliorées par des molécules de co-stimulation (Brentjens, Latouche et al. 2003; Brentjens, Santos et al. 2007). Puisque la plupart des tumeurs n'expriment pas les ligands de co-stimulation (CD80 et CD86) qui sont nécessaires pour l'activation et la prolifération des cellules T, le CAR a été modifié en introduisant le domaine de signalisation intracellulaire des récepteurs CD28, 4-1BB et/ou OX40. Ce nouveau CAR, dit de seconde génération, permet une activation et

prolifération *in vitro* en l'absence des ligands de co-stimulation, de même qu'une amélioration de l'efficacité anti-tumorale *in vivo* dans des souris immunodéficientes ayant une tumeur pré-B LAL systémique n'exprimant pas les ligands CD80 et CD86 (Imai, Mihara et al. 2004; Loskog, Giandomenico et al. 2006; Milone, Fish et al. 2009). Plus récemment, un nouveau CAR, dit de troisième génération, a été créé. Celui-ci contient en tandem les domaines de signalisation de deux récepteurs de co-stimulation, soit ceux des récepteurs CD28 et 4-1BB ou ceux des récepteurs de CD28 et OX40. Ce nouveau CAR démontre une amélioration de la capacité du signal à travers la cellule T comparé aux autres CAR de première et seconde générations (Wang, Jensen et al. 2007; Kochenderfer, Feldman et al. 2009).

III. 2.c.2. Les essais cliniques avec le CAR spécifique du récepteur

CD19 dans la LAL

Étant donné l'efficacité des cellules T modifiées par le CAR spécifique pour le récepteur CD19 dans les modèles précliniques, plusieurs essais cliniques ont été mis en place chez des patients ayant différents types de cancers hématologiques d'origine de la lignée B. Les données préliminaires de ces études cliniques suggèrent que la thérapie cellulaire utilisant les cellules T modifiées par le CAR spécifique pour le récepteur CD19 sont prometteuses pour les cancers touchant les cellules de la lignée B (Kochenderfer, Wilson et al. 2010; Brentjens, Riviere et al. 2011). De plus, une étude a récemment montré des réponses complètes chez trois patients avec des stades avancés de lymphomes B et de leucémie lymphoïde chronique (LLC). Ces trois patients ont été traités avec des cellules T autologues modifiées avec un

CAR spécifique pour le récepteur CD19 (Kalos, Levine et al. 2011; Porter, Levine et al. 2011).

La majorité des études cliniques utilisant ce type de CAR a été effectuée chez des patients ayant des cancers chroniques de cellules B. Plusieurs études sont actuellement en cours dans un groupe de patients ayant une LAL. Ces études utilisent des cellules T modifiées provenant soit du donneur de la greffe, soit du sang de cordon.

De plus, d'autres équipes ont examiné l'efficacité de l'utilisation du CAR spécifique pour le récepteur CD19 chez des patients rechutant de la LAL après TCSH. Les cellules T utilisées sont des cellules T multi-spécifiques contre trois virus qui sont le cytomégalovirus, le virus Epstein-Barr et l'adénovirus. Ces cellules T multi-spécifiques ont donc été modifiées avec un CAR spécifique pour le récepteur CD19. Les patients traités avec ces cellules T modifiées devraient à la fois être protégés pour la LAL, mais aussi pour les trois types d'infections virales cités précédemment (NCT00840853 ; NCT01195480 ; NCT01430390).

III. 2.d. Les cellules tueuses naturelles

Les cellules NK sont des cellules lymphoïdes du système immunitaire qui expriment les marqueurs CD56 et CD16. Elles expriment différents types de récepteurs activateur ou inhibiteur leur permettant ainsi d'être activées lors d'une infection virale ou lors de présence de cellules cancéreuses (Bottino, Biassoni et al. 2000).

Il y a tout d'abord les récepteurs KIR (killer immunoglobulin-like receptor) appartenant à la superfamille des immunoglobulines. Ils possèdent deux ou trois domaines extracellulaires avec de courts ou longs domaines intracellulaires. Ces récepteurs reconnaissent les molécules HLA de classe I. Par exemple, les récepteurs KIR2D vont reconnaître la molécule HLA-C,

tandis que les récepteurs KIR3D reconnaîtront les molécules HLA-A et HLA-B (Gumperz, Litwin et al. 1995; Fan and Wiley 1999). Parmi les récepteurs KIR, une partie a une fonction inhibitrice tel que le récepteur KIR2DL1, et l'autre partie possède une fonction activatrice comme le récepteur KIR3DL1 (Litwin, Gumperz et al. 1994; Frohn, Schlenke et al. 1997). Ce qui va différencier la fonction activatrice de la fonction inhibitrice, c'est la présence de motif à base de tyrosine appelée ITAM (immunoreceptor tyrosine-based activation motif) ou ITIM (immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif) respectivement (Muta, Kurosaki et al. 1994; Nakajima, Cella et al. 2000).

Ensuite, il y a les récepteurs appartenant à la famille de NKG2. Ces récepteurs sont associés avec la molécule CD94. Cette famille comporte de nombreux membres dont les récepteurs NKG2A, NKG2B et NKG2C (Houchins, Yabe et al. 1991) qui ont une fonction inhibitrice et reconnaissent les molécules HLA de classe I (Carretero, Cantoni et al. 1997). Il y a aussi le récepteur NKG2D qui joue rôle activateur et dont les ligands sont MIC-A (MHC class I chain-related gene A) et MIC-B. Ce récepteur a été montré à jouer un rôle essentiel dans la lyse des cellules tumorales (Pende, Cantoni et al. 2001).

Enfin, il y a la famille des récepteurs NCR (Natural cytotoxicity receptor). Ces récepteurs sont associés au motif ITAM. Les plus connus sont les récepteurs NKp30, NKp44 et NKp46. Cependant, les ligands ne sont pas encore connus, à part pour le récepteur NKp30 (Brandt, Baratin et al. 2009).

Les cellules cibles vont donc exprimer les ligands de ces différents récepteurs en particulier ceux des récepteurs KIR inhibiteur entraînant ainsi un signal inhibiteur aux cellules NK autologues, les empêchant de ce fait de lyser la cellule cible. Ce mécanisme empêche la lyse de cellules autologues par les cellules NK. Cependant, dans un contexte allogénique, les

cellules NK ne pourront pas reconnaître les autres cellules via leur ligands KIR, à savoir qu'elles n'auront pas de signal inhibiteur, menant ainsi à leur alloréactivité (Grzywacz, Miller et al. 2008). Néanmoins, l'alloréactivité des cellules NK n'apparaît pas à être très efficace dans la LAL (Ruggeri, Capanni et al. 2002). De ce fait, plusieurs équipes ont développé un protocole d'expansion des cellules NK. Ce protocole d'expansion consiste à cultiver des cellules mononucléées de sang périphérique avec la lignée cellulaire leucémique K562 irradiée. Cette lignée cellulaire K562 a été modifiée génétiquement afin d'exprimer le ligand 4-1BB et l'IL-15 membranaire afin de stimuler la prolifération des cellules NK (Fujisaki, Kakuda et al. 2009). Ces cellules NK amplifiées *in vitro* ont été modifiées avec le CAR spécifique pour le récepteur CD19, et testées contre la LAL (Imai, Iwamoto et al. 2005; Li, Liu et al. 2010). Ces cellules NK modifiées peuvent tuer les cellules tumorales LAL résistantes aux cellules NK conventionnelles.

III. 2.e. Les cellules tueuses activées par lymphokines

Une autre population cellulaire utilisée pour l'immunothérapie est des cellules effectrices induites par des cytokines. Les premières qui ont été développées au début des années 1980 sont les cellules tueuses activées par lymphokines (lymphokine-activated killer = LAK). Les cellules LAK sont des lymphocytes effecteurs cytotoxiques dont l'activité cytolytique n'est pas restreinte par le CMH (Grimm, Mazumder et al. 1982). De plus, les cellules LAK ont la capacité de lyser des cellules tumorales de patients et des lignées tumorales résistantes à la lyse par les cellules NK conventionnelles. Les cellules LAK, générées à partir de leucocytes de sang périphérique, sont cultivées avec une forte concentration de l'IL-2 durant une période très courte d'environ cinq jours. À la fin de la culture, la population des cellules LAK est

hétérogène et composée de cellules NK ($CD3^-CD56^+$), de cellules $CD3^+CD56^+$, et de cellules T ($CD3^+CD56^-$). Il a été montré que les sous-populations cellulaires $CD3^+CD56^+$ et $CD3^-CD56^+$ sont les cellules qui contribuent à l'activité cytolytique des cellules LAK (Phillips and Lanier 1986). Au cours des ans, il y a eu des modifications du protocole afin d'augmenter l'expansion des cellules LAK et leur activité cytotoxique. Ces modifications ont consisté à ajouter l'anticorps anti-CD3 (OKT3) au début de la culture pour mieux activer les cellules T, à prolonger la culture afin de favoriser une plus grande prolifération des cellules, et à ajouter diverses cytokines pour stimuler l'activité cytolytique des cellules (Ochoa, Gromo et al. 1987). Ces changements ont résulté en une meilleure prolifération des cellules LAK. De plus, des essais *in vivo* du potentiel cytotoxique des cellules LAK ont été effectués dans des modèles animaux. Il a été montré que l'injection des cellules LAK peut mener à la régression des tumeurs déjà établies dans les souris (Mazumder and Rosenberg 1984; Lafreniere and Rosenberg 1985). Aussi, il y a eu quelques essais cliniques qui ont été réalisés en utilisant les cellules LAK. Ces cellules ont montré une efficacité modeste contre des cancers métastatiques tels que le carcinome de cellules rénales et le mélanome (Rosenberg, Lotze et al. 1987).

IV- Les cellules tueuses induites par des cytokines

Les cellules tueuses induites par des cytokines (cytokine-induced killer = CIK) sont une population hétérogène utilisées pour l'immunothérapie chez les patients ayant différents types

de cancers hématopoïétiques et solides. Les cellules CIK seront décrites en détails dans la suite de cette quatrième partie, puisque c'est à partir de ces cellules que nous avons tenté de développer une nouvelle stratégie d'immunothérapie cellulaire contre la LAL.

IV. 1. Expansion et caractérisation des cellules tueuses induites par des cytokines

Les cellules CIK sont une population hétérogène de lymphocytes T polyclonaux amplifiées *ex vivo* qui possèdent des propriétés phénotypique et fonctionnelle à la fois de cellules T et NK. Comme les cellules LAK, elles sont amplifiées à partir de cellules mononucléées de sang périphérique (Schmidt-Wolf, Negrin et al. 1991; Lu and Negrin 1994; Baker, Verneris et al. 2001), et peuvent aussi être amplifiées à partir des cellules mononucléées de sang de cordon (Introna, Franceschetti et al. 2006) ou de moelle osseuse (Alvarnas, Linn et al. 2001). De plus, les cellules CIK peuvent être efficacement amplifiées à partir de sang de patients greffés, même durant un traitement d'immunosuppression (Sangiolo, Martinuzzi et al. 2008). Elles ont été générées pour la première fois par Schmidt-Wolf *et al* (Schmidt-Wolf, Negrin et al. 1991) en 1991 qui les ont amplifiées à partir de cellules mononucléées de sang périphérique. À la différence des cellules LAK qui sont cultivées seulement avec OKT3 et IL-2, les cellules mononucléées sont mises en présence d'IFN- γ , d'OKT3 et d'IL-2. Dans cette étude, ils ont montré que l'ajout d'OKT3 avec l'IL-2 permet d'amplifier massivement les cellules mononucléées, comparativement à l'ajout d'IL-2 seule. De plus, le moment de l'ajout de l'IFN- γ vis-à-vis de l'IL-2 est un point critique pour l'activité lytique des cellules CIK. L'IFN- γ doit être ajouté 24 heures avant l'IL-2 pour que les cellules CIK puissent tuer efficacement les cellules cibles, puisqu'en même temps ou 24 heures après l'IL-2, il n'y a

quasi plus d'activité cytotoxique de ces cellules. Aussi, l'addition de l'IFN- γ au premier jour de la culture permet d'agir indirectement sur la cytotoxicité et la prolifération des cellules CIK en stimulant les monocytes dans la culture. En effet, l'IFN- γ induit une activation des monocytes qui en retour permettent à la fois un contact cellulaire avec les cellules T par la molécule d'adhésion, le LFA-3 (lymphocyte function-associated antigen-3 = LFA-3), et la production de l'IL-12 (Hayes, Wang et al. 1995; Ma, Chow et al. 1996; Lopez, Waller et al. 2001). L'interaction par le LFA-3 et la production de l'IL-12 entraîne la différenciation des cellules CIK dans un phénotype Th1.

Après trois semaines de culture, il y a une augmentation de plus de 1000 fois des cellules CIK (Schmidt-Wolf, Negrin et al. 1991; Lu and Negrin 1994; Baker, Verneris et al. 2001). La prolifération et différenciation des cellules CIK sont effectuées comme schématisé dans la figure 1.6.

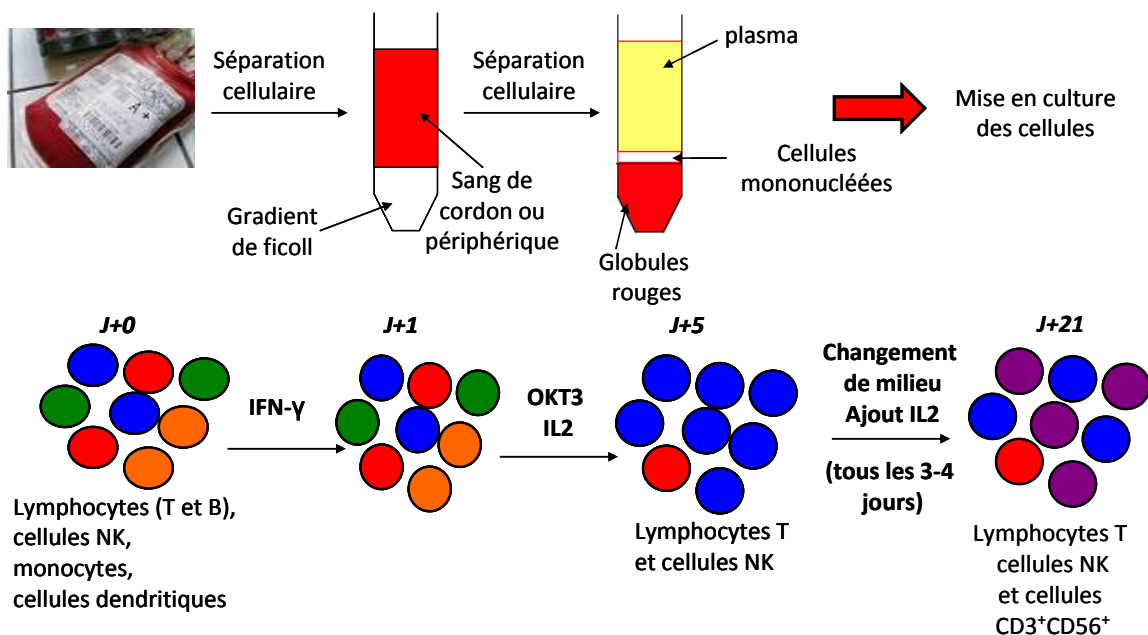


Figure 1.6 : Expansion et différenciation des cellules CIK.

Les cellules mononucléées provenant de sang de cordon ou de sang périphérique sont isolées à partir d'un gradient de Ficoll, puis mises en culture en présence d'IFN- γ à 1000 UI/mL (unité internationale = UI) à une concentration entre 0.8 et 1 million de cellules/mL. Après 24 heures d'incubation, l'IL-2 à 300 UI/mL et l'OKT3 à 50 ng/mL sont ajoutés à la culture. Après cinq jours d'activation, les cellules sont récoltées, comptées et remises en culture en présence seulement d'IL-2. Le milieu des cellules est changé tous les trois à quatre jours en ajoutant à chaque fois l'IL-2. La culture dure entre vingt et un à vingt-huit jours. À la fin de l'expansion des cellules CIK, il y a un mélange de trois sous-populations cellulaires que l'on peut caractériser par le marqueur des cellules T, la molécule CD3, et par celui des cellules NK, la molécule CD56. Les trois sous-populations cellulaires sont les suivantes : $CD3^+CD56^-$, $CD3^+CD56^+$ et $CD3^-CD56^+$. Au cours de la culture, il y a une augmentation de la sous-population cellulaire exprimant les 2 marqueurs, CD3 et CD56 (Introna, Franceschetti et al. 2006 et Figure 1.7).

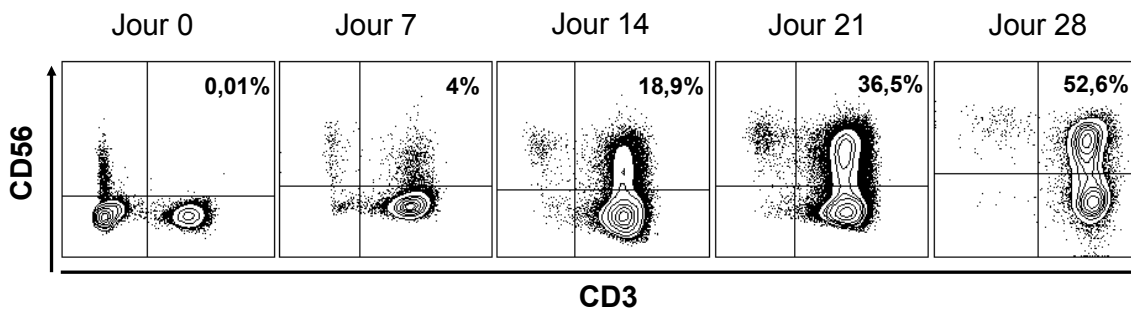


Figure 1.7 : Amplification et différenciation des cellules CIK.

Il a été montré que les cellules $CD3^+CD56^+$ proviennent des cellules T (Lu and Negrin 1994). En effet, ce sont les cellules T $CD3^+$ qui acquièrent le marqueur CD56, et non les cellules NK

CD56⁺ qui acquièrent le CD3. Par ailleurs, les cellules CIK possèdent une activité cytotoxique anti-tumorale de CMH non-restreint. Cette activité cytotoxique est associée avec la fraction CD56⁺ de la culture des cellules CIK (Lu and Negrin 1994; Sangiolo, Martinuzzi et al. 2008). La majorité des cellules CIK amplifiées exprime le marqueur CD8, mais il y a aussi une petite portion des cellules qui sont CD4⁺CD8⁻. Il y a aussi en très faible quantité des cellules doubles positives CD4⁺CD8⁺, et des cellules doubles négatives CD4⁻CD8⁻. Il a été montré que la sous-population cellulaire CD3⁺CD56⁺ présente un phénotype de cellules T effecteurs mémoires RA, dit cellules T EMRA (Franceschetti, Pievani et al. 2009). Elles expriment les marqueurs CD45RA, CD11a, CD27, mais pas les marqueurs CCR7, CD62L et CD28 (Franceschetti, Pievani et al. 2009; Linn, Lau et al. 2009). Il y a aussi d'autres marqueurs phénotypiques qui sont exprimés sur les cellules CIK, tels que HLA-DR, CD57, CD11b, et CD5. Par contre, elles n'expriment pas la molécule CD16 (récepteur des FcR), qui permet aux cellules NK d'effectuer le mécanisme de cytotoxicité cellulaire dépendant des anticorps (antibody-dependent cellular cytotoxicity = ADCC) (Ortaldo, Winkler-Pickett et al. 1991; Schmidt-Wolf, Lefterova et al. 1994). De plus, la sous-population cellulaire CD3⁺CD56⁺ est différente des cellules NKT (natural killer T) classiques, puisqu'elle est indépendante de la molécule CD1 (Gutgemann, Frank et al. 2007) pour son expansion et présente un répertoire polyclonal du TCR (Franceschetti, Pievani et al. 2009).

IV. 2. Mécanisme d'action des cellules tueuses induites par des cytokines.

Les cellules CIK possèdent une activité cytotoxique de CMH non-restreint contre différents types de cancers hématopoïétiques et solides.

Il a été montré tout d'abord que l'activité cytotoxique contre les différentes tumeurs est due principalement à la fraction CD56⁺ des cellules CIK, voir plus particulièrement à la sous-population CD3⁺CD56⁺ (Lu and Negrin 1994; Sangiolo, Martinuzzi et al. 2008). De plus, ce n'est pas le haut pourcentage de cellules CD8⁺ qui possèdent l'activité cytotoxique, puisque la fraction cellulaire CD3⁺CD56⁻CD8⁺ a une très faible activité lytique contre les tumeurs (Sangiolo, Martinuzzi et al. 2008). Ensuite, le mécanisme d'action des cellules CIK a été caractérisé par différentes équipes. Il a été observé dans un premier temps en utilisant des anticorps bloquants que les cellules CIK, plus particulièrement les cellules de la fraction CD56⁺, n'utilisent pas les molécules CD3, CD4, CD8, CD56, TCRαβ, CD11b, VLA-4 et CMH de classe I et II pour tuer les cellules tumorales (Schmidt-Wolf, Lefterova et al. 1993). Par contre, ces cellules utilisent les molécules d'adhésion ICAM-1 (intracellular cell adhesion molecule 1 = ICAM-1) et LFA-1 exprimées sur les cellules cibles et les cellules CIK respectivement. En effet, l'utilisation des anticorps inhibiteurs ICAM-1 et LFA-1 inhibent la lyse tumorale des cellules CIK (Schmidt-Wolf, Lefterova et al. 1993). Aussi, il a été montré que les cellules CIK ont la capacité de libérer les granules cytotoxiques (perforine et granzyme B) quand elles sont induites par un anticorps anti-CD3 ou par des cellules cibles (Mehta, Schmidt-Wolf et al. 1995). Les molécules perforine et granzyme B sont deux molécules situées dans les granules cytotoxiques. Elles sont sécrétées par les cellules effectrices T et NK. La perforine va s'introduire dans la membrane de la cellule cible et former des pores permettant ainsi aux différentes granzymes, dont la granzyme B, de rentrer dans la cellule cible et d'activer les caspases. Ces dernières, après activation, vont fragmenter l'ADN et entraîner la mort de la cellule (Trapani and Smyth 2002). Un traitement avec un analogue de l'AMP cyclique, le db-cAMP, (dibutyryl cyclic adenosine monophosphate),

lequel empêche LFA-1 d'avoir une forte affinité pour ICAM-1, inhibe la libération des granules cytotoxiques déclenchée par l'anticorps anti-CD3 ou les cellules cibles (Mehta, Schmidt-Wolf et al. 1995). Lors de l'activation des cellules T par le TCR, ce dernier entraîne la conversion de LFA-1 d'une affinité faible à une forte affinité à ICAM-1. Ce processus implique la transmission de signaux intracellulaire du TCR à LFA-1, et qui sont inhibés par l'ajout du db-cAMP (Dustin and Springer 1989). De plus dans cet article, les agents immunosuppresseurs utilisés chez les patients comme la cyclosporine et FK506 empêchent la libération de perforine et granzyme B lorsque les cellules CIK sont stimulées par l'anticorps anti-CD3, mais pas par les cellules cibles. Ceci permet de supposer qu'il y a probablement d'autres récepteurs qui peuvent permettre la libération des granules cytotoxiques par les cellules CIK. En effet, Verneris *et al* (Verneris, Karami et al. 2004) ont montré que la molécule NKG2D intervient dans l'activité cytotoxique des cellules CIK. La molécule NKG2D est un récepteur exprimé sur les cellules T CD8 de même que sur les cellules NK. Ce récepteur NKG2D reconnaît des ligands qui sont exprimés lors de stress cellulaire, d'infection des cellules, ou de transformation cellulaire. Ces ligands sont MICA, MICB, et les membres de la famille ULBP (UL16 binding proteins), et ils sont souvent retrouvés à la surface des cellules tumorales. Lors des essais de l'activité cytotoxique des cellules CIK, la présence d'anticorps inhibiteurs contre le récepteur NKG2D (natural killer group 2, member D) ou les ligands de NKG2D entraîne une forte inhibition de la lyse des cellules tumorales (Verneris, Karami et al. 2004). Ceci est même démontré lorsque les cellules CIK sont transduites par un siRNA-NKG2D (small interfering ribonucleic acid = siRNA), qui permet d'éliminer l'expression d'une molécule dans la cellule, ou par le test de cytotoxicité redirigé à travers le récepteur NKG2D au lieu de l'engagement du TCR (Verneris, Karami et al. 2004). En plus du

récepteur NKG2D, il peut y avoir l'implication d'autres molécules comme NKp30 et DNAM-1 (DNAX accessory molecule-1 = DNAM-1) (Pievani, Borleri et al. 2011), et aussi de la molécule TRAIL (Kuci, Rettinger et al. 2010). Les molécules NKp30 et DNAM-1 (DNAX accessory molecule 1) sont essentiellement exprimées sur les cellules NK et permettent de les activer lorsque des cellules cibles expriment les ligands. Leur activation entraîne la libération des granules cytotoxiques. Pour la molécule TRAIL, elle est exprimée sur les cellules NK et les cellules T, et va déclencher l'apoptose sur les cellules cibles qui expriment les récepteurs de TRAIL (DR4 et DR5).

IV. 3. Activité cytotoxique des cellules tueuses induites par des cytokines *in vitro* et *in vivo*

De multiples études ont été effectuées avec les cellules CIK afin de montrer leur potentiel cytotoxique contre un nombre varié de cellules cancéreuses hématopoïétiques et solides, aussi bien *in vitro* qu'*in vivo* dans des modèles murins (Schmidt-Wolf, Negrin et al. 1991; Kim, Lim et al. 2007; Kim, Lim et al. 2007; Wang, Yu et al. 2008; Wongkajornsilp, Somchitprasert et al. 2009; Kuci, Rettinger et al. 2010; Wang, Dai et al. 2011). Les cellules CIK sont capables de tuer des lignées de lymphome B humaines *in vivo* sans tuer les cellules précurseurs hématopoïétiques humaines (Schmidt-Wolf, Negrin et al. 1991). Ceci a résulté en l'augmentation de la survie des souris dont la majorité d'entre-elles ne montrent aucun signe de croissance tumorale après plus de 100 jours post-injection. Une autre étude a aussi démontré l'efficacité anti-tumorale des cellules CIK *in vivo* contre une lignée de lymphome B, tandis que les cellules LAK n'ont quasiment aucune efficacité contre cette lignée tumorale (Lu and Negrin 1994). La plupart des études effectuées avec les cellules CIK ont été réalisées

de façon allogénique, c'est-à-dire que les cellules CIK et les cellules tumorales ne proviennent pas de la même source. De ce fait, d'autres études ont été effectuées pour montrer que les cellules CIK sont capable d'avoir une activité cytotoxique contre des blastes LMC autologues aussi bien *in vitro* qu'*in vivo* dans les souris SCID (Hoyle, Bangs et al. 1998; Alvarnas, Linn et al. 2001). De plus, les cellules CIK sont sécuritaires contre les cellules autologues de MO, malgré un certain degré de cytotoxicité contre des cellules allogéniques de MO, toutefois très faible comparé à la cytotoxicité contre les cellules tumorales (Verneris, Ito et al. 2001). Dans cette étude, les auteurs ont observé aussi que l'activité cytotoxique des cellules CIK est indépendante de la voie FasL, puisque les cellules CIK provenant d'une lignée de souris déficiente en FasL peuvent toujours éliminer les cellules tumorales *in vivo*. Par contre, celles provenant de la souche de souris déficiente en perforine n'ont plus d'activité cytotoxique contre les cellules tumorales (Verneris, Ito et al. 2001). Enfin plus récemment, il a été montré que les cellules CIK injectées dans les souris migrent au site tumoral (Nishimura, Baker et al. 2008). En effet, grâce à la technique de bioluminescence qui permet de suivre les cellules injectées dans un animal, la migration des cellules CIK a pu être observée *in vivo* et il a été montré que celles-ci se localisent au niveau du site tumoral. De plus, au cours du temps après l'injection des cellules CIK, il y a une régression de la tumeur dans la souris (Nishimura, Baker et al. 2008).

IV. 4. Effet de la maladie du greffon contre l'hôte des cellules tueuses induites par des cytokines

Un des avantages des cellules CIK pour leur utilisation en immunothérapie est que ces cellules ne déclenchent pas ou pratiquement pas de GVHD. En effet, une étude qui a étudié *in*

in vitro l'alloréactivité des cellules CIK (Sangiolo, Martinuzzi et al. 2008), a montré que les cellules CIK peuvent tuer efficacement les cellules tumorales, mais n'ont aucun effet sur des fibroblastes humains et des PBMC ayant un HLA différent. De plus, un test de réaction lymphocytaire (mixed lymphocyte reaction = MLR) a été effectué dans cette même étude. Ce test consiste à mettre les cellules CIK avec des PBMC de HLA différent, et de voir si elles peuvent reconnaître ces PBMC, ce qui par conséquent entraînera leur prolifération. Les cellules CIK comprenant les trois sous-populations cellulaires, prolifèrent face à des PBMC allogéniques (Sangiolo, Martinuzzi et al. 2008). Il a été déterminé que c'est la fraction cellulaire CD56⁻ (les cellules T CD3⁺CD56⁻) qui prolifèrent et réagissent contre les PBMC allogéniques, et non la fraction cellulaire CD56⁺ (les cellules CD3⁺CD56⁺ et CD3⁻CD56⁺) qui ne prolifèrent aucunement. De ce fait, ceci montre que c'est bien la fraction cellulaire CD56⁻ des cellules CIK qui est alloréactive face à des cellules normales, mais pas la fraction cellulaire CD56⁺ (Sangiolo, Martinuzzi et al. 2008). Ce résultat est intéressant, puisqu'il a été démontré que la fraction cytotoxique est la fraction cellulaire CD56⁺ de la culture des cellules CIK (Lu and Negrin 1994; Sangiolo, Martinuzzi et al. 2008). Aussi, l'alloréactivité des cellules CIK a été étudié *in vivo* (Baker, Verneris et al. 2001). Il a été montré que lors de l'amplification des cellules CIK, il y a une production de cytokines de type Th1 avec de grandes quantités d'IFN- γ et de TNF- α .

L'IFN- γ a des effets immunosuppresseurs, et des études montrent que l'administration exogène de cette cytokine peut empêcher la GVHD lors de transplantation de MO chez la souris (Brok, Vossen et al. 1998). Cependant, des études ont analysé le rôle de la production de l'IFN- γ dans l'induction de la GVHD et ont montré que son rôle est complexe et dépend du moment de son administration et de la quantité injectée (Szebeni, Wang et al. 1994; Brok, Vossen et al.

1997). En effet, quand l'IFN- γ est injecté tardivement, il y a une GVHD intense, tandis que lorsqu'il est injecté précocement, il y a un effet protecteur contre la GVHD (Brok, Vossen et al. 1998; Yang, Dey et al. 1998). Il a aussi été montré que l'IFN- γ peut inhiber l'induction de la GVHD induite par les cellules T CD4 du donneur (Welniak, Blazar et al. 2000). Similairement, l'IFN- γ inhibe aussi la GVHD induite par les cellules T CD8 du donneur (Yang, Qi et al. 2002; Asavaroengchai, Bronson et al. 2003). En complément, des études montrent que la protection de la GVHD peut être médiée par un traitement d'IL-12 (Sykes, Szot et al. 1995; Yang, Sergio et al. 1997) ou d'IL-18 (Reddy, Teshima et al. 2001; Reddy, Teshima et al. 2002). Ces deux cytokines sont des inducteurs favorisant la production d'IFN- γ . Ces études sur l'inhibition de la GVHD par l'IL-12 et l'IL-18 révèlent que l'IFN- γ peut diminuer les réponses de GVH en favorisant l'apoptose par Fas des cellules T activées du donneur (Reddy, Teshima et al. 2002; Dey, Yang et al. 1998). Ceci est supporté par l'observation que l'IFN- γ est nécessaire pour la réduction de cellules T activées du donneur induites par l'IL-12 (Yang, Dey et al. 1998). De plus, une étude fournit une preuve directe démontrant le rôle de l'IFN- γ en stimulant l'apoptose des cellules T du donneur. Dans cette étude, l'apoptose des cellules T du donneur est significativement inhibée dans des receveurs transplantés par un donneur déficient en IFN- γ comparé à ceux recevant un donneur non déficient en IFN- γ (Asavaroengchai, Bronson et al. 2003). Aussi, l'IFN- γ peut intervenir dans la prolifération des cellules T du donneur en empêchant la baisse de l'expression de p27^{Kip1} induite par les facteurs de croissance (Takami, Takuwa et al. 2002). En effet, p27^{Kip1} joue un rôle critique en contrôlant la prolifération des cellules T, et l'absence d'expression de p27^{Kip1} résulte dans une augmentation du nombre de cellules T (Kiyokawa, Kinema et al. 1996; Nakayama, Ishida et al. 1996). Une autre étude montre aussi que le blockage de PD-1

(molécule impliquée dans l'anergie des cellules) inhibe la prolifération des cellules T CD4 par un mécanisme dépendant de l'IFN- γ (Yamazaki, Akiba et al 2005). Il est important de noter que l'ensemble des études a été réalisé dans la souris, et que ceci peut être différent chez l'Homme.

Ainsi la production de l'IFN- γ par les cellules CIK permet de comprendre l'importance de cette cytokine et pourquoi les cellules CIK n'induisent pas ou peu d'effet GVH. En effet, l'injection de cellules CIK dans un modèle de souris n'induit presque pas de GVHD comparé à l'injection de splénocytes (Baker, Verneris et al. 2001). Cette réduction de GVHD des cellules CIK est liée à la production d'IFN- γ , puisque les cellules CIK amplifiées à partir de cellules de souris déficientes en IFN- γ provoquent une GVHD (Baker, Verneris et al. 2001). Par ailleurs, l'effet GVHD des cellules CIK a été observé en utilisant la technique de bioluminescence afin de visualiser la migration des cellules CIK lorsqu'elles sont injectées dans un modèle de souris (Nishimura, Baker et al. 2008). Dans cette étude, les auteurs ont montré que les cellules CIK migrent aux mêmes sites que les cellules T provoquant une GVHD, mais avec une infiltration de ces sites plus faible et de façon transitoire. De plus, il a été observé que les cellules CIK se multiplient plus faiblement, ont une susceptibilité plus importante à l'apoptose, et ont une réduction des molécules de migration permettant l'entrée dans les organes cibles de GVHD lorsque comparé aux splénocytes (Nishimura, Baker et al. 2008).

IV. 5. Amélioration de l'amplification et de l'activité cytotoxique des cellules tueuses induites par des cytokines

De nombreuses études ont été effectuées afin d'améliorer l'amplification et/ou l'activité cytolytique des cellules CIK. Parmi ces différentes études, il y a celles qui testent d'autres cytokines que l'IL-2 pour amplifier les cellules CIK, celles qui utilisent des anticorps monoclonaux ou bispécifiques pour améliorer l'activité cytotoxique, et celles qui cultivent les cellules CIK avec les DC.

Il a été observé que les cellules CIK peuvent être cultivées avec l'IL-7, et que leur prolifération est comparable voir plus importante par rapport à l'IL-2 (Zoll, Lefterova et al. 1998). De plus, lorsque les cellules CIK sont transduites avec le gène de l'IL-7, permettant aux cellules de produire de façon constitutive cette cytokine, il y a une augmentation du taux de prolifération des cellules CIK et une amélioration de leur activité cytolytique (Finke, Trojaneck et al. 1998). L'IL-2 a aussi été remplacé par l'IL-15 afin de visualiser s'il y a une amélioration de la prolifération et/ou de l'activité cytotoxique. Il est connu que l'IL-15 joue un rôle majeur dans la survie des cellules NK, les cellules NKT et les cellules T CD8 mémoires, et elle intervient aussi dans la différenciation et l'activation des cellules NK (Ku, Murakami et al. 2000). Il a été montré que l'expansion des cellules CIK par l'IL-15 peut augmenter l'activité cytotoxique contre différentes cellules tumorales (Rettinger, Kuci et al. 2012; Rettinger, Meyer et al. 2012). Une autre étude a montré que la culture des cellules CIK peut être effectuée en utilisant la thymoglobuline au lieu de l'OKT3 (Bonanno, Iudicone et al. 2010). La thymoglobuline est une préparation de gammaglobulines polyclonales qui sont spécifiques contre les thymocytes. L'utilisation de la thymoglobuline à des concentrations intermédiaires ou élevées permet une amélioration de la prolifération des cellules CIK

comparé à l'OKT3 (Bonanno, Iudicone et al. 2010). Un autre groupe a analysé l'action de l'IL-6 sur la différenciation des cellules CIK (Lin, Wang et al. 2012). Cette cytokine est ajoutée en même temps que l'IFN- γ , au premier jour de culture des cellules CIK. Il a été observé que l'IL-6 peut augmenter la prolifération et l'activité cytotoxique des cellules CIK, due probablement à la diminution des cellules T régulatrices dans la culture (Lin, Wang et al. 2012). Une autre équipe a ajouté l'anticorps anti-CD137 dans la culture des CIK en même temps qu'est ajouté l'IL-2 (Zhu, Ju et al. 2009). L'anticorps anti-CD137 reconnaît le récepteur CD137. Ce récepteur est retrouvé sur les cellules NK, les cellules T et les DC (Kwon, Tan et al. 1997; Wilcox, Chapoval et al. 2002). L'interaction du CD137 avec son ligand entraîne un signal de co-stimulation qui résulte en la prolifération des cellules T et des cellules NK. L'ajout de l'anticorps anti-CD137 dans la culture des CIK a permis d'améliorer l'activité cytotoxique de la sous-population cellulaire CD3⁺CD56⁺ (Zhu, Ju et al. 2009).

D'autres études ont été réalisées en utilisant des anticorps monoclonaux comme l'anticorps anti-CD20 (Pievani, Belussi et al. 2011), ou des anticorps bispécifiques qui reconnaissent les cellules CIK et la cellule cible (Lefterova, Marten et al. 2000; Kornacker, Verneris et al. 2006; Tita-Nwa, Moldenhauer et al. 2007). Il a été montré que la combinaison des cellules CIK avec l'anticorps anti-CD20 (rituximab) peut augmenter la lyse des cellules de lymphome B (Pievani, Belussi et al. 2011). Dans cette étude, il a été démontré que c'est la sous-population cellulaire CD3⁻CD56⁺ qui tue plus efficacement les cellules tumorales du fait de leur expression du récepteur CD16. Ce récepteur reconnaît les fragments constants (Fc) des anticorps, donc dans ce cas-ci l'anticorps anti-CD20 qui est fixé sur les cellules de lymphome B. Pour les études avec les anticorps bispécifiques, des études ont été faites sur l'anticorps bispécifique qui reconnaît les récepteurs CD3 et CD19 (Lefterova, Marten et al. 2000) et

l'anticorps bispécifique qui reconnaît les récepteurs CD5 et CD19 (Tita-Nwa, Moldenhauer et al. 2007). Pour le premier (anti-CD3 et CD19), la partie anti-CD3 se fixe sur les cellules CIK qui sont CD3⁺, et la partie anti-CD19 reconnaît les cellules cibles exprimant ce récepteur comme les cellules leucémiques. Pour le second (anti-CD5 et CD19), la partie anti-CD5 reconnaît les sous-populations cellulaires CD3⁺CD56⁻ et CD3⁺CD56⁺. Ces deux types d'anticorps permettent aux cellules CIK de lyser plus efficacement les cellules tumorales exprimant le récepteur CD19, dont les cellules leucémiques et les lymphomes B.

Enfin, pour améliorer l'activité cytotoxique des cellules CIK, plusieurs études ont été effectuées en utilisant les DC (Marten, Ziske et al. 2001; Ziske, Marten et al. 2001). Les DC chargées avec des antigènes tumoraux ont été cultivées avec les cellules CIK afin d'améliorer la reconnaissance des cellules tumorales et leur destruction. Une étude a montré la faisabilité de cette approche dans le cancer multiple de myélome (MM) où les DC sont chargées avec des idiotypes dérivés de MM avant de les mettre avec les cellules CIK (Marten, Renoth et al. 2001). Aussi, les cellules tumorales de carcinome pancréatique, résistantes aux cellules CIK, sont devenues sensibles aux cellules CIK lorsque ces dernières sont cultivées avec des DC chargées par l'ARN (acide ribonucléique) tumorale et le peptide CA19-9 (Ziske, Marten et al. 2001).

IV. 6. Essais cliniques des cellules tueuses induites par des cytokines

Les cellules CIK peuvent être générées facilement à partir de donneurs sains, de même que de patients avec des types de cancer différents et traitées par chimiothérapie (Alvarnas, Linn et al. 2001). De plus, il est très facile d'amplifier les cellules CIK à partir de sang de cordon ou de restant d'unité de sang de cordon qui a été injectée au patient (Introna, Franceschetti et al.

2006). Plusieurs essais cliniques de phase I et II destinés à tester la toxicité et l'efficacité des cellules CIK ont été rapportés. Ces essais cliniques ont été réalisés sur de petits nombres de patients avec des cancers différents aussi bien hématologiques que solides. Un site d'information sur le réseau internet a été créé afin de rassembler les différents essais cliniques qui ont été effectués avec les cellules CIK (www.cik-info.org). L'ensemble de ces études est rapporté dans le tableau 1.1.

Tumor entity	Reference	Total number of patients treated with CIK cells
Acute leukemia (AML / ALL)	Introna et al. Jiang H et al.	20
Acute myelogenous leukemia (AML)	Introna et al.	4
Breast cancer	Chen et al.	5
Chronic myelomonocytic leukemia (CML)	Introna et al.	1
Colorectal carcinoma	Schmidt-Wolf et al.	7
Esophageal squamous carcinoma	Chen et al.	11
Gastric cancer	Jiang J et al. Chen et al. Jiang JT et al.	146
Hodgkin lymphoma (HL)	Leemhuis et al. Introna et al. Huang et al.	13
Lung cancer	Chen et al. Zhao et al.	46
Multiple Myeloma	Lin et al.	1

Myelodysplasia	Introna et al.	2
Non-Hodgkin lymphoma (NHL)	Schmidt-Wolf et al. Leemhuis et al. Huang et al.	23
Primary hepatocellular carcinoma (HCC)	Chen et al. ; Hui et al. Shi et al. ; Weng et al. Zhang et al. ; Zhou et al.	250
Renal cell carcinoma (RCC)	Schmidt-Wolf et al. Lei et al. Wang et al.	29
Rhabdomyosarcoma	Chen et al.	2
Other tumors	Chen et al.	12
Total number of patients		672

Tableau 1.1 : Essais cliniques utilisant les cellules CIK selon le type de cancer et avec le nombre de patients inclus

La première étude clinique avec les cellules CIK a été réalisée en 1999 par Schmidt-Wolf *et al.* Dans cette étude, les auteurs ont utilisé des cellules CIK autologues transfectées avec le gène de l'IL-2. Ces cellules ont été infusées dans dix patients ayant soit un carcinome rénal métastatique, un cancer colorectal ou un lymphome (Schmidt-Wolf, Finke et al. 1999). Il n'y a pas eu d'effet majeur de toxicité des cellules CIK, excepté pour trois patients qui ont développé de la fièvre, mais seulement de façon transitoire. Concernant les résultats cliniques de cette étude, sur les dix patients, six sont demeurés en maladie progressive, trois n'ont montré aucun changement, et un a développé une réponse complète. Pour ce dernier patient, aucune précision n'est spécifiée sur la durée de la réponse complète. Une étude clinique de phase I a aussi été réalisée chez des patients en rechute ayant eu une TCSH (Introna, Borleri

et al. 2007). Dans cet essai, onze patients rechutant de leur cancer hématopoïétique ont reçu une infusion de cellules CIK de donneurs allogéniques. L'étude a montré la faisabilité et la faible toxicité de l'injection des cellules CIK. Parmi les onze patients, six ont eu une progression de la maladie et sont décédés par la suite, un a été en maladie stable, un a eu une amélioration de la maladie et trois autres ont développé une réponse complète. Parmi les patients qui ont développé une réponse, la survie a été prolongée plus de huit cent jours. Une autre étude a été effectuée chez douze patients avec des lymphomes réfractaires et des tumeurs solides métastatiques (Olios, Giancola et al. 2009). Ces patients ont été infusés avec des cellules CIK autologues c'est-à-dire amplifiées à partir de leur propre sang périphérique. Après l'infusion des cellules CIK, ils ont observé chez les patients une augmentation du nombre de lymphocytes, $CD3^+$, $CD8^+$ et $CD3^+CD56^+$. Il n'a eu aucun effet toxique des cellules CIK à part de la fièvre chez deux patients. De plus, sur les douze patients traités avec les cellules CIK, trois ont eu une réponse complète et deux sont demeurés en maladie stable, avec une moyenne de taux de survie de trente-trois mois. Un essai clinique a été réalisé en utilisant des cellules CIK différenciées à partir de restant d'unité de sang de cordon (Introna, Pievani et al. 2010). Dans cette étude, cinq patients transplantés avec des CSH de sang de cordon et rechutant de la leucémie (LAL ou LAM) ont été infusés avec des cellules CIK de sang de cordon. Cet essai a montré la faisabilité et l'absence de toxicité de l'utilisation des cellules CIK chez des patients après transplantation. Parmi les cinq patients, un a eu une réponse partielle tout en développant une GVHD. Dans deux autres études cliniques, l'immunothérapie de cellules CIK allogéniques a été montrée à être applicable et non toxique chez des patients ayant eu une TCSH allogénique (Laport, Sheehan et al. 2011; Linn, Niam et al. 2012). Ils ont montré que les cellules CIK allogéniques injectées chez ces patients

rechutant de leur cancer hématologique sont très peu toxiques. Sur les trente quatre patients, cinq ont développé une GVHD aiguë et un a eu une GVHD chronique. Le taux de survie chez les patients ayant des réponses est en moyenne de plus de deux ans pour ces deux études cliniques. Des essais cliniques ont aussi été effectués chez des patients avec des tumeurs solides, comme par exemple le cancer gastrique, le cancer rénal et le mélanome (Shi, Zhou et al. 2012; Zhang, Zhu et al. 2012). L'injection des cellules CIK est sécuritaire et permet une amélioration des signes cliniques chez les patients traités. D'autres essais cliniques ont utilisé les cellules CIK en combinaison avec une chimiothérapie chez des patients ayant soit un carcinome du nasopharynx ou diverses tumeurs solides (Niu, Wang et al. 2011; Li, Gu et al. 2012). Ils ont montré que la combinaison des cellules CIK avec la chimiothérapie augmente la survie des patients de plusieurs mois (inférieur à un an) comparativement aux patients traités avec la chimiothérapie seule. Une autre étude clinique a testé la combinaison des cellules CIK avec une chimiothérapie chez des patients ayant un cancer du poumon (Yang, Ren et al. 2013). À la différence des autres études, ils ont utilisé des cellules CIK activées par des DC chargées avec des lysats tumoraux. Ils ont observé une amélioration des signes cliniques chez les patients traités avec cette combinaison. Pour finir, un essai clinique a été réalisé en infusant en même temps des cellules CIK et des DC chargées avec un peptide spécifique en synergie avec une chimiothérapie chez des patients atteints d'un cancer du poumon (Zhong, Teng et al. 2011). L'étude a montré que ce type de traitement peut diminuer les effets indésirables de la chimiothérapie conventionnelle et aussi augmente la survie des patients de seulement quelques mois (six mois maximum).

En résumé, les divers essais cliniques utilisant les cellules CIK comme immunothérapie montrent la faisabilité de cette approche aussi bien sur des tumeurs hématopoïétiques que

solides. L'injection de ces cellules entraîne peu d'effet de toxicité, surtout au niveau de la GVHD où il n'y en a pas dans la plupart des patients. La source des cellules CIK peut être aussi bien autologue ou allogénique, avec plusieurs cycles d'injection (trois au minimum) atteignant au total le milliard de cellules injectées. Au cours du traitement, une augmentation des cellules dans le sang a été observée, en particulier les cellules CD8⁺ et les cellules CD3⁺CD56⁺. Quant à l'efficacité des cellules CIK à éliminer les cellules tumorales, les réponses sont très variables allant de non-réponses à des réponses complètes. Aussi, la durée des réponses cliniques varie d'un patient à un autre, et d'une étude à une autre, pouvant aller d'une augmentation de survie de quelques mois à plusieurs années.

IV. 7. Les cellules tueuses induites par des cytokines dans le cadre de la leucémie aiguë lymphoblastique

Quelques études ont été réalisées dans le but d'analyser l'activité cytotoxique des cellules CIK contre la LAL. En 2002, il y a eu une première étude (Linn, Lau et al. 2002) dans laquelle les auteurs ont amplifié les cellules CIK à partir de sang de patients atteints de LAL et de LAM et ont testé leur efficacité cytolytique contre des blastes autologues et allogéniques. Ils ont montré que les cellules CIK issues de patients avec une LAM ou LAL peuvent tuer efficacement les blastes LAM de façon autologues et allogéniques. Par contre elles tuent très faiblement les blastes LAL que ces derniers soient autologues ou allogéniques. C'est la première étude qui montre un échec de l'activité cytotoxique des cellules CIK sur des cellules tumorales. Par la suite, quelques équipes ont essayé d'améliorer l'activité des cellules CIK contre les cellules LAL (Marin, Dander et al. 2006; Marin, Kakuda et al. 2007; Laurin, Marin et al. 2010; Rettinger, Kuci et al. 2012). Il y a eu l'introduction du CAR-CD19 dans les

cellules CIK (Marin, Dander et al. 2006; Marin, Kakuda et al. 2007; Laurin, Marin et al. 2010). Ils ont observé une augmentation de l'activité cytotoxique des cellules CIK vis-à-vis des lignées cellulaires pré-B LAL et de blastes pré-B LAL de patients. De plus, l'activité cytotoxique des cellules CIK est spécifique contre seulement les cellules cibles exprimant le récepteur CD19, et cette activité fait intervenir la voie de perforine et granzyme B par la dégranulation. Une autre équipe a modifié le protocole d'amplification des cellules CIK en utilisant l'IL-15 au lieu de l'IL-2 (Rettinger, Kuci et al. 2012). Ils ont observé une augmentation de l'activité cytotoxique des cellules CIK contre des lignées leucémiques aussi bien LAM, lymphome B que LAL. Ils ont montré aussi que le récepteur NKG2D est impliqué dans la reconnaissance des cellules cibles, et que c'est principalement la fraction CD56⁺ qui intervient dans l'activité cytotoxique comme déjà décrit précédemment. De plus, la même équipe a démontré *in vivo* dans un modèle de souris immunodéficiente (NOD/SCID/ γ c-) que les cellules CIK amplifiées avec l'IL-15 au lieu de l'IL-2 ont un potentiel d'activité cytotoxique contre la LAM et le rhabdomyosarcome, sans induire de GVHD (Rettinger, Meyer et al. 2012).

V- Objectifs

1) Améliorer l'activité des cellules CIK vis-à-vis des cellules pré-B LAL afin de développer une nouvelle immunothérapie cellulaire.

2) Déterminer le mécanisme d'action des cellules CIK de sang de cordon et de sang périphérique contre les cellules pré-B LAL.

3) Déterminer l'influence de la voie Fas/FasL sur les cellules CIK.

VI- Hypothèses

1) L'utilisation de la fraction CD56⁺ des cellules CIK et la stimulation par l'interféron alpha (IFN- α) augmenteraient l'activité cytotoxique des cellules CIK contre les cellules pré-B LAL *in vitro* et *in vivo*.

2) Les cellules CIK de sang de cordon et de sang périphérique n'utiliseraient pas toujours majoritairement la voie NKG2D pour lyser les cellules pré-B LAL. Des mécanismes d'action différents pourraient intervenir, selon la source de provenance des CIK.

3) Les cellules CIK pourraient être sensibles à l'apoptose par la voie Fas. Cette sensibilité pourrait affecter leur action cytotoxique sur les cellules tumorales.

CHAPITRE 2

Introduction du deuxième chapitre

Puisque l'utilisation du sang de cordon est de plus en plus utilisée dans les TCSH chez les patients pédiatriques en raison de leur faible risque de GVHD par rapport à l'utilisation du sang périphérique (Dalle, Duval et al. 2004), nous avons choisi cette source afin de développer une nouvelle approche d'immunothérapie contre la pré-B LAL. De plus, les cellules CIK peuvent être facilement différenciées *in vitro* à partir de cellules mononucléées du sang de cordon (Introna, Franceschetti et al. 2006). Par ailleurs, étant donné la faible cytotoxicité des cellules CIK contre les cellules pré-B LAL, nous avons voulu combiner l'immunothérapie par les cellules CIK avec le traitement d'une cytokine. Nous avons donc testé si l'activité cytotoxique des cellules CIK peut être augmentée par une cytokine comme déjà observé par d'autres auteurs (Zhu, Ju et al. 2009; Lin, Wang et al. 2012). De ce fait, les cellules CIK ont été traitées avec l'IFN alpha (IFN- α) à la fin de la période d'expansion cellulaire. Nous utilisons cette cytokine car il a été démontré qu'elle est impliquée dans l'activation et la fonction à la fois des cellules NK (Swann, Hayakawa et al. 2007) et des cellules T (Lehtonen, Lund et al. 2003). Enfin, sachant que l'activité cytotoxique est assurée par la fraction CD56⁺ des cellules CIK (Schmidt-Wolf, Lefterova et al. 1993; Sangiolo, Martinuzzi et al. 2008), la fraction CD56⁻ est éliminée avant de tester l'activité lytique contre les cellules pré-B LAL. Nous avons effectué diverses expériences *in vitro* et *in vivo* dans un modèle murin xénogénique. Ce modèle est élaboré en utilisant les souris NSG, hautement immunodéficiente en raison de l'absence de cellules T, B et NK. Pour la totalité de ces expériences, nous avons toujours utilisé la fraction CD56⁺ des cellules CIK en combinaison avec le traitement à l'IFN- α . Ce chapitre nous permettra donc de déterminer si une immunothérapie avec les cellules CIK combinée au traitement avec l'IFN- α est efficace.

Human interferon-alpha increases the cytotoxic effect of CD56⁺ cord blood-derived cytokine-induced killer cells on human B-acute lymphoblastic leukemia cell lines

Running title: hIFN- α -stimulated-CD56⁺ CB-CIK cells against B-ALL

Ludovic Durrieu^{1,2}; Joëlle Gregoire-Gauthier^{1,2}; Mame Massar Dieng¹; François Fontaine¹; Françoise Le Deist^{1,2,3} and Elie Haddad^{1,2,3}

¹CHU Sainte-Justine Research Center, Center of Cancerology Charles-Bruneau, Montreal, Quebec, Canada

²Department of Microbiology and Immunology, University of Montreal, Montreal, Quebec, Canada

³Department of Paediatrics, University of Montreal, Montreal, Quebec, Canada

Keywords: B-lineage acute lymphoblastic leukemia, cytokine-induced killer cells, graft-versus-host disease, graft-versus-leukemia, human interferon-alpha.

[**Status:** published in *Cytotherapy*: 2012 Nov; 14(10):1245-57]

Abstract

Background aims: Cytokine-induced killer (CIK) cells may represent a promising immunotherapy for the treatment of children with relapsing B-lineage acute lymphoblastic leukemia (B-ALL) following hematopoietic stem cell transplantation (HSCT). Therefore, we investigated the possibility of combining adoptive immunotherapy with CIK cells and human interferon-alpha (hIFN- α), in order to potentiate the cytotoxicity of CIK cells against B-ALL.

Methods: Cord blood-derived CIK (CB-CIK) cells were differentiated, stimulated with phosphate-buffered saline (PBS) or hIFN- α , and tested for cytotoxic activity. We tested the anti-leukemic and the graft-versus-host disease (GvHD) effects of CB-CIK cells in a human xenograft NOD/SCID/ γc^- (NSG) mouse model.

Results: Bulk CB-CIK cells showed very moderate cytotoxic activity while the subpopulation of CD56⁺ CB-CIK cells showed significant cytotoxic activity against B-ALL cells. hIFN- α significantly augmented the cytotoxicity of CD56⁺ CB-CIK cells *in vitro* and induced signal transducer and activator of transcription-1 (STAT1) phosphorylation. In addition, CD56⁺ CB-CIK cells could significantly delay mouse mortality *in vivo*, and this effect was enhanced significantly by hIFN- α , (p=0.022). Furthermore, unlike CB mononuclear cells or peripheral blood mononuclear cells (PBMC), CD56⁺ CB-CIK cells, alone or stimulated with hIFN- α , caused either no GvHD or mild GvHD, respectively, when injected into sublethally irradiated NSG mice.

Conclusions: CD56⁺ CB-CIK cells are effective cytotoxic agents against human B-ALL cell lines *in vitro* and possess anti-leukemic activity that is potentiated by hIFN- α in an NSG mouse model *in vivo*. These pre-clinical data support the testing of this immunotherapeutic approach in the clinic for the treatment of B-ALL.

Introduction

Precursor B-cell acute lymphoblastic leukemia (B-ALL) is the most common form of leukemia in children (1). While chemotherapy has been used successfully to cure the majority of affected patients (2), hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) is the only treatment option for relapsing children (3). More and more, unrelated cord blood (CB) transplants are being used to treat children with B-ALL (4). The advantages of using CB, compared to other cell sources, include its immediate availability, the use of non-human leukocyte antigen (HLA)-matched human CB and a decreased risk of graft-versus-host disease (GvHD) (5). Patients relapsing after HSCT are often refractory to therapy, which usually leads to death within months. In these cases, the development of an optimized immunotherapeutic strategy would be of great clinical benefit. The most commonly used immunotherapy following allogeneic transplantation is donor lymphocyte infusion (DLI) (6). Although DLI can be used to prevent leukemic relapse, this therapy is associated with a high risk of GvHD (7), is not effective in relapsing B-ALL patients (8, 9), and is not available after CB transplantation. These limitations prompted many researchers to investigate the use of cytokine-induced killer (CIK) cells as a potential immunotherapy in order to achieve an anti-leukemic effect without triggering GvHD.

CIK cells have been described and characterized by Schmidt-Wolf *et al* (10, 11) as a heterogeneous population of *ex vivo*-expanded polyclonal T lymphocytes, which share a natural killer (NK) phenotype and properties. They can be generated *in vitro* by culturing peripheral blood mononuclear cells (PBMC) in the presence of interferon (IFN)-gamma (IFN- γ), and subsequently with anti-CD3 antibody (OKT3) and interleukin-2 (IL-2). CIK cells can be readily amplified over a 3-week period from various sources, including peripheral blood

(PB), bone marrow (BM) and more recently from CB (12). PB-CIK cells have been shown to be highly efficacious cytotoxic effector cells against several tumour types *in vitro* and *in vivo*, including primary B lymphoma (13), lymphoma cell lines (14), human cervical carcinoma (15) as well as cholangiocarcinoma (16). In addition, studies have demonstrated the weak alloreactivity of PB-CIK cells *in vitro* (17) and their low GvHD potential in murine GvHD models (18, 19). Thus far, promising data from phase I clinical trials suggests that infusion of autologous PB-CIK cells is well tolerated and does not cause severe adverse events in patients with advanced lymphomas, metastatic kidney carcinoma or hepatocellular carcinoma, while suggesting potential clinical efficacy (20). Similar results have been reported for relapsing patients with various hematologic malignancies (although there were only two patients with B-ALL included in these trials) post-HSCT treated with allogeneic PB-CIK cells (21, 22). However, *in vitro* B-ALL cells appear to be more resistant to lysis mediated by PB-CIK cells compared with acute myeloid leukemia (AML) cells (23, 24).

Human (h) IFN-alpha (hIFN- α), a member of the type 1 family of interferons, is produced in response to infection by a variety of cell types, including dendritic cells (DC). Previous studies have shown that hIFN- α is involved in the activation and function of both NK (25) and T cells (26). Furthermore, it has been used as an adjuvant in DC-based cancer vaccines (27). hIFN- α has also been used successfully in various clinical studies for the treatment of patients with metastatic melanoma (28), chronic myeloid leukemia (29) and acute lymphoblastic leukemia (30, 31). These findings suggest that hIFN- α could enhance the anti-tumor effect of CIK cells, hence causing them to kill B-ALL cells more effectively. Therefore, in this study we have investigated the effect of combining adoptive immunotherapy of CB-CIK cells with hIFN- α against B-ALL cells.

Methods

Mice

NOD/LtSz-*scid*IL-2rg^{-/-} mice were obtained from the Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA) and bred in the animal care facility at the CHU Sainte-Justine Research Centre (Montreal, Canada). The mice were housed under specific pathogen-free conditions in sterile ventilated racks. All the procedures had been approved previously by the Institutional Committee for Good Laboratory Practices for Animal Research (GLPAR), as per their research protocols (SST08-43 and SST10-39).

Cells

The human B cell precursor leukemia cell lines (697, REH, and NALM-6; DSMZ, Braunschweig, Germany) and K562 cells (used as a positive control in cytotoxicity assays; ATCC, Manassas, VA, USA) were maintained in RPMI-1640 medium supplemented with 2 mM L-glutamine (Life Technologies, Burlington, Canada) and 10% fetal bovine serum (FBS; Life Technologies).

Generation of CB-CIK cells

CB units were obtained from the CHU Sainte-Justine Research cord blood bank, with approval from the ethics committee. Cord blood mononuclear cells (CBMC) were isolated from CB by Ficoll-PaquePLUS (GE Healthcare Bio-Science AB, Uppsala, Sweden) and resuspended at 0.8×10^6 cells/mL in X-VIVO medium (Lonza, Walkersville, MD, USA) supplemented with 10% fetal bovine serum and recombinant (r)hIFN- γ (1000 IU/ml; Feldan Bio, Québec City, Canada) which were added to the culture on day 1. OKT3 monoclonal

antibody (50 ng/ml; eBioscience, San Diego, CA, USA) and rhIL-2 (300 IU/ml; Novartis, Basel, Switzerland) were added to the culture on day 2. On day 5, the activated cells were harvested while the dead cells were eliminated using Ficoll-PaquePLUS. Thereafter, cells were stimulated with rhIL-2 (300 IU/ml) every 3-4 days and fresh medium was added to maintain a cell density of $0.8-1 \times 10^6$ cells/ml for a total of 21-28 days.

Flow cytometry

Subpopulations of CB-CIK cells were characterized using fluorescein isothiocyanate (FITC)-anti-human CD3 (clone UCHT1) and phycoerythrin (PE)- or allophycocyanin (APC)-anti-human CD56 (clone B159) antibodies. The activation of signal transducer and activator of transcription-1 (STAT1) by hIFN- α was evaluated using PE-anti-human STAT1 (clone 1/Stat1) and PE-anti-human phosphorylated STAT1 (clone 4a). The following antibodies were used to characterize the phenotype of CD3⁺CD56⁺ CB-CIK cells: anti-human CD8 (clone RPA-T8), anti-human CD4 (clone RPA-T4), anti-human T-cells receptor (TCR) $\alpha\beta$ (clone T10B9.1A-31), anti-human CD5 (clone UCHT2), anti-human NKG2D (clone 1D11), anti-human CD16 (clone 3G8), anti-human NKG2A (clone HP-3D9), anti-human TRAIL (clone RIK-2) and anti-human CD69 (clone FN50). All antibodies were purchased from BD Biosciences (Mississauga, Canada) except for anti-human TRAIL, which was purchased from Biolegend (San Diego, CA, USA).

CD56⁺ CB-CIK cells were isolated using positive selection with CD56 microbeads (Miltenyi Biotec, Auburn, CA, USA) and CD3⁺CD56⁺ CB-CIK cells were sorted on a BD FACSAria I (BD Biosciences).

PB samples were collected weekly from mice and analyzed by flow cytometry using FITC-anti-mouse CD45 (clone 30-F11), PE-anti-human CD19 (clone HIB19), APC-anti-human CD45 (clone HI30), and APC-Cy7-anti-human CD3 (clone SK7), as well as with 7-Aminoactinomycin D (7-AAD) for discrimination of dead cells (BD Biosciences). All antibodies were purchased from BD Biosciences.

CountBright beads (Life Technologies) were added prior to fluorescent-activated cell sorting (FACS) acquisition to determine the absolute number of cells per sample. Samples were acquired on a FACS Aria flow cytometer and analysed using FACSDiva software (BD Biosciences).

⁵¹Chromium-release cytotoxicity assay

Target cells, 10^6 , were labeled with 50 μCi ⁵¹chromium(Cr) (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA) for 45 minutes at 37°C, in a 5% CO₂ atmosphere, vortexing every 15 min. The labeled cells were washed four times with RPMI medium and plated in triplicate in 96-well round-bottom plates (1×10^4 cells/mL). Effector CB-CIK cells were added at effector to target (E:T) ratios of 1.25:1, 5:1, 20:1 and 40:1 and incubated for 4h at 37°C, in a 5% CO₂ atmosphere. In some experiments, the effector cells were treated with 1000 IU/mL of hIFN- α (Intron A, Schering-Plough, Kirkland, Canada) 24h before using them in the cytotoxicity assay. At the end of the assay, 100 μl of supernatant were harvested and counted using a gamma counter (Packard Bioscience (now Perkin Elmer), Waltham, MA, USA; model E5002). The percentage of specific ⁵¹Cr lysis was calculated using the following equation:

$$\% \text{ specific lysis} = \frac{[(\text{test release}) - (\text{spontaneous release})]}{[(\text{maximal release}) - (\text{spontaneous release})]}$$

(spontaneous release)] x 100. Maximal release was obtained following the addition of 1M hydrochloric acid.

For inhibition experiments, the cytotoxic assay was performed in the presence of a variable number of unlabeled target cells added per well. The percent inhibition was calculated as follows: % inhibition = [(% lysis of labeled cells without the addition of unlabeled cells) – (% lysis of labeled cells with the addition of unlabeled cells)] / (% lysis of labeled cells without the addition of unlabeled cells) * 100.

Western blot analysis

Flow cytometry-sorted CD3⁺CD56⁺ CB-CIK cells were treated with 1000 IU/mL hIFN- α for 0, 5, 10 and 15 min at 37°C, in a 5% CO₂ atmosphere. The cells were then lysed in RadioImmunoPrecipitation Assay (RIPA) buffer with protease inhibitors for 30 min at 4°C. Lysates were pelleted by centrifugation for 1 min at 13 200 r.p.m., resuspended and equal amounts of lysate protein were then run on 8% polyacrylamide gels under reducing conditions. Proteins were electrophoretically transferred to polyvinilidene fluoride (PVDF) membranes that were blocked with 1% bovine serum albumin (BSA) in Tris-buffer saline-Tween-20 (TBST) buffer and incubated with the primary antibody in TBST containing 1% BSA overnight at 4°C. After washing, membranes were incubated with horseradish peroxidase-labeled affinity-purified anti-rabbit IgG antibody (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) or anti-mouse IgG antibody (Santa Cruz Biotechnology) for 2h at room temperature. Bound antibodies were detected using chemiluminescence reagents. Primary antibodies used were STAT1 rabbit antibody (clone 42H3; Cell Signaling Technology Danvers, MA, USA), phospho-STAT1 rabbit antibody (clone 58D6; Cell

Signaling Technology), and β -actin mouse antibody (MAB1501; Chemicon (now EMD Millipore), Billerica, MA, USA).

Activation of STAT1

CB-CIK cells were treated with PBS or 1000 IU/mL hIFN- α for 15 min at 37°C, in a 5% CO₂ atmosphere. Intracellular staining of STAT1 was performed using cells that were fixed and permeabilized using the BD Cytotfix/Cytoperm and Perm/Wash Buffer (BD Bioscience) for 30 min at 4°C.

Xenogeneic model of GvHD

Following sublethal 3 Gy irradiation, 7-9 week-old mice were injected intraperitoneally (i.p.) with 10⁷ PBMC, CBMC or CD56⁺ CB-CIK cells on day 0 and treated with PBS or hIFN- α (5000 IU delivered subcutaneously) every day until they were sacrificed. All cells were treated with either PBS or hIFN- α (1000 IU/mL) 24h prior to i.p. injection.

Assessment of GvHD

Mice were evaluated every other day in a blinded fashion for clinical signs of GvHD and physical appearance. The GvHD assessment took into account weight loss, general appearance of the fur and mobility (32, 33). A diagnosis of GvHD was made when a mouse presented with a 10% weight loss, appearance of ruffled fur, and limited mobility (32, 33). Survival was also noted for each group. As requested by our GLPAR committee, mice were sacrificed when the clinical endpoints were reached (i.e. a weight loss >20% and the

appearance of either limited mobility or a disruption of general appearance). A volume of 100 μ L of PB was drawn weekly from the saphenous vein. Circulating cells were analyzed by flow cytometry to determine the percentage of circulating human cells.

Xenogeneic model of graft-versus-leukemia

Seven-to-9-week-old mice were injected intravenously (i.v.) with 5×10^5 REH cells or 5×10^5 REH cells plus 40×10^6 CD56⁺ CB-CIK cells, simultaneously. Prior to injection, the CD56⁺ CB-CIK cells were treated with either PBS or hIFN- α (1000 IU/mL) *in vitro* for 24h. Mice were injected daily with PBS or hIFN- α (5000 IU subcutaneously) until the time of sacrifice.

Assessment of graft-versus-leukemia

Assessment of graft-versus-leukemia (GvL) in mice was conducted as requested by the GLPAR committee. Mice were sacrificed when clinical endpoints were reached. A volume of 100 μ L of PB was drawn weekly from the saphenous vein. Circulating cells were analyzed by flow cytometry to determine the quantity of human CD45⁺CD19⁺ B-ALL cells. The spleen, liver and BM were also recovered from the sacrificed animals and the presence of CD45⁺CD19⁺ B-ALL cells was assessed using flow cytometry.

Statistics

Results were analysed using GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA). Survival statistics were determined using a Mantel-Cox (log-rank) test, and elsewhere

the ANOVA test in combination with the Bonferroni post-test. The level of significance was set at $p \leq 0.05$. For other data, the Mann Whitney test (one-tailed) was used.

Results

Generation, characterization and cytotoxic activity of CB-CIK cells

As already described by Introna *et al.* (12), CB-CIK cells can be amplified rapidly to yield large quantities (see Supplementary Figures 1A, B to be found online at <http://infomahealthcare.com/doi/abs/10.3109/14653249.2012.714864>). Starting with 15×10^6 CBMC, at the end of the culture period we routinely obtained approximately 2.2×10^8 CB-CIK cells that were composed on average of 45% $CD3^+CD56^+$, 1% $CD3^-CD56^+$ and 54% $CD3^+CD56^-$ cells (see Supplementary Figure 1C to be found online at <http://infomahealthcare.com/doi/abs/10.3109/14653249.2012.714864>). The phenotypic analysis of $CD3^+CD56^+$ cells, performed on day 21 of CB-CIK culture (see Supplementary Figure 1D to be found online at <http://infomahealthcare.com/doi/abs/10.3109/14653249.2012.714864>), showed that more than of 80% of these cells expressed CD8, TCR $\alpha\beta$, CD5 and NKG2D but not CD16 or NKG2A. We also showed that $CD56^+$ CB-CIK cells were cytotoxic against the standard target K562 cells (see Supplementary Figure 1E to be found online at <http://infomahealthcare.com/doi/abs/10.3109/14653249.2012.714864>) but not against PBMC.

CD56⁺ CB-CIK cells but not bulk CB-CIK cells kill B-ALL cell lines effectively and specifically

The bulk CIK cell culture is a heterogeneous population of cells consisting of $CD3^+CD56^+$, $CD3^+CD56^-$ and $CD3^-CD56^+$ cell subsets. Several research groups have shown that bulk PB-CIK cell cultures are not able to kill B-ALL cells effectively (23, 24). We also found that bulk CB-CIK cell cultures displayed very weak cytotoxic activity against three human B-ALL cell

lines (697, NALM6 and REH) (Figure 1). However, the CD56⁺ cell fraction (CD3⁺CD56⁺ and CD3⁻CD56⁺ cells), obtained from the bulk CB-CIK cell culture using CD56 magnetic microbeads, displayed a significant increase in cytotoxicity against B-ALL cells compared with the bulk CB-CIK cells (Figure 1). We measured the cytotoxicity of the CD3⁺CD56⁺ cell subset sorted from CD56⁺ CB-CIK cells and observed that this subset was cytotoxic against K562, 697, NALM6 and REH cell lines (Figure 2A). We also observed that the CD3⁺CD56⁻ CB-CIK cell subset did not display any cytotoxic activity against K562, 697, NALM6 or REH cell lines (Figure 2A). Given the very small percentage of CD3⁻CD56⁺ cells in the CD56⁺ CB-CIK cell fraction, it is very likely that the CD3⁺CD56⁺ subset played a more prominent role in the observed cytotoxicity. We also found that for each B-ALL cell line, the addition of unlabeled B-ALL cells decreased the lysis of labeled B-ALL cells by CD56⁺ CB-CIK cells, which correlated with the number of unlabeled B-ALL cells added. This suggested that the cytotoxicity of CD56⁺ CB-CIK cells was specific (Figure 2B).

hIFN- α increases the cytotoxic activity of CD56⁺ CB-CIK cells in vitro and up-regulates TRAIL and CD69 expression in these cells

hIFN- α is known to regulate the activity of NK cells (25) and as CIK cells share some properties with NK cells (34), we tested whether the cytotoxic activity of CB-CIK cells could be augmented by hIFN- α . We observed that an overnight incubation of CB-CIK cells with hIFN- α induced a significant increase in the cytotoxicity of CD56⁺ CB-CIK cells against B-ALL cell lines (Figure 3). This increased cytotoxicity, which ranged from 20 to 40% (Figure 3A), was observed against all three B-ALL cell lines at all E:T ratios, as shown in Figure 3B in three representative experiments. It has been shown that hIFN- α can activate STAT1 in NK

cells (35), and we wanted to test whether or not hIFN- α could also activate STAT1 in CD3⁺CD56⁺ CB-CIK cells. We could show by both Western blot analysis and intracellular staining using flow cytometry that hIFN- α could induce the phosphorylation of STAT1 in CD3⁺CD56⁺ CB-CIK cells (Figure 4). Furthermore, we tested the effect of hIFN- α on CD3⁺CD56⁺ CB-CIK cells by analyzing the expression of various surface markers. While we did not observe any increase or decrease in the expression of several activation or inhibition markers that included CD25, HLA-DR, NKG2D, NKp30, NKp44, NKp46, KIR2DL1, KIR2DL2 and KIR3DL1 (data not shown), we did observe that hIFN- α significantly increased the expression of CD69 and TRAIL on CD3⁺CD56⁺ CB-CIK cells (Figure 5).

CD56⁺ CB-CIK cells have a cytotoxic effect in vivo in a human acute lymphoblastic leukemia xenogeneic mouse model

To test the cytotoxic effects of CB-CIK cells *in vivo* and whether hIFN- α could augment these effects, we used a xenogeneic model of human acute lymphoblastic leukemia (ALL) in which human B-ALL REH cells are injected i.v. into NOD/SCID/ γ c⁻ (NSG) mice. In this severely immunodeficient mouse model (the mice lack T, B and NK cells), injected human REH cells proliferated rapidly, and invaded BM, spleen, liver and central nervous system (CNS), which resulted in the death of most animals between 20 and 23 days post-injection (Figure 6C). To test the cytotoxic effects of CB-CIK cells with and without hIFN- α , NSG mice were injected with 5x10⁵ B-ALL REH cells alone or co-injected with CD56⁺ CB-CIK cells that had been incubated *in vitro* with either PBS or 1000 IU/mL of hIFN- α overnight. Mice injected with hIFN- α -incubated CD56⁺ CB-CIK cells were also injected daily with 5000 IU of hIFN- α , while mice injected with PBS-incubated CD56⁺ CB-CIK cells were injected daily with PBS.

As shown in Figure 6A,B, the treatment of REH-injected mice with CD56⁺ CB-CIK cells significantly increased survival and significantly decreased the proliferation of human leukemic cells in mice independently of hIFN- α . Also, addition of hIFN- α to CD56⁺ CB-CIK cells significantly augmented survival compared with mice treated with CD56⁺ CB-CIK cells in the absence of hIFN- α , (p=0.022). Moreover, the addition of hIFN- α to CD56⁺ CB-CIK cells induced a statistically significant decrease in the absolute number of circulating human leukemic cells on day 14, although this effect was attenuated on day 21. We analyzed weekly the presence of circulating CD56⁺ CB-CIK cells in mouse blood (Figure 6D) and showed that the number of circulating CD56⁺ CB-CIK cells detected on day 7 was very low and continued to decrease to near undetectable levels on days 14 and 21. Treatment with hIFN- α slightly increased the number of CD56⁺ CB-CIK cells detected in mouse blood although statistical significance was not reached.

hIFN- α /PBS-treated CD56⁺ CB-CIK cells do not induce a strong xeno-GvHD in NSG mice

To test whether CD56⁺ CB-CIK cells could induce GvHD and whether the addition of hIFN- α would exacerbate it, we used the xeno-GvHD NSG mouse model (32, 33) in which human PBMC injected into sublethally irradiated NSG mice induce a xeno-GvHD. Sublethally irradiated NSG mice were injected with either PBMC (positive control), CBMC (positive control), or CD56⁺ CB-CIK cells. As shown in Figure 7A, while the injection of PBMC and CBMC induced a xeno-GvHD-related mortality, CD56⁺ CB-CIK cells did not. Also, the incidence of GvHD was significantly attenuated in mice injected with CD56⁺ CB-CIK cells compared with PBMC-injected control mice (Figure 7B). Treatment with hIFN- α strongly increased the incidence of GvHD and mortality in the positive control groups but had no

significant effect on mice injected with CD56⁺ CB-CIK cells (Figure 7A, B). In addition, the percentage of human CD45⁺ cells, assessed weekly in blood samples from the mice, was significantly lower in CD56⁺ CB-CIK cell-injected mice than in the PBMC and CBMC-injected groups (Figure 7C).

Discussion

In this study, we have showed that CD56⁺ CB-CIK cells are cytotoxic both *in vitro* and *in vivo* against human B-ALL cell lines and that this cytotoxicity is significantly enhanced by hIFN- α *in vitro* and *in vivo*.

The use of CIK cells in translational medicine is an attractive proposition because these cells can be easily and rapidly expanded in as little as 3 weeks from both PBMC (10, 11), CB (12), as well as from patients' PB cells (23) using established good manufacturing protocols (12). In this study, we prepared CIK cells from CB because CB transplantation is used more and more frequently in children (4) as an HLA-suitable donor with minor HLA differences can be found readily for almost every child (36). Also, with CB transplantation, immunotherapy for leukemic relapse with DLI is not feasible because the donor is anonymous in almost all cases, except for those rare cases of related CB transplantation. Introna *et al.* (12) have shown that CB-CIK cells can be amplified from the residual cells left in the CB bag following transplantation, thereby, offering the opportunity of utilizing donor-derived immunotherapy following CB transplantation (5).

We have shown that bulk CB-CIK cell cultures are very weakly cytotoxic against B-ALL cell lines, as has been shown for PB-CIK cell cultures (23, 24). Sangiolo *et al.* (17) tested PB-CIK cells *in vitro* and observed that lysis of tumour cells was mediated essentially by the CD56⁺ fraction. However, the authors did not resolve whether the lysis of tumour cells was induced by CD3⁺CD56⁺ cells, CD3⁻CD56⁺ cells, or both. We found, as for PB-CIK cells, that after sorting CB-CIK cells into the different subpopulations, the CD56⁺ cell subset, which comprises CD3⁺CD56⁺ and CD3⁻CD56⁺ cells, was cytotoxic against B-ALL cells. In addition, we demonstrated that the CD56⁺CD3⁺ CB-CIK cell fraction was cytotoxic against B-ALL

cells, suggesting that this fraction is responsible for the cytotoxic effect because it represents more than 97% of the CD56⁺ CB-CIK cell population. It is likely that the CD56⁺ CIK cell subset is responsible for the observed cytotoxicity because of the fact that this subset shares similar properties with NK cells, unlike the CD3⁺CD56⁻ subset. Accordingly, we demonstrated that the CD3⁺CD56⁻ subset has no cytotoxic activity, and thus, by removing this CIK cell population, what remains are only the approximately 45% cytotoxic CD56⁺ cells, thereby ensuring enhanced activity against leukemic cells. Given that the active CIK cells are CD56⁺, KIR-HLA mismatches could have been functional in this setting. Therefore, we analyzed the KIR receptors (KIR2DL1, KIR2DL2 and KIR3DL1) on CB-CIK cells and found that the cells did not express any of them (data not shown).

The cytotoxic activity of PB-CIK cells against B-ALL cells is weaker than that observed against many other tumour cell lines (23, 24). In order to augment the cytotoxic activity of PB-CIK cells against B-ALL cells, some groups have transduced PB-CIK cells with a chimeric receptor specific for the CD19 antigen (24, 37) (chimeric antigen receptor; CAR) and have shown that CAR-CIK cells are more effective at killing B-ALL cells than non-transduced PB-CIK cells. This therapeutic strategy, while not without some promise, presents limitations in that the production of CAR-CIK cells is highly specialized and would not be available to most cellular therapy centers.

Here, we wanted to test a simple and effective strategy for increasing the cytotoxic activity of CIK cells against B-ALL cells, and we postulated that hIFN- α , a readily available inexpensive drug that has been administered safely to patients for many years as a cancer immunotherapy and as an antiviral agent, could be used for this purpose. The immunomodulatory anticancer effects induced by hIFN- α on various immune cell populations have been described in several

reports (35, 38). These populations include NK cells, monocytes, DCs, T and B cells, thus underscoring an important role for hIFN- α as a linking factor between innate and adaptive immunity. Interestingly, the effect of type 1 IFN on GvL, recently studied in a mouse model, demonstrated that the CD8-dependent GvL effect was enhanced by type 1 IFN (39). However, the effect of hIFN- α on CIK cells derived from CB or PB has never been investigated. We found that hIFN- α could augment CB-CIK cell cytotoxicity *in vitro* and induce the phosphorylation of STAT1 (35) in CD3⁺CD56⁺ CB-CIK cells as well as in the other subpopulations (data not shown), confirming that hIFN- α could activate CB-CIK cells.

Of the numerous surface markers studied, we found that hIFN- α only up-regulated the expression of CD69 and TRAIL on CD3⁺CD56⁺ CB-CIK cells. Interestingly, several research groups have shown that type 1 IFN could increase the cytotoxic effect of T and NK cells by up-regulating the expression of TRAIL (40, 41), suggesting that the augmentation of TRAIL that we observed could explain the increase in the lytic activity of the CD56⁺ CB-CIK cells induced by hIFN- α . Also, CD69 is known as a marker of activation for T-cells that triggers the cytotoxic activity of different lymphoid effector cells (42). Therefore, the augmentation of CD69 could also explain the increase in the cytotoxic activity of the hIFN- α -treated CD56⁺ CB-CIK cells. Of note, while we observed that there was some variability between the different CB-CIK cultures with regard to the cytotoxic activity of the CD56⁺ subset against B-ALL cell lines, the addition of hIFN- α always resulted in an augmentation of this cytotoxic activity that was similar between various experiments for a given E:T ratio.

Rettinger *et al.* (43) considered the strategy of stimulating CIK cells with IL-15, instead of IL-2, during *in vitro* expansion, and showed that this induced an increased lytic activity of PB-CIK cells against B-ALL cells. This strategy, which consists of boosting the proliferation and

activation of CIK cells, could be done in addition to stimulating CIK cells with hIFN- α from CB or PB. It would be of interest, therefore, to test in future experiments whether IL-15 in combination with hIFN- α could have a synergistic effect on CIK cell activation.

For *in vivo* studies, we used a human acute myeloid leukemia (ALL) xenogeneic NSG mouse model, which is a relevant pre-clinical model for studying the cytotoxic effects of human CB-CIK cells *in vivo* without interference from the immune system of the mouse, because these mice are severely immunodeficient. PB-CIK cells have been tested *in vitro* and *in vivo*, in mice and in humans, under many conditions (10, 11, 44-48), as reviewed by Sangiolo *et al.* (49) and Lin *et al.* (50). To our knowledge, this is the first time that CD56⁺ CB-CIK cells have been shown to be effective against B-ALL cells *in vivo* and that this effect could be significantly augmented by hIFN- α . Another means of enhancing the effect of CD56⁺ CB-CIK cells *in vivo* could be through repeated injections, as has been utilized in recent clinical trials (20, 21). Alternatively, a combination of CD56⁺ CB-CIK cells with non-toxic doses of chemotherapy could be tried. Indeed, in a recent clinical trial in patients, with advanced solid malignancies, combining CB-CIK cells with second-line chemotherapy significantly improved survival compared with chemotherapy alone (51).

Nishimura *et al.* (18) showed that bulk CIK cells did not induce GvHD *in vivo*. While encouraging, these experiments were only performed in murine models. Also, in different experiments *in vitro*, Sangiolo *et al.* (17) found that, although human bulk PB-CIK cells retained their alloreactivity across major HLA barriers *in vitro*, after CD56⁺ selection human PB-CIK cells lost their alloreactivity compared with T cells. In addition, there have been several phase 1 clinical trials (20, 21, 52) in which few adverse side effects including GvHD have been reported. In our *in vivo* experiments, we observed that CD56⁺ CB-CIK cells did not

induce an acute xeno-GvHD in our NSG model and that the addition of hIFN- α only very weakly induced xeno-GvHD. Moreover, in the GvHD model versus the GvL model, the cell number and the route of injection of CD56⁺ CB-CIK that we used were different. Ito *et al.* (53) showed that the injection of PBMC i.p. or i.v. into non-irradiated or irradiated mice could induce GvHD. Thus the route of injection does not alter the result with regard to the induction of GvHD. In addition, we found that that the injection of 10 or 40 million CD56⁺ CB-CIK cells i.p. into NSG mice did not induce GvHD (data not shown).

Interestingly, Cooper *et al.* (54) showed recently that hIFN- α increased the GvL effect following BM transplantation in children with high-risk leukemia and that this effect was associated with a moderate increase in GvHD. In addition, in a clinical trial aimed at studying the safety and efficacy of CIK cells, one patient with hepatocellular carcinoma who was treated with PB-CIK cells and hIFN- α went into complete remission (20). Thus this clinical result is encouraging with regard to combining CIK cells with hIFN- α .

Taken together, our data could serve as a pre-clinical proof of concept for testing the potential clinical utility of purified CD56⁺ CB-CIK cells as an immunotherapeutic strategy for high-risk B-ALL patients following CB transplantation. Our data further suggest that there could be an additional benefit to combining CD56⁺ CB-CIK cells with hIFN- α to treat these patients.

Disclosure of Conflicts of Interest: The authors declare no potential conflicts of interest.

This work was supported by grants from the Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ) (Fonds de recherches en médecine transfusionnelle, en greffe et en biovigilance 2010-2013), the Fondation du CHU Sainte-Justine and the Fondation Charles Bruneau. LD received a scholarship from the Fondation de l'Hôpital Sainte-Justine/Fondation des Étoiles and a doctoral studentship from the Department of Microbiology and Immunology, University of Montreal. EH is a scholar of the FRSQ.

References

1. Pui CH, Evans WE. Acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med.* 1998 Aug 27;339(9):605-15.
2. Pui CH, Evans WE. Treatment of acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med.* 2006 Jan 12;354(2):166-78.
3. Uderzo C, Conter V, Dini G, Locatelli F, Miniero R, Tamaro P. Treatment of childhood acute lymphoblastic leukemia after the first relapse: curative strategies. *Haematologica.* 2001 Jan;86(1):1-7.
4. National Marrow Donor Program. Trends in Allogeneic Transplants. Available from: http://marrow.org/Physicians/Unrelated_Search_and_Transplant/Trends_in_Allo_Transplants.aspx. (accessed May, 2012)
5. Gluckman E, Rocha V. Indications and results of cord blood transplant in children with leukemia. *Bone Marrow Transplant.* 2008 Jun;41 Suppl 2:S80-2.
6. Kolb HJ. Graft-versus-leukemia effects of transplantation and donor lymphocytes. *Blood.* 2008 Dec 1;112(12):4371-83.
7. Collins RH, Jr., Goldstein S, Giralt S, Levine J, Porter D, Drobyski W, et al. Donor leukocyte infusions in acute lymphocytic leukemia. *Bone Marrow Transplant.* 2000 Sep;26(5):511-6.
8. Kolb HJ, Schattenberg A, Goldman JM, Hertenstein B, Jacobsen N, Arcese W, et al. Graft-versus-leukemia effect of donor lymphocyte transfusions in marrow grafted patients. *Blood.* 1995 Sep 1;86(5):2041-50.
9. Choi SJ, Lee JH, Kim S, Lee YS, Seol M, Ryu SG, et al. Treatment of relapsed acute lymphoblastic leukemia after allogeneic bone marrow transplantation with chemotherapy

followed by G-CSF-primed donor leukocyte infusion: a prospective study. *Bone Marrow Transplant*. 2005 Jul;36(2):163-9.

10. Schmidt-Wolf IG, Negrin RS, Kiem HP, Blume KG, Weissman IL. Use of a SCID mouse/human lymphoma model to evaluate cytokine-induced killer cells with potent antitumor cell activity. *J Exp Med*. 1991 Jul 1;174(1):139-49.

11. Schmidt-Wolf IG, Lefterova P, Mehta BA, Fernandez LP, Huhn D, Blume KG, et al. Phenotypic characterization and identification of effector cells involved in tumor cell recognition of cytokine-induced killer cells. *Exp Hematol*. 1993 Dec;21(13):1673-9.

12. Introna M, Franceschetti M, Ciocca A, Borleri G, Conti E, Golay J, et al. Rapid and massive expansion of cord blood-derived cytokine-induced killer cells: an innovative proposal for the treatment of leukemia relapse after cord blood transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 2006 Nov;38(9):621-7.

13. Verneris MR, Ito M, Baker J, Arshi A, Negrin RS, Shizuru JA. Engineering hematopoietic grafts: purified allogeneic hematopoietic stem cells plus expanded CD8+ NK-T cells in the treatment of lymphoma. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2001;7(10):532-42.

14. Edinger M, Cao YA, Verneris MR, Bachmann MH, Contag CH, Negrin RS. Revealing lymphoma growth and the efficacy of immune cell therapies using in vivo bioluminescence imaging. *Blood*. 2003 Jan 15;101(2):640-8.

15. Sweeney TJ, Mailander V, Tucker AA, Olomu AB, Zhang W, Cao Y, et al. Visualizing the kinetics of tumor-cell clearance in living animals. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 Oct 12;96(21):12044-9.

16. Wongkajornsilp A, Somchitprasert T, Butraporn R, Wamanuttajinda V, Kasetsinsombat K, Huabprasert S, et al. Human cytokine-induced killer cells specifically

infiltrated and retarded the growth of the inoculated human cholangiocarcinoma cells in SCID mice. *Cancer Invest.* 2009 Feb;27(2):140-8.

17. Sangiolo D, Martinuzzi E, Todorovic M, Vitaggio K, Vallario A, Jordaney N, et al. Alloreactivity and anti-tumor activity segregate within two distinct subsets of cytokine-induced killer (CIK) cells: implications for their infusion across major HLA barriers. *Int Immunol.* 2008 Jul;20(7):841-8.

18. Nishimura R, Baker J, Beilhack A, Zeiser R, Olson JA, Segal EI, et al. In vivo trafficking and survival of cytokine-induced killer cells resulting in minimal GVHD with retention of antitumor activity. *Blood.* 2008 Sep 15;112(6):2563-74.

19. Baker J, Verneris MR, Ito M, Shizuru JA, Negrin RS. Expansion of cytolytic CD8(+) natural killer T cells with limited capacity for graft-versus-host disease induction due to interferon gamma production. *Blood.* 2001 May 15;97(10):2923-31.

20. Olioso P, Giancola R, Di Riti M, Contento A, Accorsi P, Iacone A. Immunotherapy with cytokine induced killer cells in solid and hematopoietic tumours: a pilot clinical trial. *Hematol Oncol.* 2009 Sep;27(3):130-9.

21. Introna M, Borleri G, Conti E, Franceschetti M, Barbui AM, Broady R, et al. Repeated infusions of donor-derived cytokine-induced killer cells in patients relapsing after allogeneic stem cell transplantation: a phase I study. *Haematologica.* 2007 Jul;92(7):952-9.

22. Linn YC, Niam M, Chu S, Choong A, Yong HX, Heng KK, et al. The anti-tumour activity of allogeneic cytokine-induced killer cells in patients who relapse after allogeneic transplant for haematological malignancies. *Bone Marrow Transplant.* 2011 Oct 10.

23. Linn YC, Lau LC, Hui KM. Generation of cytokine-induced killer cells from leukaemic samples with in vitro cytotoxicity against autologous and allogeneic leukaemic blasts. *Br J Haematol.* 2002 Jan;116(1):78-86.
24. Marin V, Dander E, Biagi E, Introna M, Fazio G, Biondi A, et al. Characterization of in vitro migratory properties of anti-CD19 chimeric receptor-redirectioned CIK cells for their potential use in B-ALL immunotherapy. *Exp Hematol.* 2006 Sep;34(9):1219-29.
25. Swann JB, Hayakawa Y, Zerafa N, Sheehan KC, Scott B, Schreiber RD, et al. Type I IFN contributes to NK cell homeostasis, activation, and antitumor function. *J Immunol.* 2007 Jun 15;178(12):7540-9.
26. Lehtonen A, Lund R, Lahesmaa R, Julkunen I, Sareneva T, Matikainen S. IFN- α and IL-12 activate IFN regulatory factor 1 (IRF-1), IRF-4, and IRF-8 gene expression in human NK and T cells. *Cytokine.* 2003 Nov 7;24(3):81-90.
27. Tosi D, Valenti R, Cova A, Sovena G, Huber V, Pilla L, et al. Role of cross-talk between IFN- α -induced monocyte-derived dendritic cells and NK cells in priming CD8⁺ T cell responses against human tumor antigens. *J Immunol.* 2004 May 1;172(9):5363-70.
28. Gogas H, Ioannovich J, Dafni U, Stavropoulou-Giokas C, Frangia K, Tsoutsos D, et al. Prognostic significance of autoimmunity during treatment of melanoma with interferon. *N Engl J Med.* 2006 Feb 16;354(7):709-18.
29. Molldrem JJ, Lee PP, Wang C, Felio K, Kantarjian HM, Champlin RE, et al. Evidence that specific T lymphocytes may participate in the elimination of chronic myelogenous leukemia. *Nat Med.* 2000 Sep;6(9):1018-23.
30. Wassmann B, Scheuring U, Pfeifer H, Binckebanck A, Kabisch A, Lubbert M, et al. Efficacy and safety of imatinib mesylate (Glivec) in combination with interferon- α (IFN-

alpha) in Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia (Ph+ALL). *Leukemia*. 2003 Oct;17(10):1919-24.

31. Piccaluga PP, Martinelli G, Isidori A, Malagola M, Rondoni M, Paolini S, et al. Long-term molecular complete remission with IFN-alpha in Ph+ adult acute lymphoid leukemia patients. *Leukemia*. 2008 Aug;22(8):1617-8.

32. Gregoire-Gauthier J, Durrieu L, Duval A, Fontaine F, Dieng MM, Bourgey M, et al. Use of immunoglobulins in the prevention of GvHD in a xenogeneic NOD/SCID/gammac-mouse model. *Bone Marrow Transplant*. 2011 May 16.

33. Gregoire-Gauthier J, Selleri S, Fontaine F, Dieng MM, Patey N, Despars G, et al. Therapeutic Efficacy of Cord Blood-Derived Mesenchymal Stromal Cells for the Prevention of Acute Graft-Versus-Host Disease in a Xenogenic Mouse Model. *Stem Cells Dev*. 2011 Oct 21.

34. Schmidt-Wolf IG, Lefterova P, Johnston V, Huhn D, Blume KG, Negrin RS. Propagation of large numbers of T cells with natural killer cell markers. *Br J Haematol*. 1994 Jul;87(3):453-8.

35. Liang S, Wei H, Sun R, Tian Z. IFNalpha regulates NK cell cytotoxicity through STAT1 pathway. *Cytokine*. 2003 Sep 21;23(6):190-9.

36. Dalle JH, Duval M, Moghrabi A, Wagner E, Vachon MF, Barrette S, et al. Results of an unrelated transplant search strategy using partially HLA-mismatched cord blood as an immediate alternative to HLA-matched bone marrow. *Bone Marrow Transplant*. 2004 Mar;33(6):605-11.

37. Laurin D, Marin V, Biagi E, Pizzitola I, Agostoni V, Gallot G, et al. Exploration of the lysis mechanisms of leukaemic blasts by chimaeric T-cells. *J Biomed Biotechnol.* 2010;2010:234540.
38. Erhardt M, Schmidt-Wolf IG, Sievers E, Frank S, Strehl J, von Lilienfeld-Toal M, et al. Anti-tumoral capabilities of effector cells after IFN-alpha or CpG-motif treatment of cocultured dendritic cells. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* 2006 Nov-Dec;54(6):403-9.
39. Robb RJ, Kreijveld E, Kuns RD, Wilson YA, Olver SD, Don AL, et al. Type I-IFNs control GVHD and GVL responses after transplantation. *Blood.* 2011 Sep 22;118(12):3399-409.
40. Sato K, Hida S, Takayanagi H, Yokochi T, Kayagaki N, Takeda K, et al. Antiviral response by natural killer cells through TRAIL gene induction by IFN-alpha/beta. *Eur J Immunol.* 2001 Nov;31(11):3138-46.
41. Kayagaki N, Yamaguchi N, Nakayama M, Eto H, Okumura K, Yagita H. Type I interferons (IFNs) regulate tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) expression on human T cells: A novel mechanism for the antitumor effects of type I IFNs. *J Exp Med.* 1999 May 3;189(9):1451-60.
42. Moretta A, Poggi A, Pende D, Tripodi G, Orengo AM, Pella N, et al. CD69-mediated pathway of lymphocyte activation: anti-CD69 monoclonal antibodies trigger the cytolytic activity of different lymphoid effector cells with the exception of cytolytic T lymphocytes expressing T cell receptor alpha/beta. *J Exp Med.* 1991 Dec 1;174(6):1393-8.
43. Rettinger E, Kuci S, Naumann I, Becker P, Kreyenberg H, Anzaghe M, et al. The cytotoxic potential of interleukin-15-stimulated cytokine-induced killer cells against leukemia cells. *Cytotherapy.* 2012 Jan;14(1):91-103.

44. Kim HM, Lim J, Yoon YD, Ahn JM, Kang JS, Lee K, et al. Anti-tumor activity of ex vivo expanded cytokine-induced killer cells against human hepatocellular carcinoma. *Int Immunopharmacol.* 2007 Dec 15;7(13):1793-801.
45. Petvises S, Pakakasama S, Wongkajornsilp A, Sirireung S, Panthangkool W, Hongeng S. Ex vivo generation of cytokine-induced killer cells (CD3+ CD56+) from post-stem cell transplant pediatric patients against autologous-Epstein-Barr virus-transformed lymphoblastoid cell lines. *Pediatr Transplant.* 2007 Aug;11(5):511-7.
46. Lu PH, Negrin RS. A novel population of expanded human CD3+CD56+ cells derived from T cells with potent in vivo antitumor activity in mice with severe combined immunodeficiency. *J Immunol.* 1994 Aug 15;153(4):1687-96.
47. Kim HM, Lim J, Park SK, Kang JS, Lee K, Lee CW, et al. Antitumor activity of cytokine-induced killer cells against human lung cancer. *Int Immunopharmacol.* 2007 Dec 15;7(13):1802-7.
48. Kim YJ, Lim J, Kang JS, Kim HM, Lee HK, Ryu HS, et al. Adoptive immunotherapy of human gastric cancer with ex vivo expanded T cells. *Arch Pharm Res.* 2010 Nov;33(11):1789-95.
49. Sangiolo D, Mesiano G, Carnevale-Schianca F, Piacibello W, Aglietta M, Cignetti A. Cytokine induced killer cells as adoptive immunotherapy strategy to augment graft versus tumor after hematopoietic cell transplantation. *Expert Opin Biol Ther.* 2009 Jul;9(7):831-40.
50. Linn YC, Hui KM. Cytokine-induced NK-like T cells: from bench to bedside. *J Biomed Biotechnol.* 2010;2010:435745.

51. Niu Q, Wang W, Li Y, Qin S, Wang Y, Wan G, et al. Cord blood-derived cytokine-induced killer cells biotherapy combined with second-line chemotherapy in the treatment of advanced solid malignancies. *Int Immunopharmacol*. 2011 Apr;11(4):449-56.
52. Introna M, Pievani A, Borleri G, Capelli C, Algarotti A, Mico C, et al. Feasibility and safety of adoptive immunotherapy with CIK cells after cord blood transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2010 Nov;16(11):1603-7.
53. Ito R, Katano I, Kawai K, Hirata H, Ogura T, Kamisako T, et al. Highly sensitive model for xenogenic GVHD using severe immunodeficient NOG mice. *Transplantation*. 2009 Jun 15;87(11):1654-8.
54. Cooper N, Rao K, Goulden N, Amrolia P, Veys P. Alpha interferon augments the graft-versus-leukaemia effect of second stem cell transplants and donor lymphocyte infusions in high-risk paediatric leukaemias. *Br J Haematol*. 2012 Feb;156(4):550-2.

Supplementary Legend

Figure 2.1. (Supplementary Figure 1). Expansion, phenotype and lytic activity of CB-CIK cells. CBMC cells were incubated with IFN- γ and OKT3 and supplemented with IL-2 (day 0). The **(A)** percentage and the **(B)** absolute number of CD3⁺CD56⁺ cells were quantified on days 0, 8, 12, 15 and 21 of the culture (n=11 independent CB-CIK cell cultures). **(C)** CB-CIK cells were stained with FITC-conjugated anti-CD3 and PE-conjugated anti-CD56 antibodies on days 0 and 21, and were analyzed by flow cytometry. **(D)** On day 21, CD3⁺CD56⁺ CB-CIK cells were analyzed for the expression of T and NK cell markers by flow cytometry (n=3 independent CB-CIK cell cultures). **(E)** On day 21, the cytotoxic activity of CD56⁺ CB-CIK cells was tested against the K562 cell line (circles; n=3 independent CB-CIK cell cultures) and fresh PBMC (squares; n=3 independent CB-CIK cell cultures) at different E:T ratios. Results are represented as the mean value +/-SEM.

Legends

Figure 2.2. (Figure 1). Comparison of the cytotoxic activity of bulk CB-CIK cells to CD56⁺ CB-CIK cells against B-ALL cell lines. Lytic activity of bulk CB-CIK (dotted line) and CD56⁺ CB-CIK cells (filled line) were tested against **(A)** 697 (n=5 independent CB-CIK cell cultures), **(B)** NALM6 (n=6 independent CB-CIK cell cultures) and **(C)** REH (n=7 independent CB-CIK cell cultures) cell lines. Results are represented as the mean value \pm SEM. *p \leq 0.05 and ***p \leq 0.001, ANOVA test with a Bonferroni post-test.

Figure 2.3. (Figure 2). Cytotoxic activity of different CB-CIK cell subpopulations. **(A)** CB-CIK cells were separated into CD3⁺CD56⁻ and CD56⁺ cell subsets using CD56 magnetic

microbeads. Then CD56⁺ CB-CIK cells were sorted by flow cytometry, using anti-CD3 antibody, to eliminate CD3⁻CD56⁺ cells (left upper panel). Cytotoxic activity of CD3⁺CD56⁻ cells (dotted line), CD56⁺ CB-CIK cells (filled line), and CD3⁺CD56⁺ CB-CIK cells (dashed line), were tested against the K562, 697, NALM6 and REH cell lines (left lower panel). **(B)** The ability of unlabeled 697, NALM6 and REH cells to inhibit the cytotoxicity exerted by CD56⁺CB-CIK cells on labeled 697, NALM6 and REH cells, respectively, was tested at different E:T ratios (5:1, 20:1, 40:1) and at different labeled cell/unlabeled cell ratios (1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32). Results are expressed as percentage of inhibition. The experiment was repeated twice for each cell line using independent CB-CIK cell cultures.

Figure 2.4. (Figure 3). Human IFN- α increases the cytotoxic activity of CD56⁺ CB-CIK cells against B-ALL cell lines. CD56⁺ CB-CIK cells were incubated overnight with PBS or hIFN- α (1000 IU/mL), and lytic activity was measured against 697 (n=7 independent CB-CIK cell cultures), NALM6 (n=6 independent CB-CIK cell cultures) and REH (n=9 independent CB-CIK cell cultures) cell lines. In **(A)**, results are expressed as the mean value of the percentage increase in lytic activity \pm SEM comparing hIFN- α to PBS-treated CD56⁺ CB-CIK cells, for each B-ALL cell line. The percentage increase was calculated using the following equation: % increase = [(% cell lysis using hIFN- α -treated CD56⁺ CB-CIK cells) – (% cell lysis using PBS-treated CD56⁺ CB-CIK cells)] / (% cell lysis using hIFN- α -treated CD56⁺ CB-CIK cells) * 100. **(B)** Three representative experiments showing the cytotoxic activity of hIFN- α - (dashed line) or PBS- (filled line) induced CD56⁺ CB-CIK cells against each B-ALL cell line. Results are expressed as the mean value \pm SEM of the experiments, each done in triplicate.

* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$ and *** $p \leq 0.001$, ANOVA test with a Bonferroni post-test.

Figure 2.5. (Figure 4). Human IFN- α induces the phosphorylation of STAT1 in CD3⁺CD56⁺ CB-CIK cells. On day 21 of the culture, CD3⁺CD56⁺ CB-CIK cells were purified by FACS and treated with hIFN- α (1000 IU/mL) for 5, 10 and 15 min. Stimulated CD3⁺CD56⁺ CB-CIK cells were examined for the presence of STAT1 and phosphorylated STAT1 (STAT1-P) by Western blotting (A). This expression was quantified by densitometry (B). The intensity was calculated using the following equation: intensity of STAT1 or STAT1-P / intensity of β -actin. The presence of STAT1 and STAT1-P was also analyzed by flow cytometry. (C) Untreated CB-CIK cells were stained with anti-CD3, anti-CD56 and anti-STAT1 antibodies. The CD3⁺CD56⁺ cells were gated to visualize the expression of STAT1 (grey area, isotype control; and white area, STAT1). (D) CB-CIK cells were treated with PBS or hIFN- α (1000 IU/mL) for 15 min and then stained with anti-CD3, anti-CD56 and anti-STAT1-P antibodies. The CD3⁺CD56⁺ cells were gated to visualize the phosphorylation of STAT1 (hairline, PBS-treated CD3⁺CD56⁺ CB-CIK cells; and normal line, hIFN- α -treated CD3⁺CD56⁺ CB-CIK cells). The experiment was repeated twice using independent CB-CIK cell cultures.

Figure 2.6. (Figure 5). Human IFN- α up-regulates TRAIL and CD69 expression on CD3⁺CD56⁺ CB-CIK cells. On day 21, bulk CB-CIK cells were treated overnight in the absence or presence of hIFN- α . Stimulated cells were stained with the following antibodies: anti-CD3, anti-CD56, anti-TRAIL or anti-CD69. Mean fluorescent intensity (MFI) of (A) TRAIL (n=7 independent CB-CIK cell cultures treated with PBS or hIFN- α , 1000 UI/mL, and

n=6 independent CB-CIK cell cultures treated with hIFN- α , 10 000 UI/mL) and **(B)** CD69 (n=6 independent CB-CIK cell cultures treated with PBS or hIFN- α , 1000 UI/mL and n=5 independent CB-CIK cell cultures treated with hIFN- α , 10 000 UI/mL) expressed on CD3⁺CD56⁺ CB-CIK cells treated either with PBS or hIFN α . Mann-Whitney test (one-tailed) was used. A representative example of an overlay of **(C)** TRAIL expression and **(D)** CD69 expression using flow cytometry. Filled area, isotype control; filled line, PBS-treated; dashed line, hIFN- α -treated (1000 IU/mL); and dotted line, hIFN- α -treated (10 000 IU/mL).

Figure 2.7. (Figure 6). Effect of CD56⁺ CB-CIK cells on GvL. NSG mice were injected with 5x10⁵ REH cells alone or co-injected with 40x10⁶ CD56⁺ CB-CIK cells that had been treated overnight with PBS or hIFN- α (1000 IU/mL). Mice were treated daily, thereafter, with PBS or hIFN- α (5000 IU). **(A)** Survival of mice: injected with REH cells alone and treated with PBS (dash-dotted line, n=5); injected with REH cells alone and treated with hIFN- α (dotted line, n=6); co-injected with REH and CD56⁺ CB-CIK cells and treated with PBS (thin filled line, n=11); co-injected with REH and CD56⁺ CB-CIK cells and treated hIFN- α (thick filled line, n=11). The injection of CD56⁺ CB-CIK cells significantly increased survival ((p=0.0061 for mice co-injected with REH cells and CD56⁺ CB-CIK cells, and treated with PBS, versus mice injected with REH cells alone and treated with PBS; p=0.0001 for mice co-injected with REH cells and CD56⁺ CB-CIK cells, and treated with hIFN- α , versus mice injected with REH cells alone and treated with hIFN- α). The survival was significantly improved in mice co-injected with REH cells and CD56⁺ CB-CIK cells, and treated with hIFN- α , compared with mice co-injected with REH cells and CD56⁺ CB-CIK cells, and treated with PBS (p=0.022). **(B)** Blood samples, harvested weekly from mice, were analyzed

by flow cytometry to determine the absolute number of leukemia cells (CD19⁺). Mice injected with REH alone and treated with PBS are shown in the black histograms. Mice injected with REH alone and treated hIFN- α are shown in the white histograms. Mice co-injected with REH and CD56⁺ CB-CIK, and treated PBS, are shown in the horizontally hatched histograms. Mice co-injected with REH and CD56⁺ CB-CIK, and treated hIFN- α , are shown in the vertically hatched histograms. *p \leq 0.02, *p \leq 0.001 and ***p \leq 0.0005, Mann-Whitney test (one-tailed). (C) Mice were injected with 5x10⁵ REH cells. Spleen, liver and BM samples, harvested at the time of killing, were analyzed by flow cytometry to determine the percentage leukemia cells (CD19⁺). (D) Circulating CB-CIK cells were assessed weekly in blood samples by counting the absolute number of human CD3⁺ cells per microliter of PB using flow cytometry. Filled line, NSG mice co-injected with REH cells and CD56⁺ CB-CIK cells, and treated with PBS. Dotted line, NSG mice co-injected with REH cells and CD56⁺ CB-CIK cells and treated with hIFN- α .

Figure 2.8. (Figure 7). CD56⁺ CB-CIK cells treated \pm hIFN- α do not induce severe GvHD in NSG mice. PBMC, CBMC and CD56⁺ CB-CIK cells were pre-incubated with PBS or hIFN- α (1000 IU/mL). NSG mice were injected with 10⁷ PBMC (black triangles, n=5), PBMC/hIFN- α (white triangles, n=4), CBMC (black squares, n=5), CBMC/hIFN- α (white squares, n=4), CD56⁺ CB-CIK cells (black circles, n=5) or CD56⁺ CB-CIK cells/hIFN- α (white circles, n=4). Each group of NSG mice was treated daily with PBS or hIFN- α (5000 IU) administered subcutaneously. (A) The percentage survival of mice was evaluated over 40 days post-injection. (B) The incidence of GvHD was evaluated in each group of NSG mice. GvHD diagnosis was made when mice displayed the following physical signs; 10% weight

loss, appearance of ruffled fur, and limited mobility. (C) The percentage of hCD45⁺ cells, determined by the ratio of human CD45⁺ cells to human plus murine CD45⁺ cells, was assessed weekly by flow cytometry for each group of NSG mice.

Figure 2.1.

Supplementary Figure 1

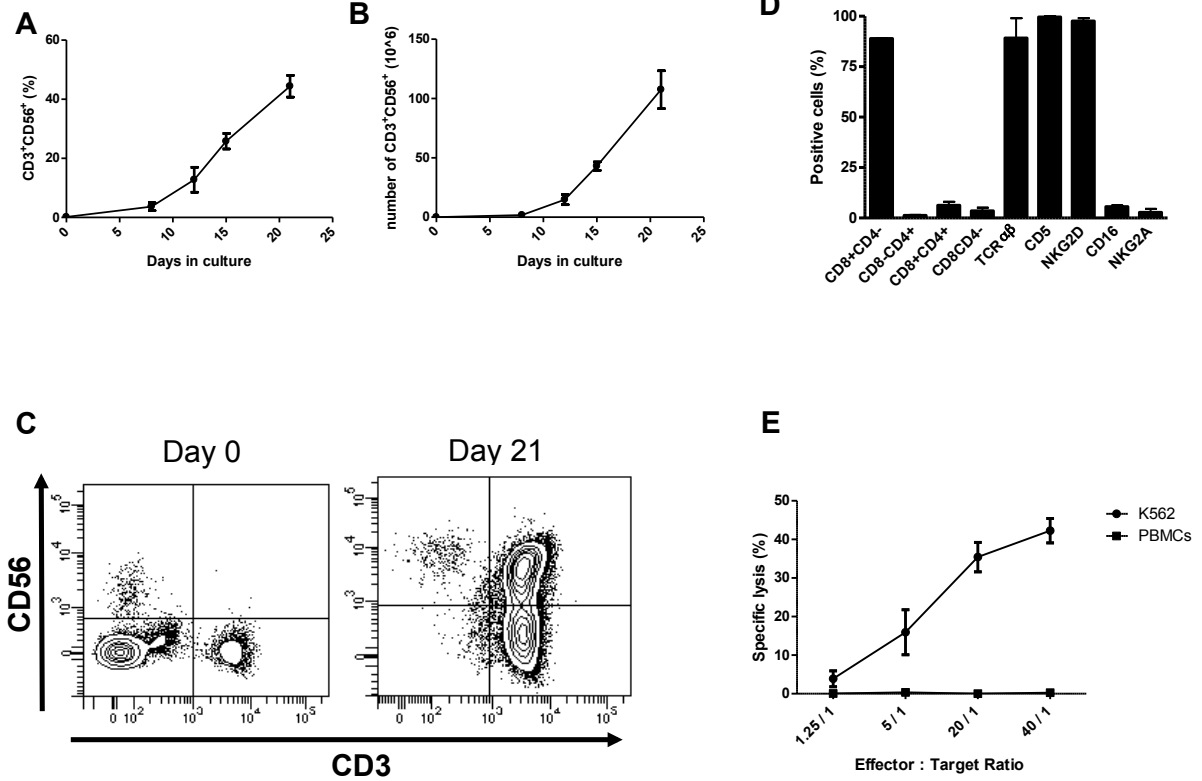


Figure 2.2.

Figure 1

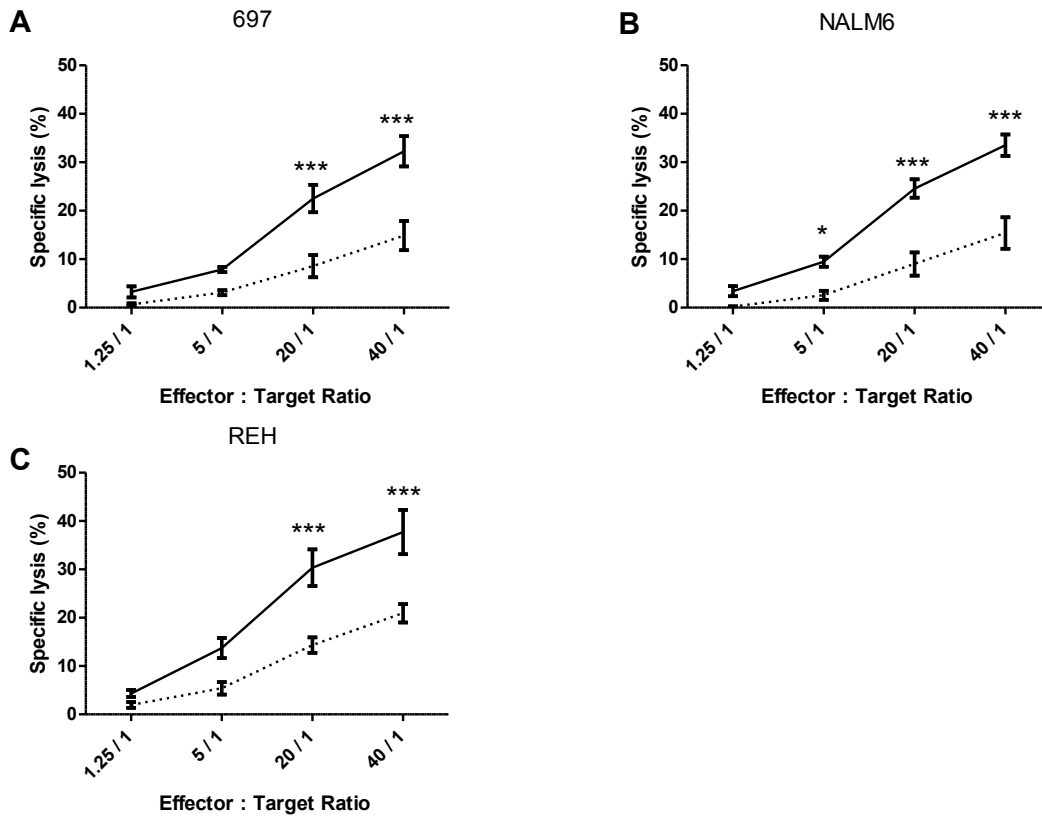


Figure 2.3.

Figure 2

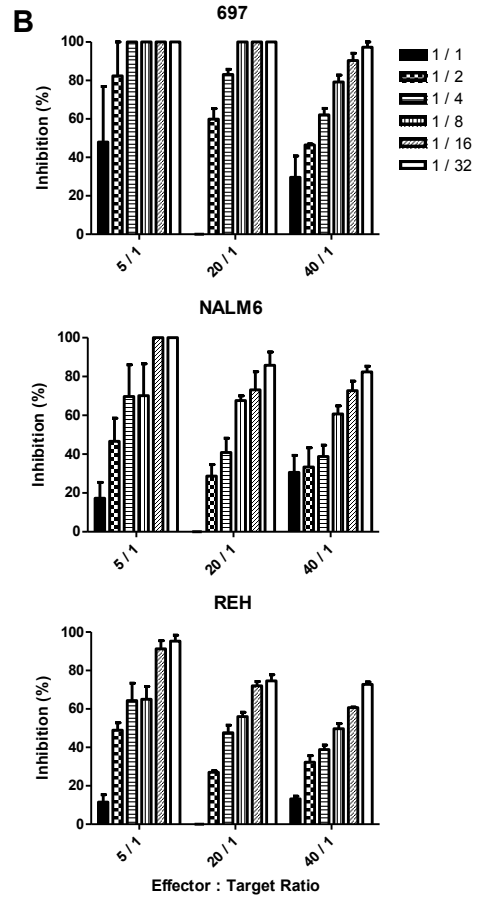
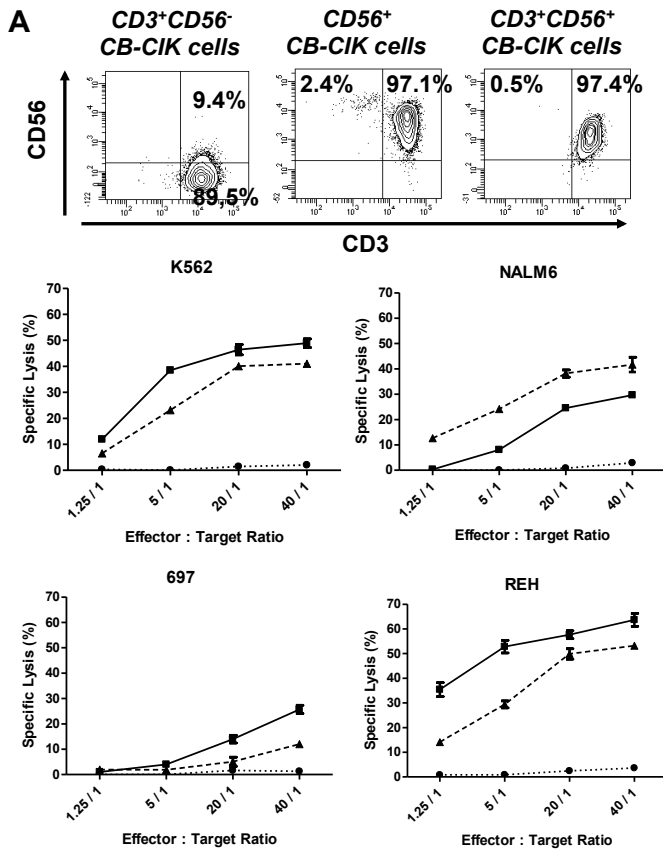


Figure 2.4.

Figure 3

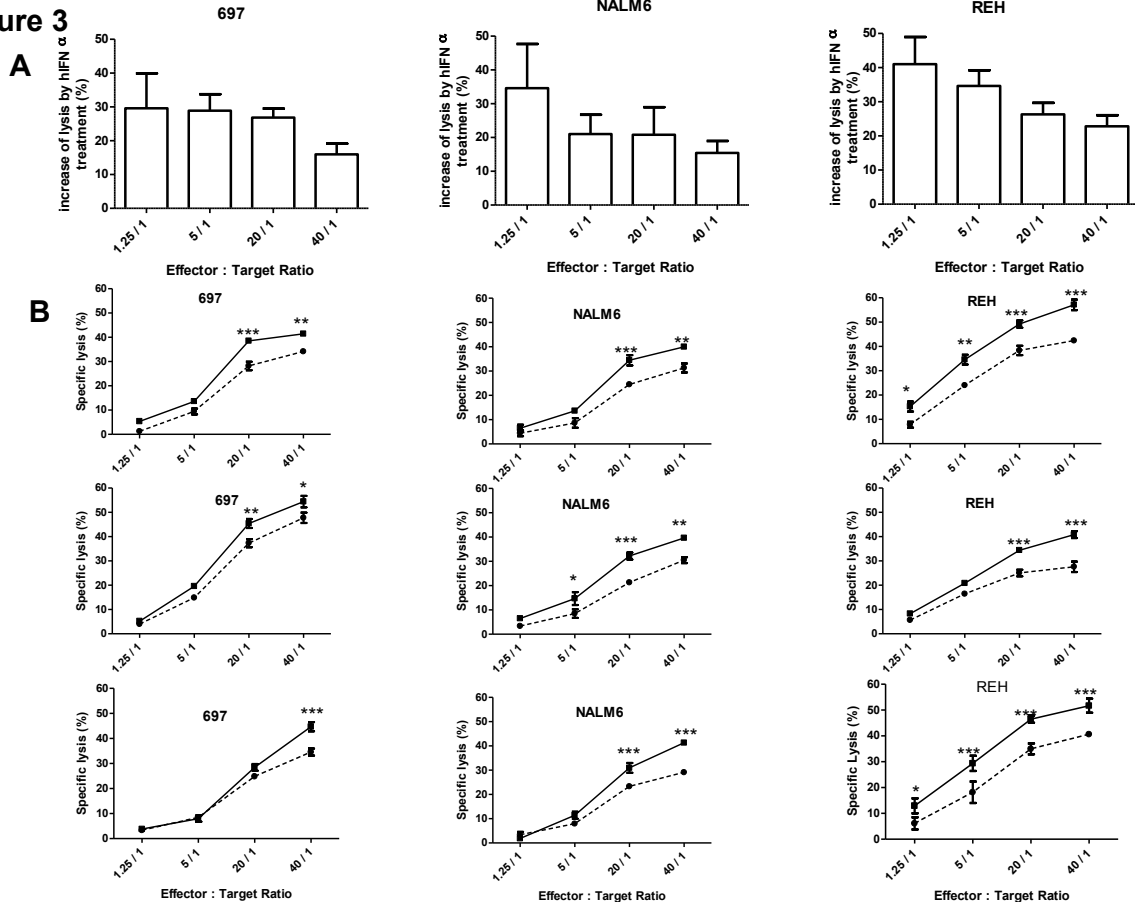
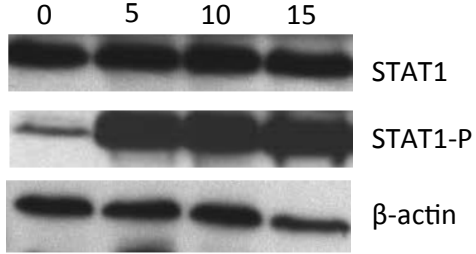


Figure 2.5.

Figure 4

A Treatment with IFN α (minute)



B

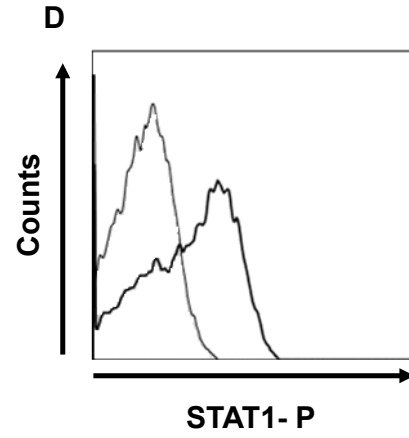
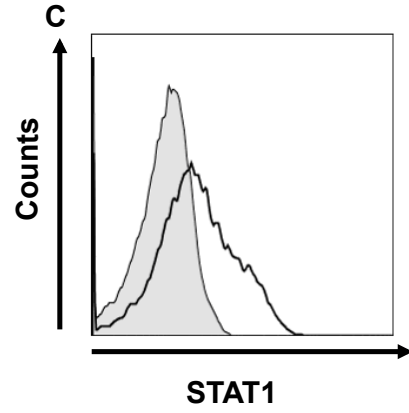
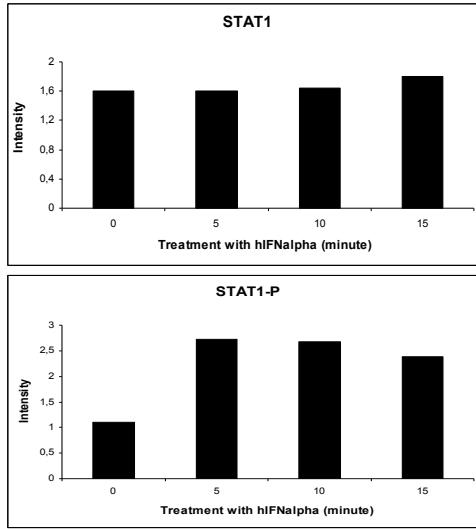


Figure 2.6.

Figure 5

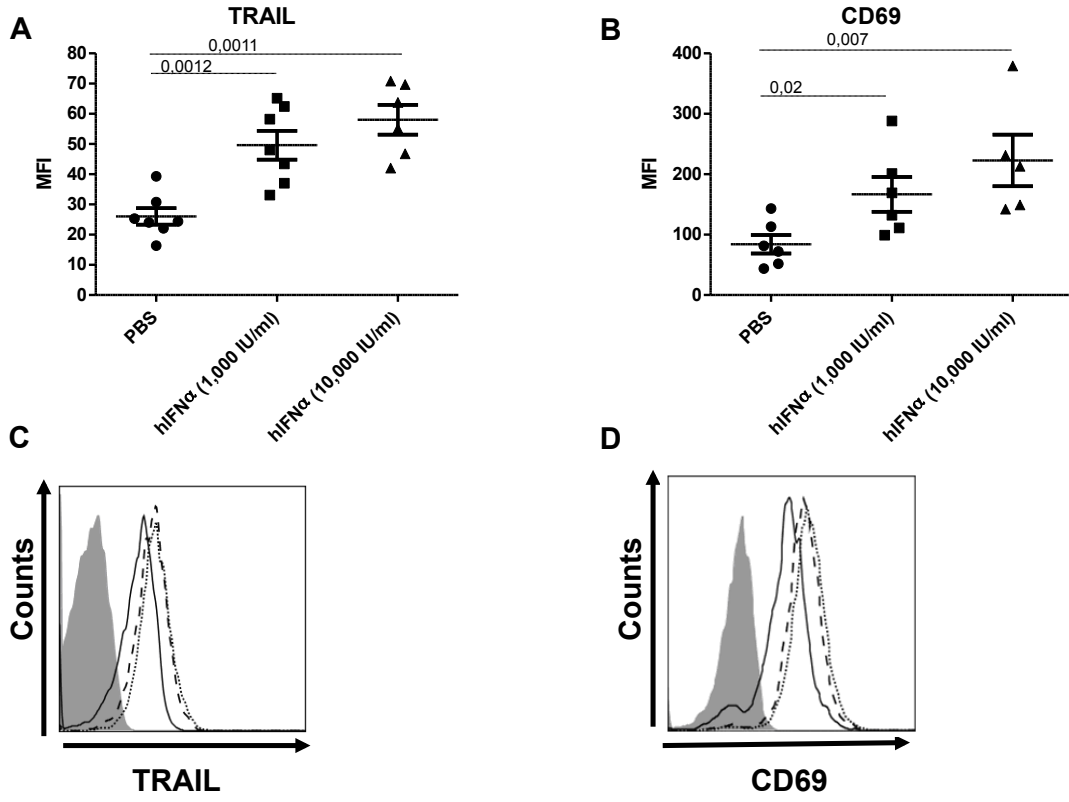


Figure 2.7.

Figure 6

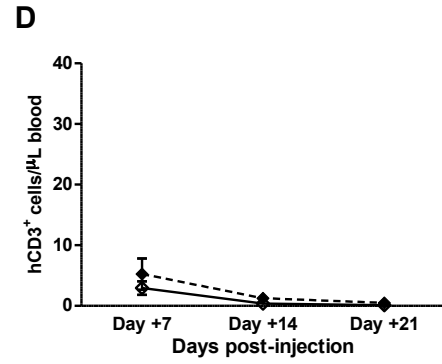
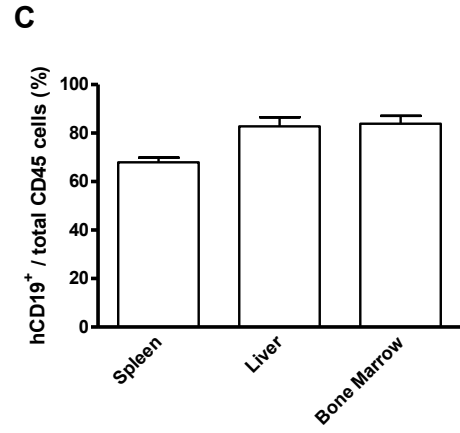
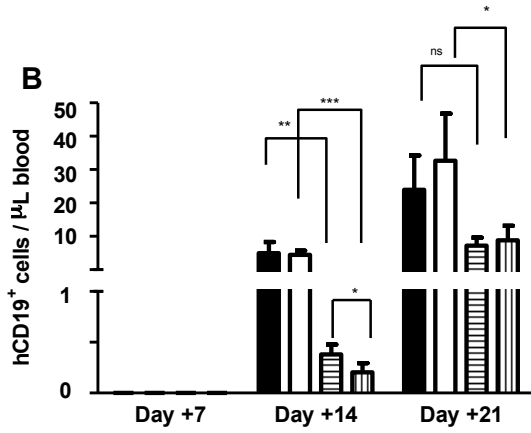
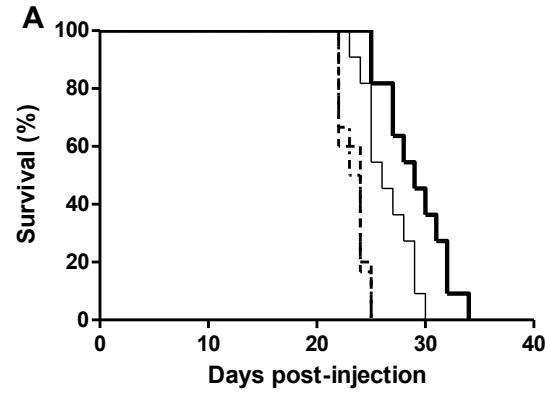
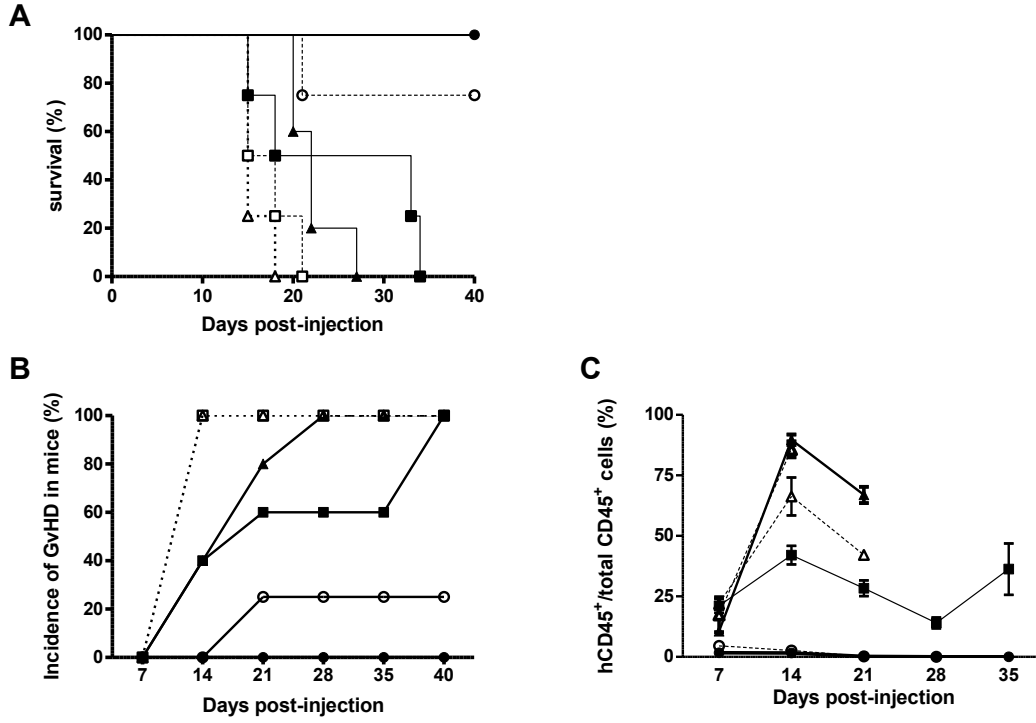


Figure 2.8.

Figure 7



CHAPITRE 3

Mise en contexte du troisième chapitre

Dans le chapitre précédent, nous avons démontré que la sélection de la fraction CD56⁺, comprenant les cellules CD3⁺CD56⁺ et CD3⁻CD56⁺, permet d'augmenter significativement la lyse des cellules pré-B LAL en comparaison aux cellules CIK non purifiées. De plus, nous avons démontré que l'activité cytotoxique de la fraction CD56⁺ est principalement due aux cellules CD3⁺CD56⁺ avec une participation minime des cellules CD3⁻CD56⁺. Par ailleurs, le traitement de la fraction CD56⁺ des cellules CIK avec l'IFN- α pendant 24 heures améliore l'activité lytique de ces cellules contre les cellules pré-B LAL. L'IFN- α , en phosphorylant la protéine STAT-1 (signal transducer and activator of transcription-1 = STAT-1), entraîne une augmentation significative de l'expression des récepteurs CD69 et TRAIL sur les cellules CD3⁺CD56⁺. Par la suite, nous avons démontré que l'injection des cellules CD56⁺, qu'elles aient été traitées ou non avec l'IFN- α , n'entraîne pas de GVHD chez les souris NSG irradiées, et que l'injection de ces cellules permet de prolonger significativement la survie des souris injectées avec les cellules pré-B LAL.

Suite à ces résultats très encourageants, où nous démontrons la faisabilité et l'efficacité de l'immunothérapie de la fraction CD56⁺ des cellules CIK combinée avec l'IFN- α *in vitro* et *in vivo* dans un modèle murin préclinique, nous nous sommes intéressés au mécanisme d'action utilisé par les cellules CD56⁺ des cellules CIK pour éliminer les cellules pré-B LAL. Sachant que le mécanisme d'action des cellules CIK a été décrit sur des cultures obtenues à partir de cellules mononucléées provenant de sang périphérique, il a fallu dans un premier temps procéder à la comparaison du mécanisme cytotoxique des cellules CIK dérivées de sang de cordon et de sang périphérique. De plus, le mécanisme d'action a été analysé sur des cellules tumorales autres que les cellules pré-B LAL. Dans cette étude, nous avons tenté de déterminer

si les cellules CIK utilisent principalement la voie NKG2D, tel que décrit dans l'article de Verneris *et al* (Verneris, Karami et al. 2004), ou si elles utilisent plusieurs voies, tel que suggéré dans l'article de Pievani *et al* (Pievani, Borleri et al. 2011). De plus, nous avons tenté d'évaluer si le mécanisme d'action et l'efficacité des cellules CIK dérivées de sang de cordon sont les mêmes que ceux des cellules CIK dérivées de sang périphérique.

Cord blood derived-cytokine-induced killer cells are more efficient than peripheral blood derived-cytokine-induced killer cells at killing some pre-B acute lymphoblastic leukemia cell lines.

Running title:

CD56⁺ CB and PB-CIK kill differently B-ALL

Ludovic Durrieu^{1,2}; François Fontaine¹, Françoise Le Deist,^{1,2,3} and Elie Haddad^{1,2,3}

¹CHU Sainte-Justine Research Center, Center of Cancerology Charles-Bruneau, Montreal, Quebec, Canada

²Department of Microbiology and Immunology, University of Montreal, Montreal, Quebec, Canada

³Department of Paediatrics, University of Montreal, Montreal, Quebec, Canada

Key words:

Cytokine-induced killer cells; pre-B acute lymphoblastic leukemia; NKG2D; TRAIL; cord blood and peripheral blood

[**Status:** soumis dans Cytotherapy: le 6 juin 2013; en revision majeure: le 6 août 2013]

Abstract

Background: Cytokine-induced killer (CIK) cells *ex vivo* expanded from cord blood (CB) or peripheral blood (PB) have been shown to be cytotoxic against autologous and allogeneic tumor cells. We have previously shown that CD56⁺ CIK cells (CD3⁺CD56⁺ and CD3⁻CD56⁺ cells) are capable of killing pre-B acute lymphoblastic leukemia (B-ALL) cell lines. However, the lytic pathways utilized by CD56⁺ PB and CB-CIK cells to kill B-ALL cell lines have not been studied.

Methods: CB and PB-CIK cells were differentiated and purified using positive selection with CD56 magnetic microbeads. CD56⁺ CB- and PB-CIK cells were compared for expression of different phenotypic markers and for the lytic pathways utilized to kill B-ALL cell lines.

Results: We found that cytotoxic granule proteins were more expressed in CD56⁺ PB-CIK than in CD56⁺ CB-CIK cells. However, CD56⁺ CB-CIK cells expressed more TRAIL compared to CD56⁺ PB-CIK cells. Accordingly, we observed that CD56⁺ CB-CIK cells used both the NKG2D and TRAIL cytotoxic pathways, and were more effective at killing REH cells than CD56⁺ PB-CIK cells that used only the NKG2D pathway.

Discussion: Our results suggest that CD56⁺ CB-CIK cells can utilize both the NKG2D and TRAIL cytotoxic pathways and consequently are more effective than CD56⁺ PB-CK at killing the B-ALL cell lines that are sensitive to the TRAIL pathway. These findings may have clinical implications with respect to optimizing therapeutic efficacy, which may be dependent on the source of the CIK cells and on the target tumor cells.

Introduction

In vitro generated cytokine-induced killer (CIK) cells, first described by Schmidt-Wolf *et al* ^(1, 2), are a mix of 3 subpopulations: CD3⁺CD56⁻, CD3⁻CD56⁺ and CD3⁺CD56⁺. They can be amplified from multiple cell sources including peripheral blood (PB)⁽¹⁾ and cord blood (CB)⁽³⁾. The protocol involves culturing mononuclear cells in the presence of recombinant human interferon gamma (rhIFN γ), followed by the addition of an anti-CD3 monoclonal antibody (OKT3) and recombinant human interleukin 2 (rhIL2) that leads to a greatly increased expansion in the number of CD3⁺CD56⁺ cells over a 3-week period. Lu and Negrin⁽⁴⁾ have shown that this subpopulation is derived from CD3⁺CD56⁻ T cells that acquire the CD56 marker. There are a number of *in vitro* and *in vivo* studies that describe the ability of CIK cells to kill a variety of tumor cells⁽⁵⁻¹²⁾. Furthermore, others and we have shown that the cytotoxic activity against tumor cells is associated with the CD56⁺ cell subpopulation (that comprise mainly CD3⁺CD56⁺ and some CD3⁻CD56⁺ cells)(13, 14).

CIK cells possess potent major histocompatibility complex (MHC)-unrestricted cytotoxic activity against tumor cells, which they carry out through several possible pathways. Two CIK-cell adhesion molecules have been identified as being necessary to kill tumor cells⁽²⁾, lymphocyte function-associated antigen 1 (LFA-1) on CIK cells, and intracellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) on target cells. In addition, the NKG2D receptor⁽¹⁵⁾ has been identified as playing a major role in the activation of CIK cell cytotoxic activity. This cell membrane receptor, which is present on CIK cells^(14, 16), recognizes ligands expressed on tumor cells, mainly MHC class I chain-related gene A (MICA) and MICB^(14, 15). Proof that the NKG2D receptor plays an important role in CIK cell-mediated cytotoxic activity has been established using NKG2D receptor blocking antibodies that inhibit CIK cells from killing several cell

lines including myeloma⁽¹⁵⁾ and B lymphoma⁽¹⁷⁾. In addition, it has been shown that CIK cells can use other receptors to kill tumor cells. Cell signalling through one of these, natural killer p30 (NKp30), has been shown to lead to CIK cell activation resulting in tumor cell lysis⁽¹⁷⁾. It has also been shown that CIK cells can provoke lysis through the tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand (TRAIL) / TRAIL-receptors pathway⁽¹⁸⁾.

Although, as noted above, CIK cells can kill a variety of tumor cells, precursor B-cell acute lymphoblastic leukemia (B-ALL) cell lines have proven to be less sensitive to lysis mediated by CIK cells^(19, 20). We have recently shown, though, that while bulk cord blood CIK (CB-CIK) cells could kill B-ALL cell lines, albeit weakly,⁽¹³⁾ the purified CD56⁺ cell fraction (CD56⁺ CB-CIK) could effectively lyse B-ALL cell lines. Furthermore, this activity resided mainly in the CD3⁺CD56⁺ CB-CIK subpopulation, while the CD3⁺CD56⁻ CB-CIK cell fraction had no cytotoxic activity against these cell lines.

Various research groups working with human CIK cells have derived them from either PB or CB^(3, 14, 15). They have shown that CIK cells express various markers including CD3, CD56, CD8, NKG2D and others markers^(3, 4, 16). Nevertheless, no one has compared the expression of multiple markers on both CB-CIK and PB-CIK cells. In addition, whereas the CIK cell cytotoxic pathways used to kill various tumors has been reported^(15, 17, 18), no study has specifically described the cytotoxic pathways utilized by PB or CB-CIK cells to kill B-ALL cell lines. Therefore, we have investigated the phenotype of CD56⁺ CB-CIK and PB-CIK cells, and the cytotoxic pathways involved in CD56⁺ CB-CIK and CD56⁺ PB-CIK cell-mediated killing of B-ALL cell lines.

Materials and Methods

Cells

Two cell lines were used as positive controls in cytotoxicity assays, K562, a myelogenous leukemia cell line (ATCC, Manassas, VA, USA), and U266, a human cell line multiple myeloma cell line (ATCC). Human B cell precursor leukemia cell lines (REH, and NALM6) were purchased from DSMZ (Braunschweig, Germany). All cell lines were maintained in RPMI-1640 medium supplemented with 2 mM L-glutamine (Life Technologies, Burlington, ON, Canada) and 10% fetal bovine serum (FBS) (Life Technologies).

Generation of CB-CIK and PB-CIK cells

CB units were obtained from the CHU Sainte-Justine Research CB bank, with approval from the Ethics Committee. PB samples were collected from consenting healthy donors. CB mononuclear cells (CBMCs) and PB mononuclear cells (PBMCs) were isolated using Ficoll-Paque PLUS (GE Healthcare Bio-Science AB, Uppsala, Sweden). CBMCs and PBMCs were generated as previously described (13). They were cultured in X-VIVO 15 medium plus FBS (10%) with 1,000 IU/mL of rhIFN γ (Feldan Bio, Québec City, QC, Canada) added on day 1, and then supplemented with 50 ng/mL of OKT3 monoclonal antibody (eBioscience, San Diego, CA, USA) and 300 IU/mL of rhIL2 (Novartis, Basel, Switzerland) on day 2. Over of the culture period, cells were counted, stained, replated in flasks and stimulated with rhIL2 (300 IU/mL) every 3-4 days and fresh medium was added as needed to maintain a cell density of $0.8-1 \times 10^6$ cells/mL for a total of 21-28 days.

Extracellular staining of CB-CIK and PB-CIK cells

CB-CIK and PB-CIK cells were stained using anti-human CD3 (clone UCHT1) and anti-human CD56 (clone B159) antibodies. Cells were characterized with the following antibodies: anti-human NKp30 (clone p30-15), anti-human NKp44 (clone p44-8.1), anti-human NKp46 (clone 9E2/NKp46), anti-human TRAIL (clone RIK-2), and anti-human NKG2D (clone 1D11). All antibodies were purchased from BD Biosciences (Mississauga, ON, Canada) except for anti-human TRAIL, which was purchased from BioLegend (San Diego, CA, USA). Samples were acquired on a FACS Fortessa flow cytometer and analysed using FACSDiva software (BD Biosciences) or FlowJo (Tree Star Inc., Ashland, OR, USA).

Intracellular staining of CB-CIK and PB-CIK cells

In order to carry out the intracellular staining of CD56⁺ CB and CD56⁺ PB-CIK, cells were first stained with anti-human CD3 and anti-human CD56 for 30 minutes at 4°C. They were then washed with phosphate buffered saline (1X PBS; Life Technologies) supplemented with 2% FBS and 0.02% azide (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA). Subsequently, cells were washed with 1X PBS supplemented with 2% FBS, 0.02% azide and 0.05% saponin (Sigma-Aldrich). Cells were then permeabilized using FACS permeabilizing solution 2 (1X PERM2; BD Biosciences) for 10 minutes at room temperature, washed with 1X PBS supplemented with 2% FBS, 0.02% azide and 0.05% saponin, and then stained with anti-human perforin (clone δ G9), anti-human granulysin (clone DH2), and anti-human granzyme B (clone GB11) monoclonal antibodies for 40 minutes at 4°C. Finally, cells were washed with 1X PBS supplemented with 2% FBS, 0.02% azide and 0.05% saponin, followed by 1X PBS supplemented with 2% FBS and 0.02% azide. Samples were analyzed on a FACS Fortessa

flow cytometer. Anti-human perforin was purchased from BD Biosciences; anti-human granulysin and anti-human granzyme B were purchased from BioLegend.

Staining of human B cell precursor leukemia cell lines

Human B cell precursor leukemia cell lines were stained with anti-human MICA/B (clone 6D4), anti-CD95 (clone DX2), anti-human TRAIL-R1 (DR4, clone HS101), or anti-human TRAIL-R2 (DR5, clone HS201) monoclonal antibodies for 30 minutes at 4°C. Cells were washed and then stained with an anti-mouse IgG1 antibody coupled to FITC (Life Technologies) for cells stained with anti-TRAIL-R1 (DR4) or anti-TRAIL-R2 (DR5) antibodies. Samples were analyzed on a FACS Fortessa flow cytometer. Anti-human TRAIL-R1 and TRAIL-R2 antibodies were purchased from Enzo Life Sciences (Plymouth, PA, USA).

⁵¹Chromium-release cytotoxicity assay

CD56⁺ CB-CIK and CD56⁺ PB-CIK cells were purified using positive selection with CD56 magnetic microbeads (Miltenyi Biotec, Auburn, CA, USA) and used in all cytotoxicity assays. CD56⁺ The cytotoxicity assays were conducted as previously described ⁽¹³⁾. 10⁴ target cells (K562, U266, NALM6 and REH), labelled with ⁵¹chromium (⁵¹Cr) (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA) and plated with effector CD56⁺CB-CIK or CD56⁺PB-CIK cells at effector to target cell ratios of 1.25:1, 5:1, 20:1 and 40:1 and incubated for 4h at 37°C, in a 5% CO₂ atmosphere. At the end of the assay, 100 μL of supernatant was

recuperated and radioactivity was counted using a gamma counter (Packard Bioscience; model E5002, Waltham, MA, USA).

Percent specific ^{51}Cr -release was calculated using the following equation: % specific ^{51}Cr -release = $((\text{test release}) - (\text{spontaneous release})) / ((\text{maximal release}) - (\text{spontaneous release})) \times 100\%$. Maximal release was obtained following the addition of 1M hydrochloric acid.

Inhibition of the NKG2D pathway

In order to measure inhibition of the NKG2D pathway, a cytotoxic assay was performed in the presence 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of an anti-human NKG2D blocking antibody (clone M585; Amgen, WA, USA). $\text{CD}56^+$ CB-CIK or $\text{CD}56^+$ PB-CIK cells were incubated with the anti-human NKG2D blocking antibody or anti-human IgG1 antibody for 30 minutes at room temperature before the addition of target cells. Incubation then continued for an additional 4 hours at 37°C , in a 5% CO_2 atmosphere. Effector to target cell ratio used was 40:1.

Inhibition of the TRAIL pathway

In order to measure inhibition of the TRAIL pathway, the cytotoxic assay was performed in the presence of 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of both the anti-human TRAIL-R1 (DR4) and TRAIL-R2 (DR5) blocking antibodies. Target cells were incubated with these two blocking antibodies or an anti-human IgG1 antibody for 30 minutes at room temperature before the addition of effector cells. Incubation then continued for an additional 4 hours at 37°C , in a 5% CO_2 atmosphere. Effector to target cell ratio used was 40:1.

CD95-mediated apoptosis assays

B-ALL cell lines were plated in RPMI-1640 medium supplemented with 10% FBS and 2 mM L-glutamine at a density of 2×10^5 cells/well in 96-well flat bottom plates. Cells were then incubated with an anti-human CD95 antibody (clone APO-1-3, 100 or 250 ng/mL; Enzo Life Sciences, ON, Canada) for 1 hour at 37°C, in a 5% CO₂ atmosphere. At the end of the incubation an affiniPure rabbit anti-mouse IgG (10 µg/mL, Jackson ImmunoResearch, PA, USA) was added for an additional 23 hours at 37°C, in a 5% CO₂ atmosphere.

TRAIL-mediated apoptosis assays by TRAIL

B-ALL cell lines were plated in RPMI-1640 medium supplemented with 10% FBS and 2 mM L-glutamine at a density of 2×10^5 cells/well in 96-well flat bottom plates. Cells were incubated with a TRAIL recombinant protein (SuperKiller TRAIL, 50 ng/mL, Enzo Life Sciences) for 24 hours at 37°C, in a 5% CO₂ atmosphere.

Assessment of apoptosis

To assess apoptosis, cells were harvested and stained with FITC-labeled annexin (BD Bioscience) and 7AAD (BD Bioscience) for 15 minutes at room temperature. Cells were then resuspended in 300 µL of annexin buffer (1X, BD Bioscience) and subsequently analysed by FACS within an hour.

Calculation of percent specific inhibition of immune pathways

Percent specific inhibition was calculated as follows: % specific inhibition = ((% lysis of labelled cells without the addition of antibody or receptor) – (% lysis of labelled cells with the

addition of antibody or receptor) / (% lysis of labelled cells without the addition of antibody or receptor) x 100.

Calculation of percent specific apoptosis

Percent specific apoptosis was calculated as follows: % specific apoptosis = ((% of experimental apoptosis) – (% spontaneous apoptosis)) / (100 – spontaneous apoptosis) x 100.

Statistics

Results were analysed using GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA). For statistical analysis, the Mann-Whitney test (one or two-tailed) and the ANOVA test in combination with the Bonferroni post-test were used according to the experiment. The level of significance was set at $p \leq 0.05$.

Results

Differential expression of phenotypic markers on CD56⁺ CB-CIK compared to CD56⁺ PB-CIK cells

In 2006, Introna *et al*⁽³⁾ described for the first time that CIK cells could be amplified from CBMCs. They confirmed that the increase in the CD3⁺CD56⁺ subpopulation derived from CBMCs was consistent with what had been reported for PBMCs. Similarly, in our study, CIK cells were expanded more than 1,000-fold from both CBMCs and PBMCs over a 21-day culture period and we observed a greater than 30% increase in the CD3⁺CD56⁺ CB-CIK and PB-CIK cell fractions by the end of the culture period (Supplementary Figure 1). Thus, CIK cells in general and the CD3⁺CD56⁺ CIK subpopulations in particular could be amplified from either CBMCs or PBMCs using the same protocol.

We then analyzed the expression of different markers, including natural cytotoxicity receptors (NCRs), cytotoxic granule proteins (perforin, granulysin and granzyme B), NKG2D and TRAIL that can all contribute to the activation of cytotoxic activity of effector against tumor cells, on CD56⁺ CB-CIK and PB-CIK cells (Figure 1). Expression of NKp30 was more pronounced on CD56⁺ CB-CIK cells than on CD56⁺ PB-CIK cells (Figure 1A). Expression of NKp44 seemed stronger on CD56⁺ CB-CIK cells than on CD56⁺ PB-CIK cells, but it was not significant, while NKp46 was very weakly expressed on both CD56⁺ CB and PB-CIK cells.

With regard to cytotoxic granule proteins, we observed that CD56⁺ CB-CIK subpopulations expressed granzyme B and granulysin, albeit to a much lesser degree than CD56⁺ PB-CIK cells (Figure 1B). Perforin expression appeared to be reduced in CD56⁺ CB-CIK compared to CD56⁺ PB-CIK cells, but it was not statistically significant.

TRAIL expression was the strongest on CD56⁺ CB-CIK subpopulations compared to CD56⁺ PB-CIK cells (Figure 1C and E). Finally, NKG2D expression was similarly detected on the CD56⁺ CB and PB-CIK cells (Figure 1D).

CD56⁺ CB-CIK and CD56⁺ PB-CIK kill B-ALL cell lines with a different efficacy

We observed that CD56⁺ CB-CIK cells lysed K562 and U266 control cell lines as effectively as CD56⁺ PB-CIK cells (Figure 2). While CD56⁺ PB-CIK and CB-CIK cells showed similar cytotoxic activity against the NALM6 cell line, we observed that CD56⁺ CB-CIK cells were statistically more efficient than CD56⁺ PB-CIK cells at lysing REH cells (Figure 2).

Expression of MICA, MICB, DR4 and DR5 on B-ALL cell lines and sensibility of these cells to TRAIL pathway

To determine if the CD56⁺ CB-CIK and PB-CIK cells could kill B-ALL cell lines through the NKG2D and TRAIL pathways, we analyzed the expression of NKG2D receptor ligands and the expression DR4 and DR5 receptors on these target cells. Both B-ALL cell lines expressed MICA and/or MICB (Figure 3A) at an intermediate level compared to the positive control K562 cells. In addition, NALM6 and REH cell lines did not express DR4, while both expressed low levels of DR5 (Figure 3B), with slightly higher levels detected on REH cells. We then tested if the expression of DR4 and/or DR5 on B-ALL cell lines was sufficient to sensitize them to TRAIL-mediated apoptosis. We treated the two B-ALL cell lines as well as the K562 cell line, which has been shown to be resistant to TRAIL-mediated apoptosis^(21, 22), with a TRAIL recombinant protein for 24 hours. We observed that both B-ALL cell lines were very sensitive to TRAIL-mediated apoptosis, but not the K562 cell line as expected (Figure 3C).

The Involvement of both NKG2D and TRAIL pathways by CD56⁺ CB-CIK and CD56⁺ PB-CIK cells is dependent on the B-ALL cell line

We then tested if an NKG2D blocking antibody could inhibit the CD56⁺ CB-CIK and PB-CIK cells from lysing B-ALL cell lines. As a first step, we confirmed, as previously shown by Verneris *et al*⁽¹⁵⁾, that the NKG2D blocking antibody could inhibit the lytic activity of CD56⁺ CB-CIK and CD56⁺ PB-CIK cells against the U266 cell line by an average of 60% (data not shown). The NKG2D blocking antibody was not as effective at inhibiting the lytic activity of both CD56⁺ CB-CIK and CD56⁺ PB-CIK cells against the REH cell line (mean of 32.6% +/- 8 and mean of 40% +/- 4, respectively) (Figure 4A and B). This result might suggest that CD56⁺ CB and PB CIK cells could employ additional cytotoxic pathways to kill REH cells. For the NALM6 cell line, the inhibition by the NKG2D blocking antibody was similar to that observed for the U266 cell line (mean of 65% +/- 8 for CD56⁺ CB-CIK cells and mean of 61% +/- 15 for CD56⁺ PB-CIK cells) (Figure 4C and D), with no difference observed for either CIK cell source.

We next analyzed if we could inhibit the lytic activity of CD56⁺ CB-CIK and CD56⁺ PB-CIK cells against REH and NALM6 cell lines using blocking antibodies to both DR4 and DR5. We observed that these antibodies inhibited the lysis of REH cells by CD56⁺ CB-CIK cells by 57% +/- 8 (Figure 4A). In sharp contrast, CD56⁺ PB-CIK cell lytic activity on REH cells was not significantly inhibited by the DR4 and DR5 blocking antibodies compared to the isotype control (Figure 4B). Finally, DR4 and DR5 blocking antibodies either did not inhibit the lytic activity of CD56⁺ CB-CIK cells against the NALM6 cell line compared to the isotype control (Figure 4C), but inhibited the lytic activity of CD56⁺ PB-CIK cells by 38.5% +/- 2 (Figure 4D).

In the next set of experiments we compared the ability of NKG2D, DR4 and DR5 blocking antibodies, tested in combination, to inhibit the cytotoxic activity of CD56⁺ CIK cells against B-ALL cell lines by NKG2D, DR4 and DR5 blocking antibodies. As shown in Figure 4A, CD56⁺ CB-CIK cells used both NKG2D and TRAIL pathways to kill REH cells and there was an additive inhibitory effect when the blocking antibodies were added together. On the other hand, only the NKG2D blocking antibody was effective at inhibiting CD56⁺ PB-CIK cells from lysing REH cells and the combination of blocking antibodies was not better than the NKG2D blocking antibody alone (Figure 4B). For the NALM6 cell line the results mirrored those for the REH cell line. Indeed, the combined blocking antibodies resulted in a significantly stronger inhibition of CD56⁺ PB-CIK cell lytic activity (Figure 4D) as compared to the inhibition observed with each of the blocking antibodies suggesting that CD56⁺ PB-CIK cells used both NKG2D and TRAIL pathways to kill NALM6 cells. In contrast, only the NKG2D blocking antibody was effective at inhibiting the lysis of NALM6 cells by CD56⁺ CB-CIK cells and there was no additive effect observed when the blocking antibodies were combined (Figure 4C).

CD56⁺ CB-CIK and CD56⁺ PB-CIK cells do not require the CD95 or NCR pathway to kill B-ALL cell lines

We analyzed if CD56⁺ CB-CIK and CD56⁺ PB-CIK cells could use other pathways to kill B-ALL cell lines. As a first step, we tested the CD95-mediated apoptosis pathway. We observed that B-ALL cell lines weakly expressed CD95 compared to activated PBMCs (Figure 5A). Using an apoptosis-inducing antibody we showed that B-ALL cell lines were resistant to CD95-mediated apoptosis compared to activated PBMCs that were highly sensitive (Figure

5B). Thus, CD56⁺ CB-CIK and CD56⁺ PB-CIK cells did not use the CD95 pathway to kill B-ALL cell lines. Since CD56⁺ CB-CIK and CD56⁺ PB-CIK cells expressed mainly NKp30 and NKp44 receptors (Figure 1A), we analyzed the NCR pathway. NCR pathway blocking antibodies only minimally inhibited CD56⁺ CB-CIK and CD56⁺ PB-CIK cell lytic activity against REH and NALM6 cell lines (data not shown).

Discussion

Several research groups have studied CIK cells isolated from either PBMCs^(1, 9, 15) or CBMCs^(3, 23) and have demonstrated their cytotoxic activity against several tumors. The pathways involved in the cytotoxic activity of CIK cells against tumor cells have been well studied^(15, 17, 18). In contrast, the lytic mechanisms used by CB and PB CIK cells to kill B-ALL cell lines are still unknown. Furthermore, up until now, a comparison of the expression of different receptors on PBMC and CBMC-derived CIK cells together with an analysis of the cytotoxic activity of PB-CIK versus CB-CIK cells in the same study has not been done. By performing this study, we have shown that the expression of some receptors was different on CD56⁺ CB-CIK compared to CD56⁺ PB-CIK cells. In addition, we have observed for the first time that not only do these different CIK cell preparations kill B-ALL cell lines through activation of different cytotoxic pathways but that the pathways involved also differ according to the B-ALL cell line.

CIK cells express various markers with the two major ones being CD3 and CD56. Additional markers expressed by CIK cells include NKG2D, CD8, CD4, NCR, as well as other receptors^(2, 16). Several of these have been described in the literature as playing a role in immune cell-mediated cytotoxic activity including the NCR receptors, recently shown to be involved in NK cell-mediated killing of the REH B-ALL cell line⁽²⁴⁾. The NKG2D receptor has been described as being the main pathway through which CIK cells mediate tumor cell killing⁽¹⁵⁾ while activation of the TRAIL signaling pathway has been implicated in CIK cell-mediated cytotoxic activity against rhabdomyosarcoma cells⁽¹⁸⁾. It has also been shown that cytotoxic granules were involved in cell killing when NKG2D and NCR pathways were activated⁽²⁵⁾.

By analyzing NKp30, NKp44, NKp46, TRAIL, NKG2D and proteins expressed in cytotoxic granules, we observed that CD56⁺ CB-CIK cells differentially expressed several of the receptors compared to CD56⁺ PB-CIK cells. For some receptors (NKp30 and TRAIL), the expression was more pronounced on CD56⁺ CB-CIK than on CD56⁺ PB-CIK cells while for others either the opposite was found (granzyme B and granulysin) or there was no difference (NKp44, perforin, and NKG2D). These differences in receptor expression could be due to the intrinsic differences observed between CB and PB derived mononuclear cells and particularly T cells that have been shown to have differences in their phenotype such as the relative frequency of naïve and memory T cells and in their function such as their capacity to produce cytokines under stimulation⁽²⁶⁾.

Despite these differences in receptor expression between CD56⁺ CB-CIK and CD56⁺ PB-CIK cells, we observed that both could kill three of the four tumor cell lines (K562, U266 and NALM6) with similar efficacy. In contrast, CD56⁺ CB-CIK cells were significantly more effective than CD56⁺ PB-CIK cells to kill REH cell line. This difference was not related to the proportion of CD3⁺CD56⁺ and CD3⁻CD56⁺ cells in the CD56⁺ CB and PB-CIK fractions, which was similar in both (97% +/- 1 of CD3⁺CD56⁺ cells and 2 % +/- 1 of CD3⁻CD56⁺ cells; data not shown). In addition, it is unlikely that any difference in NKp30 expression on CD56⁺ CB-CIK or CD56⁺ PB-CIK cells could explain this result since we did not observe any inhibition of REH cell lysis with soluble NCR receptors. However, the difference in TRAIL expression may explain what we found since CD56⁺ CB-CIK cells expressed more TRAIL than CD56⁺ PB-CIK cells. Also, CD56⁺ CB-CIK cells were effectively inhibited, albeit partially, from lysing REH cells by DR4/DR5 blocking antibodies whereas CD56⁺ PB-CIK cells were not.

Our analysis of NKG2D, TRAIL, CD95 and NCR pathways suggest that CIK cells utilize both the NKG2D and TRAIL pathways to kill REH and NALM6 cells. We show here for the first time that the involvement of these pathways differs depending on both the source of the immune cell population (i.e. CIK cells) and the target cell population (i.e. B-ALL cell lines). Indeed, the inhibition data observed with blocking antibodies suggested that CD56⁺ CB-CIK cells killed NALM6 cells mainly through the NKG2D pathway while CD56⁺ PB-CIK cells killed these cells through both the NKG2D and TRAIL pathways. On the other hand, CD56⁺ CB-CIK cells killed REH cells through both the NKG2D and TRAIL pathways while CD56⁺ PB-CIK cells killed them only through the NKG2D pathway. Moreover, CD56⁺ CB-CIK cells killed REH cells more efficiently than did CD56⁺ PB-CIK cells, while CD56⁺ CB and PB-CIK cells killed NALM6 as efficiently. Interestingly, this difference in cytotoxic activity between CD56⁺ CB and PB-CIK cells against the REH cell line could be abolished with the DR4/DR5 blocking antibody. Therefore, it is very likely that this difference in cytotoxic activity against REH cells observed between CB and PB-CIK cells could be due to the fact that two cytotoxic pathways are involved in CD56⁺ CB-CIK cells, NKG2D and TRAIL, but only one, the NKG2D pathway in CD56⁺ PB-CIK cells, rendering them less effective at killing REH cells. Also, the combined inhibition of the NKG2D and TRAIL pathways completely or almost completely abolished the cytotoxic activity of CD56⁺ CB-CIK cells against the REH cell line, and CD56⁺ PB-CIK cells against the NALM6 cell line, suggesting that these cells used only these two pathways to kill REH and NALM6 cells, respectively. In contrast, the same inhibition did not completely abolish the lytic activity of CD56⁺ CB-CIK cells against the NALM6 cell line or CD56⁺ PB-CIK cells against the REH cell line indicating

that at least another pathway could be involved although other blocking experiments did not permit to find out this one.

In agreement with our data, Kuçi *et al*⁽¹⁸⁾ showed that CIK cells killed rhabdomyosarcoma cell lines in part through activation of the NKG2D pathway but could also use the TRAIL pathway.

With respect to the NKG2D pathway, we cannot ascribe any differences in cytotoxic activity to the expression of MICA / MICB on B-ALL cell lines, which was similar for these two ligands on REH and NALM6 cells. It is possible that other NKG2D ligands, such as ULBP1, ULBP2 and ULBP3⁽²⁷⁾, are differentially expressed, which may explain why inhibition of NKG2D-mediated lysis is more pronounced on NALM6 than on REH cells. In addition, some tumor cells can secrete soluble NKG2D ligands into the microenvironment⁽²⁸⁾, which in essence binds to NKG2D on effector cells preventing their engagement with ligands on tumor cells⁽²⁹⁾. Thus, REH cells may secrete more soluble NKG2D ligands than NALM6 cells and thereby partially block CIK cell cytotoxic activity.

With regard to inhibition of the TRAIL pathway, the expression of DR5 receptor was very slightly more pronounced on REH cells than NALM6 cells and it is unlikely that it could explain why the inhibition of the lysis by DR4/DR5 blocking antibodies was stronger on REH cells than NALM6 cells. In addition, it is unlikely that the decoy receptors play a role in the observed differences

Taken together, our data shows that CD56⁺ CB-CIK and CD56⁺ PB-CIK cells use 2 main pathways to kill B-ALL cell lines, but as to which pathway(s) predominates is dependent on both the effector and target cells involved. Several clinical studies have shown that the infusion of CB or PB-CIK cells was well tolerated and did not cause severe adverse events⁽³⁰⁻

³³). However, no comparison of the efficacy of CB-CIK versus PB-CIK cells has been addressed. Our data could also have clinical consequences since it suggests that it could be more advantageous to use CD56⁺ CB-CIK cells in against B-ALL because they are more efficient at killing REH cells, by using two pathways, and as efficient at killing NALM6 cells compared to CD56⁺ PB-CIK cells. More generally, our data could have relevance with regard to the choice of which CIK cells to use in the clinic because it suggests that depending on the tumor, CD56⁺ CB-CIK cells or CD56⁺ PB-CIK cells may have more therapeutic efficacy.

Acknowledgments

This project was funded by grants from the Fonds de recherche du Québec – Santé (FRQS), the Fondation du CHU Sainte-Justine and the Fondation Charles Bruneau. LD received a scholarship from the Fondation de l'Hôpital Sainte-Justine/Fondation des Étoiles and a doctoral studentship from the Department of Microbiology and Immunology, University of Montreal. EH is a scholar of the FRQS.

The authors would like to thank the Amgen company for the NKG2D blocking antibody.

Disclosure of Interest

The authors declare no potential conflicts of interest.

References

1. Schmidt-Wolf IG, Negrin RS, Kiem HP, Blume KG, Weissman IL. Use of a SCID mouse/human lymphoma model to evaluate cytokine-induced killer cells with potent antitumor cell activity. *J Exp Med*. 1991 Jul 1;174(1):139-49.
2. Schmidt-Wolf IG, Lefterova P, Mehta BA, Fernandez LP, Huhn D, Blume KG, et al. Phenotypic characterization and identification of effector cells involved in tumor cell recognition of cytokine-induced killer cells. *Exp Hematol*. 1993 Dec;21(13):1673-9.
3. Introna M, Franceschetti M, Ciocca A, Borleri G, Conti E, Golay J, et al. Rapid and massive expansion of cord blood-derived cytokine-induced killer cells: an innovative proposal for the treatment of leukemia relapse after cord blood transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 2006 Nov;38(9):621-7.
4. Lu PH, Negrin RS. A novel population of expanded human CD3+CD56+ cells derived from T cells with potent in vivo antitumor activity in mice with severe combined immunodeficiency. *J Immunol*. 1994 Aug 15;153(4):1687-96.
5. Verneris MR, Ito M, Baker J, Arshi A, Negrin RS, Shizuru JA. Engineering hematopoietic grafts: purified allogeneic hematopoietic stem cells plus expanded CD8+ NK-T cells in the treatment of lymphoma. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2001;7(10):532-42.
6. Edinger M, Cao YA, Verneris MR, Bachmann MH, Contag CH, Negrin RS. Revealing lymphoma growth and the efficacy of immune cell therapies using in vivo bioluminescence imaging. *Blood*. 2003 Jan 15;101(2):640-8.
7. Sweeney TJ, Mailander V, Tucker AA, Olomu AB, Zhang W, Cao Y, et al. Visualizing the kinetics of tumor-cell clearance in living animals. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 Oct 12;96(21):12044-9.

8. Wongkajornsilp A, Somchitprasert T, Butraporn R, Wamanuttajinda V, Kasetsinsombat K, Huabprasert S, et al. Human cytokine-induced killer cells specifically infiltrated and retarded the growth of the inoculated human cholangiocarcinoma cells in SCID mice. *Cancer Invest.* 2009 Feb;27(2):140-8.
9. Kim HM, Lim J, Park SK, Kang JS, Lee K, Lee CW, et al. Antitumor activity of cytokine-induced killer cells against human lung cancer. *Int Immunopharmacol.* 2007 Dec 15;7(13):1802-7.
10. Kim HM, Lim J, Yoon YD, Ahn JM, Kang JS, Lee K, et al. Anti-tumor activity of ex vivo expanded cytokine-induced killer cells against human hepatocellular carcinoma. *Int Immunopharmacol.* 2007 Dec 15;7(13):1793-801.
11. Kim YJ, Lim J, Kang JS, Kim HM, Lee HK, Ryu HS, et al. Adoptive immunotherapy of human gastric cancer with ex vivo expanded T cells. *Arch Pharm Res.* 2010 Nov;33(11):1789-95.
12. Petvises S, Pakakasama S, Wongkajornsilp A, Sirireung S, Panthangkool W, Hongeng S. Ex vivo generation of cytokine-induced killer cells (CD3⁺ CD56⁺) from post-stem cell transplant pediatric patients against autologous-Epstein-Barr virus-transformed lymphoblastoid cell lines. *Pediatr Transplant.* 2007 Aug;11(5):511-7.
13. Durrieu L, Gregoire-Gauthier J, Dieng MM, Fontaine F, le Deist F, Haddad E. Human interferon-alpha increases the cytotoxic effect of CD56(+)cord blood-derived cytokine-induced killer cells on human B-acute lymphoblastic leukemia cell lines. *Cytotherapy.* 2012 Nov;14(10):1245-57.
14. Sangiolo D, Martinuzzi E, Todorovic M, Vitaggio K, Vallario A, Jordaney N, et al. Alloreactivity and anti-tumor activity segregate within two distinct subsets of cytokine-

induced killer (CIK) cells: implications for their infusion across major HLA barriers. *Int Immunol*. 2008 Jul;20(7):841-8.

15. Verneris MR, Karami M, Baker J, Jayaswal A, Negrin RS. Role of NKG2D signaling in the cytotoxicity of activated and expanded CD8⁺ T cells. *Blood*. 2004 Apr 15;103(8):3065-72.

16. Franceschetti M, Pievani A, Borleri G, Vago L, Fleischhauer K, Golay J, et al. Cytokine-induced killer cells are terminally differentiated activated CD8 cytotoxic T-EMRA lymphocytes. *Exp Hematol*. 2009 May;37(5):616-28 e2.

17. Pievani A, Borleri G, Pende D, Moretta L, Rambaldi A, Golay J, et al. Dual-functional capability of CD3⁺CD56⁺ CIK cells, a T-cell subset that acquires NK function and retains TCR-mediated specific cytotoxicity. *Blood*. 2011 Sep 22;118(12):3301-10.

18. Kuci S, Rettinger E, Voss B, Weber G, Stais M, Kreyenberg H, et al. Efficient lysis of rhabdomyosarcoma cells by cytokine-induced killer cells: implications for adoptive immunotherapy after allogeneic stem cell transplantation. *Haematologica*. 2010 Sep;95(9):1579-86.

19. Linn YC, Lau LC, Hui KM. Generation of cytokine-induced killer cells from leukaemic samples with in vitro cytotoxicity against autologous and allogeneic leukaemic blasts. *Br J Haematol*. 2002 Jan;116(1):78-86.

20. Marin V, Dander E, Biagi E, Introna M, Fazio G, Biondi A, et al. Characterization of in vitro migratory properties of anti-CD19 chimeric receptor-redirected CIK cells for their potential use in B-ALL immunotherapy. *Exp Hematol*. 2006 Sep;34(9):1219-29.

21. Di Pietro R, Secchiero P, Rana R, Gibellini D, Visani G, Bemis K, et al. Ionizing radiation sensitizes erythroleukemic cells but not normal erythroblasts to tumor necrosis

factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)--mediated cytotoxicity by selective up-regulation of TRAIL-R1. *Blood*. 2001 May 1;97(9):2596-603.

22. Qiu G, Jiang J, Liu XS. Pentamidine sensitizes chronic myelogenous leukemia K562 cells to TRAIL-induced apoptosis. *Leuk Res*. 2012 Nov;36(11):1417-21.

23. Li Y, Schmidt-Wolf IG, Wu YF, Huang SL, Wei J, Fang J, et al. Optimized protocols for generation of cord blood-derived cytokine-induced killer/natural killer cells. *Anticancer Res*. 2010 Sep;30(9):3493-9.

24. Zhang H, Cui Y, Voong N, Sabatino M, Stroncek DF, Morisot S, et al. Activating signals dominate inhibitory signals in CD137L/IL-15 activated natural killer cells. *J Immunother*. 2011 Mar;34(2):187-95.

25. Hayakawa Y, Smyth MJ. NKG2D and cytotoxic effector function in tumor immune surveillance. *Semin Immunol*. 2006 Jun;18(3):176-85.

26. Lin SJ, Yan DC, Lee YC, Hsiao HS, Lee PT, Liang YW, et al. Umbilical cord blood immunology: relevance to stem cell transplantation. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2012 Feb;42(1):45-57.

27. Cosman D, Mullberg J, Sutherland CL, Chin W, Armitage R, Fanslow W, et al. ULBPs, novel MHC class I-related molecules, bind to CMV glycoprotein UL16 and stimulate NK cytotoxicity through the NKG2D receptor. *Immunity*. 2001 Feb;14(2):123-33.

28. Salih HR, Antropius H, Gieseke F, Lutz SZ, Kanz L, Rammensee HG, et al. Functional expression and release of ligands for the activating immunoreceptor NKG2D in leukemia. *Blood*. 2003 Aug 15;102(4):1389-96.

29. Groh V, Wu J, Yee C, Spies T. Tumour-derived soluble MIC ligands impair expression of NKG2D and T-cell activation. *Nature*. 2002 Oct 17;419(6908):734-8.

30. Niu Q, Wang W, Li Y, Qin S, Wang Y, Wan G, et al. Cord blood-derived cytokine-induced killer cells biotherapy combined with second-line chemotherapy in the treatment of advanced solid malignancies. *Int Immunopharmacol*. 2011 Apr;11(4):449-56.
31. Introna M, Pievani A, Borleri G, Capelli C, Algarotti A, Mico C, et al. Feasibility and safety of adoptive immunotherapy with CIK cells after cord blood transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2010 Nov;16(11):1603-7.
32. Laport GG, Sheehan K, Baker J, Armstrong R, Wong RM, Lowsky R, et al. Adoptive immunotherapy with cytokine-induced killer cells for patients with relapsed hematologic malignancies after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2011 Nov;17(11):1679-87.
33. Linn YC, Niam M, Chu S, Choong A, Yong HX, Heng KK, et al. The anti-tumour activity of allogeneic cytokine-induced killer cells in patients who relapse after allogeneic transplant for haematological malignancies. *Bone Marrow Transplant*. 2012 Jul;47(7):957-66.

Supplementary Legend

Figure 3.1. (Supplementary Figure 1). Expansion of CD3⁺CD56⁺ CB and PB-CIK cells.

CB and PB-CIK cells were differentiated with IFN γ , IL2 and OKT3. The percentage of CD3⁺CD56⁺ was analyzed at days 0, 7, 14 and 21 of culture (n=5 independent CB and PB-CIK cell cultures). CD3⁺CD56⁺ CB-CIK cells were shown in filled line and CD3⁺CD56⁺ PB-CIK cells were shown in dotted line. Results are represented as the mean value +/-SEM.

Legends

Figure 3.2. (Figure 1). Phenotype of CD56⁺ CB-CIK compared to CD56⁺ PB-CIK cells.

On day 21, CIK cells were purified with CD56 magnetic microbeads and stained with CD3 and CD56 and subsequently analyzed for the expression of several markers. The histograms represent the mean fluorescence of intensity (MFI) for **(A)** NKp30, NKp44 and NKp46 (n=6 independent CB and PB-CIK cell cultures), **(B)** perforin, granzyme B and granulysin (n=5 independent CB and PB-CIK cell cultures), **(C)** TRAIL (n=5 independent CB and PB-CIK cell cultures) and **(D)** NKG2D (n=5 independent CB and PB-CIK cell cultures) on each subpopulation: CD56⁺ CB-CIK cells in white bars; CD56⁺ PB-CIK cells in black bars. Results are represented as the mean value +/-SEM. *p \leq 0.05 and **p \leq 0.01, Mann-Whitney test (two-tailed) was used. A representative example of an overlay of **(E)** TRAIL expression using flow cytometry. Filled grey area: isotype control; filled line: CD56⁺ CB-CIK cells; dashed line: CD56⁺ PB-CIK cells.

Figure 3.3. (Figure 2). Cytotoxic activity of CD56⁺ CB-CIK compared to CD56⁺ PB-CIK

cells. On day 21, CB and PB-CIK cells were purified using CD56 magnetic microbeads to recuperate the CD56⁺ fraction. The cytotoxic activity of CD56⁺ CB-CIK (dotted line) and

CD56⁺ PB-CIK (filled line) were tested against K562 (n=6 independent CB and PB-CIK cell cultures), U266 (n=4 independent CB and PB-CIK cell cultures), REH (n=6 independent CB and PB-CIK cell cultures) and NALM6 (n=4 independent CB and PB-CIK cell cultures) cell lines at different Effector : Target ratios. Results are represented as the mean value +/-SEM. *p≤0.05 and **p≤0.01, ANOVA test with a Bonferroni post-test. Percent specific apoptosis was calculated as follows: % specific apoptosis = ((% of experimental apoptosis) – (% spontaneous apoptosis)) / (100 – spontaneous apoptosis) x 100.

Figure 3.4. (Figure 3). Expression of MICA, MICB, DR4 and DR5 on B-ALL cell lines, and sensibility of these cells to TRAIL pathway. (A) A representative example of 2 experiments of an overlay of the expression of MICA/B using the flow cytometry was shown on REH and NALM6 cell lines (white). K562 cell line was used for the positive control (black) and the negative control was an isotypic antibody (grey). **(B)** A representative example of an overlay of the expression of DR4 and DR5 using the flow cytometry was shown on REH and NALM6 cell lines (white). The negative control was an isotypic antibody (grey). **(C)** REH, NALM6 and K562 were tested for their sensitivity to TRAIL-mediated apoptosis. Cells were incubated with a TRAIL recombinant protein (50 ng/mL) for 24 hours and stained with annexin 5 and 7AAD. Apoptosis cells are defined as Annexin 5⁺ 7AAD⁺ cells. Results are expressed as mean percent of specific apoptosis +/-SEM for each cell line. The experiment was repeated three times for each cell line.

Figure 3.5. (Figure 4). Inhibition of cytotoxic activity of CD56⁺ CB and PB-CIK cells by both the NKG2D and TRAIL pathways. Cytotoxic activity of CD56⁺ CB and PB-CIK was

tested in the presence of anti-human IgG1 antibody (20 µg/mL), or anti-human NKG2D blocking antibody (20 µg/mL), or anti-human DR4 and DR5 blocking antibodies (20 µg/mL), or both NKG2D and DR4 / DR5 blocking antibodies against **(A and B)** REH and **(C and D)** NALM6 cell lines. Effector to target cell ratio was 40:1 and the specific lysis observed without blocking antibody was between 25 and 30%. Results are expressed as mean percent of inhibition +/-SEM. The experiment was repeated three times for each cell line using independent CD56⁺ CB and PB-CIK cells. *p≤0.05 and **p≤0.01 Mann-Whitney test (one or two-tailed) was used. NS: non-significant. Percent specific inhibition was calculated as follows: % specific inhibition = ((% lysis of labelled cells without the addition of antibody) – (% lysis of labelled cells with the addition of antibody)) / (% lysis of labelled cells without the addition of antibody) x 100.

Figure 3.6. (Figure 5). Sensibility of B-ALL cell lines to CD95-mediated apoptosis. **(A)** REH, NALM6 and 8 day activated PBMCs were tested for the expression of CD95 using the flow cytometry. The expression of CD95 is represented in white and the isotypic antibody in grey representative of 3 experiments. **(B)** REH, NALM6 and PBMCs were tested for their sensitivity to CD95-mediated apoptosis. Cells were incubated with an anti-CD95 antibody (Apo1-3 250 ng/mL) crosslinked with anti-mouse antibody (10 µg/ml) for 24 hours and stained with annexin 5 and 7AAD. Apoptosis cells are defined as Annexin 5⁺ 7AAD⁺ cells. Results are expressed as mean percent of specific apoptosis +/-SEM for each cell line. The experiment was repeated three times for each cell line.

Figure 3.1.

Supplementary Figure1

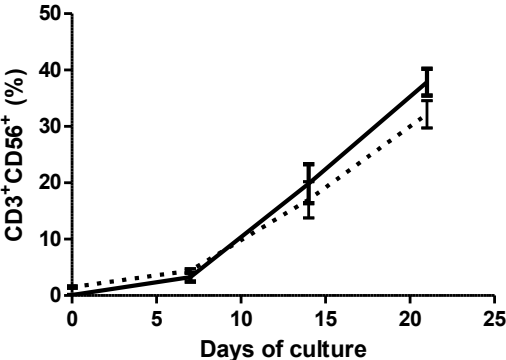


Figure 3.2.

Figure1

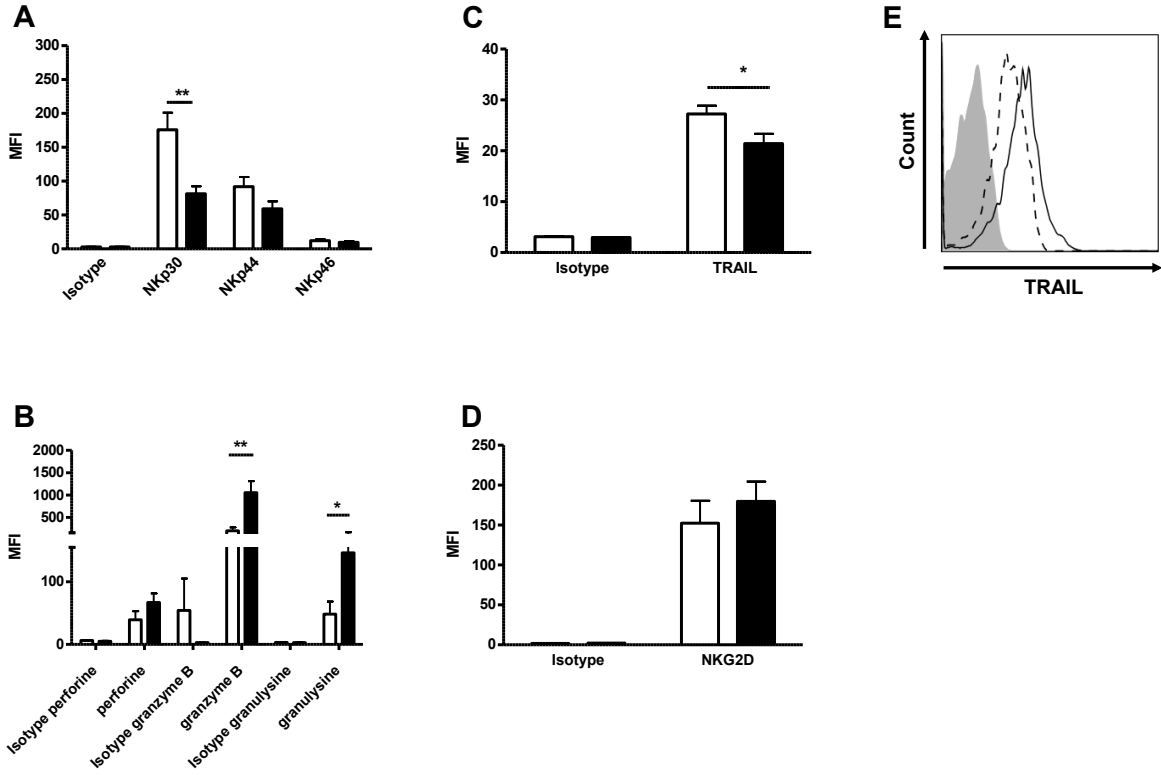


Figure 3.3.

Figure2

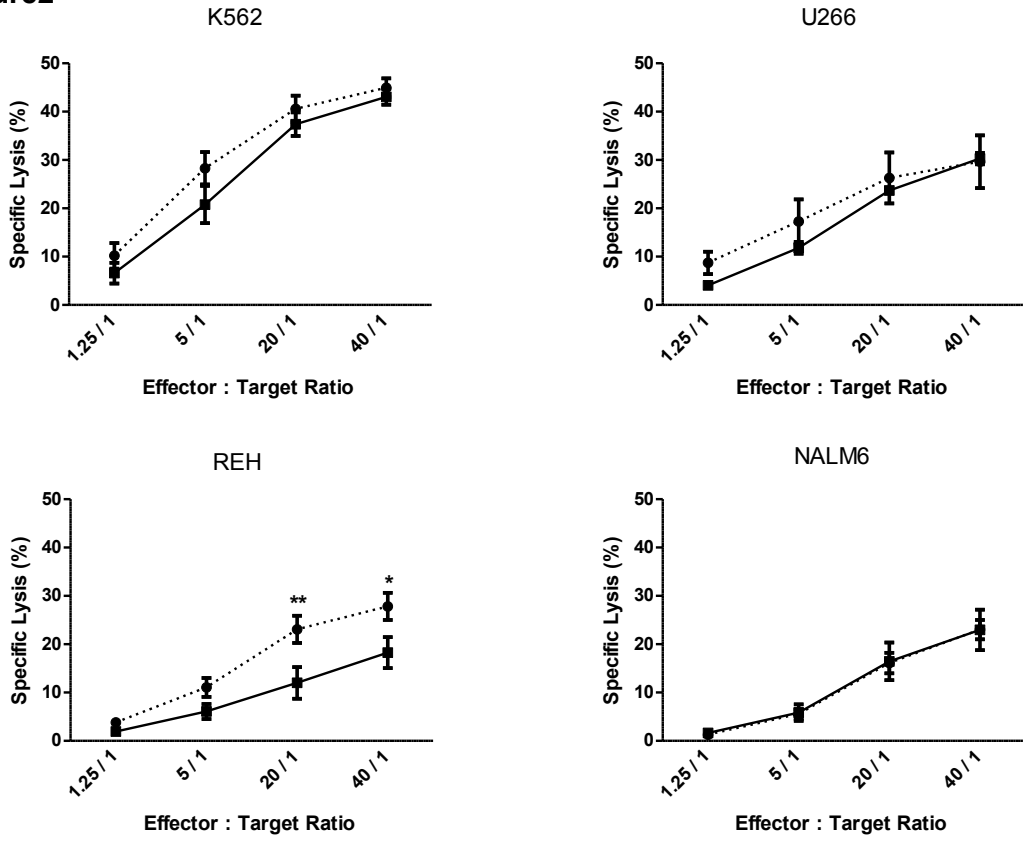


Figure 3.4.

Figure3

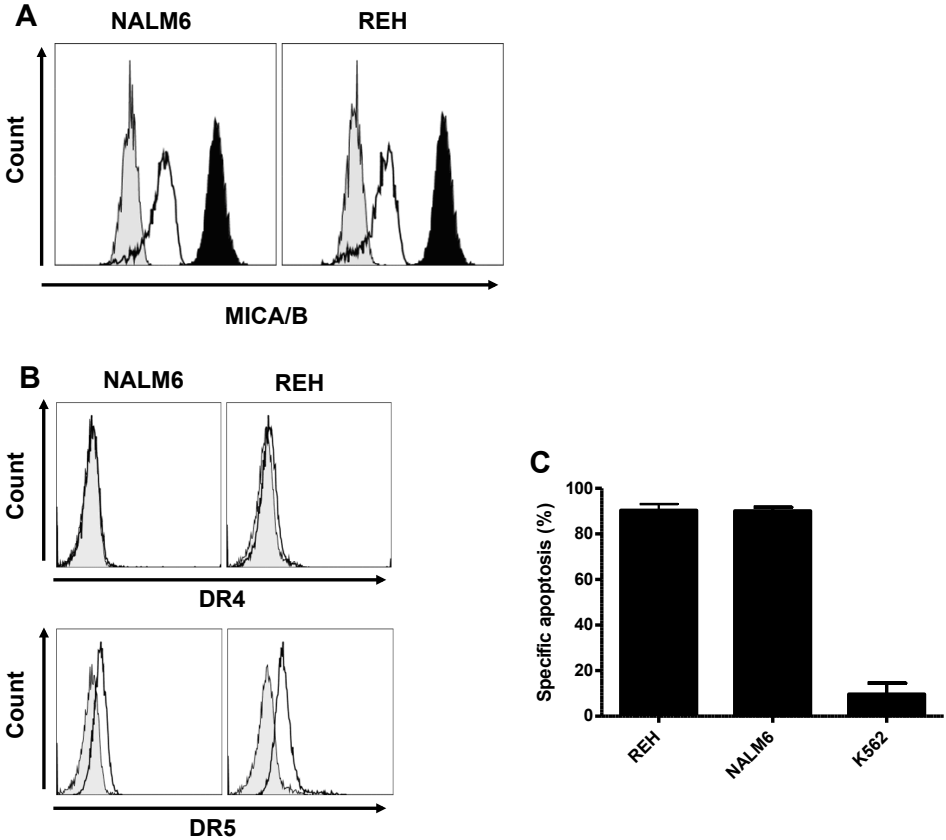


Figure 3.5.

Figure4

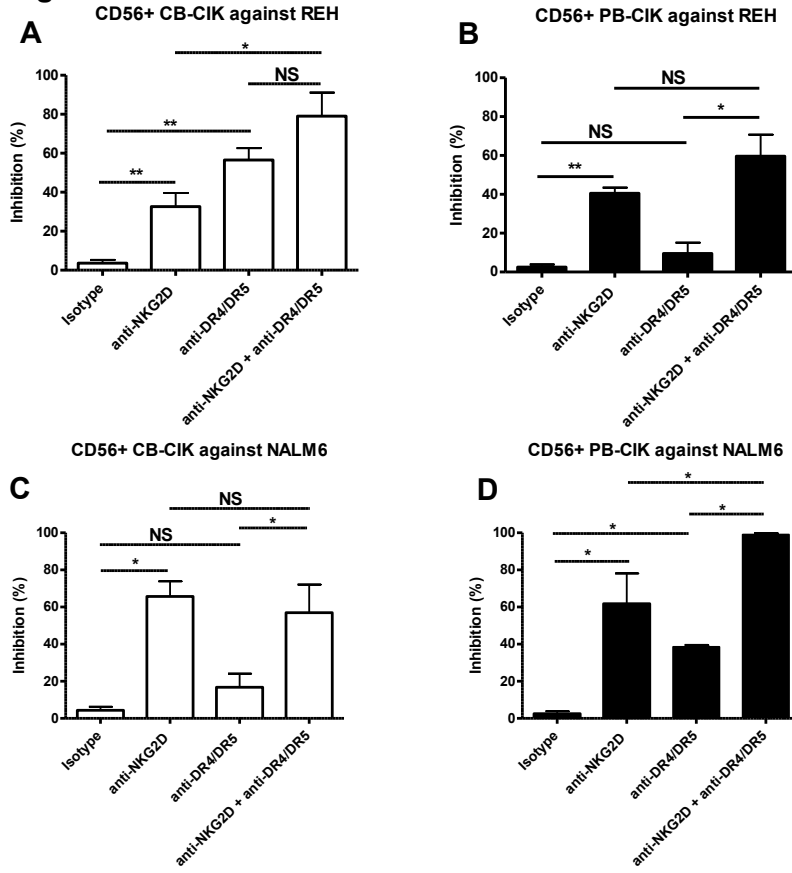
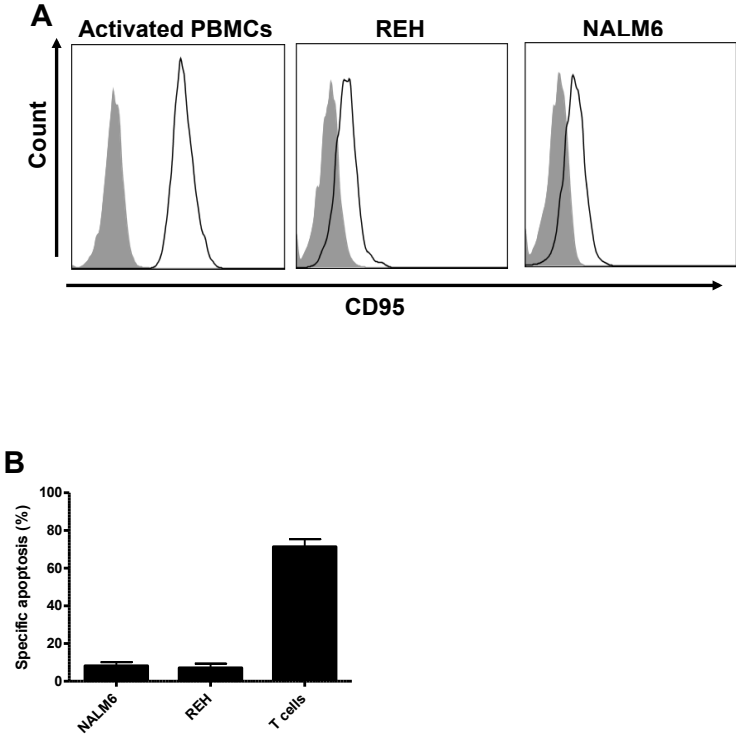


Figure 3.6.

Figure 5



CHAPITRE 4

Mise en contexte du quatrième chapitre

Dans le chapitre précédent, nous avons démontré que l'expression de certains marqueurs sur la fraction CD56⁺ des cellules CIK peut être différente, selon la source des cellules mononucléées ayant permis leur expansion. Nous avons observé une expression plus importante des granules cytotoxiques dans la fraction CD56⁺ des cellules CIK dérivée de sang périphérique par rapport à celle dérivée de sang de cordon. À l'inverse, l'expression de TRAIL était significativement plus importante sur la fraction CD56⁺ des cellules CIK dérivée de sang de cordon que celle de sang périphérique. De plus, nous avons démontré que le mécanisme d'action utilisé par la fraction CD56⁺ des cellules CIK pour éliminer les cellules pré-B LAL diffère selon la source des cellules mononucléées ayant servi à leur expansion. Le mécanisme diffère également pour différentes lignées cellulaires pré-B LAL. La fraction CD56⁺ des cellules CIK dérivée de sang de cordon utilise à la fois les voies de TRAIL et NKG2D contre la lignée cellulaire REH, tandis qu'elle utilise seulement la voie NKG2D contre la lignée cellulaire NALM6, alors que le contraire est observé pour la fraction CD56⁺ des cellules CIK de sang périphérique. Par ailleurs, la fraction CD56⁺ des cellules CIK de sang de cordon est la plus efficace contre les cellules pré-B LAL, tel qu'évalué par leur cytotoxicité contre les lignées cellulaires REH et NALM6, lorsque comparée à celle dérivée de sang périphérique.

Suite à l'analyse du mécanisme d'action de la fraction CD56⁺ des cellules CIK dérivées de sang de cordon et de sang périphérique contre des cellules pré-B LAL, nous avons regardé leur sensibilité à l'apoptose par Fas. Il a été démontré par Verneris *et al* que les cellules CIK sont résistantes à l'apoptose par Fas probablement due à l'expression de gènes anti-apoptotiques (Verneris, Kornacker et al. 2000). Néanmoins, nous avons utilisé les cellules

CIK comme contrôle positif dans une expérience où nous avons montré que les cellules pré-B LAL sont résistantes à l'apoptose par Fas, tandis que les cellules CIK sont sensibles. À la lumière de ce premier résultat contradictoire, nous avons évalué la sensibilité des cellules CIK à l'apoptose par Fas. Nous avons également vérifié si l'amplification des cellules CIK entraîne une augmentation de l'expression de Fas, si une telle expression de Fas peut rendre les cellules CIK sensibles à l'apoptose par Fas, et dans l'éventualité d'une telle sensibilité, si cela peut influencer l'activité cytotoxique des cellules CIK contre des cellules tumorales. Évidemment, toutes ces expériences sont effectuées autant sur les cellules CIK dérivées de sang de cordon que celles dérivées de sang périphérique.

Cord Blood- and Peripheral Blood-Derived Cytokine-Induced Killer (CB and PB-CIK) cells are sensitive to Fas-mediated apoptosis

Ludovic Durrieu^{1,2}; Mame Massar Dieng¹, Françoise Le Deist^{1,2,3} and Elie Haddad^{1,2,3}

¹CHU Sainte-Justine Research Center, Center of Cancerology Charles-Bruneau, Montreal, Quebec, Canada

²Department of Microbiology and Immunology, University of Montreal, Montreal, Quebec, Canada

³Department of Paediatrics, University of Montreal, Montreal, Quebec, Canada

Keywords:

Cytokine-induced killer (CIK) cells, Fas, apoptosis

[**Status:** accepté pour publication dans *Biology of Blood and Marrow Transplantation*: le 3 juillet 2013]

Abstract

Fas-mediated apoptosis is one of the mechanisms used by tumor cells to escape the cytotoxicity of tumor-infiltrating lymphocytes. It has been suggested that cytokine-induced killer (CIK) cells are resistant to Fas-mediated apoptosis, thereby rendering them more attractive for use in cellular immunotherapy. Unlike what was observed by others, here we show that CIK cells are sensitive to Fas-mediated apoptosis. We have observed an increase in Fas expression in the different CIK cell subpopulations ($CD3^+CD56^-$, $CD3^+CD56^+$ and $CD3^-CD56^+$) isolated from both cord blood (CB) and peripheral blood (PB). We also show that the bulk, as well as the $CD3^+CD56^-$ and $CD56^+$ CB and PB-CIK cell subpopulations were sensitive to Fas-mediated apoptosis induced by both CH11 and APO-1 antibodies, albeit with a weaker effect for the CH11 antibody on CB-CIK cells. In addition, in the presence of the APO-1 and CH11 inducers, Fas engagement inhibited the cytotoxic activity of CB and PB-CIK cells. This new contradictory result may help explain the variable efficacy observed with CIK cells in the clinic.

Introduction

The Fas and Fas ligand (FasL) receptor/ligand system is implicated in lymphocyte homeostasis and peripheral tolerance, as well as tumor immunity. Despite other cellular responses emanating from Fas-FasL interactions, its major and best-known role is apoptotic cells death (1, 2). Usually, an effector cell expresses FasL and a target cell expresses Fas, and this interaction mediates the apoptosis of the target cell. In contrast, during an immune reaction against tumor cells, immune effector cells can express both Fas and FasL and target tumor cells can express FasL, thus leading to the apoptosis of the effector cell. Cytokine-induced killer (CIK) cells share similar phenotypic and functional properties as those of T and natural killer cells. CIK cells can be amplified and differentiated from peripheral blood (PB) (3) or cord blood (CB) (4) by the combined addition of interferon gamma, interleukin-2, and anti-CD3. Interestingly, it has been shown that bulk CIK cells were resistant to Fas-mediated apoptosis, making these cells very attractive potentially for use in cellular immunotherapy, as they should be able to elude apoptosis that could be induced by the expression of FasL on tumor cells (5).

Here, however, in this short report, we show that CIK cells, isolated from either PB or CB, in our hands are sensitive to Fas-mediated apoptosis.

Material and Methods

Cells

The SU-DHL-4 cell line (DSMZ, Braunschweig, Germany) was maintained in RPMI-1640 medium supplemented with 2 mM L-glutamine (Life Technologies, Burlington, ON, Canada) and 10% fetal bovine serum (FBS; Life Technologies).

Expansion of CB-CIK and PB-CIK cells

CB units were obtained from the CHU Sainte-Justine Research CB bank with approval from the Ethics Committee. PB samples were collected from consenting healthy donors. CIK cells from CB mononuclear cells and PB mononuclear cells were generated as previously described (6).

Extracellular staining of CB-CIK and PB-CIK cells

Subpopulations of CB-CIK and PB-CIK cells were stained using antihuman CD3, anti-human CD56, and antihuman CD95 antibodies (BD Biosciences). Samples were acquired on a FACS Fortessa (BD Biosciences) flow cytometer and analysed using FACSDiva (BD Biosciences) or FlowJo software (Tree Star Inc., Ashland, OR, USA).

⁵¹Chromium-release cytotoxicity assay

The cytotoxicity assays were conducted as previously described (6). In some experiments, before the cytotoxicity assay, antihuman CD95 antibody (CH11, final concentration/well = 1 µg/mL, Beckman Coulter, ON, Canada) and antihuman APO-1 antibody (APO-1; clone

APO-1-3, final concentration/well = 250 ng/mL; Enzo Life Sciences, ON, Canada) were added with effector cells and incubated for 1 hour. At the end of the 1-hour incubation with APO-1, an affiniPure rabbit antimouse IgG antibody (10 µg/mL, Jackson ImmunoResearch, PA, USA) was added immediately. Then, ⁵¹Cr stained-target cells were added in each well. Effector cells with or without CH11 or APO-1 were added at effector to target (E:T) ratios of 1.25:1, 5:1, 20:1 and 40:1 and incubated for 4h at 37°C, in a 5% CO₂ atmosphere.

Fas-mediated apoptosis assays

Cells were plated in RPMI-1640 medium supplemented with 10% FBS and 2 mM L-glutamine at 2x10⁵ cells/well in 96-well flat bottom plates. Cells were then incubated with antihuman CH11 antibody (1 µg/mL) for 18 hours or with antihuman APO-1 antibody (100 and 250 ng/mL) for 1 hour at 37°C, in a 5% CO₂ atmosphere. At the end of the 1-hour incubation with APO-1, the affiniPure rabbit antimouse IgG antibody (10 µg/mL) was added to the cells for an additional 17 hours at 37°C, in a 5% CO₂ atmosphere.

Assessment of apoptosis

To assess apoptosis, cells were harvested and stained with FITC-labeled annexin (BD Biosciences) and 7AAD (BD Biosciences) for 15 minutes at room temperature. Then, 300 µL of annexin buffer (1X, BD Biosciences) was added to cells that were subsequently acquired on a FACS Fortessa flow cytometer and analysed using FACSDiva or FlowJo software.

Results

CB-CIK and PB-CIK cells are sensitive to Fas-mediated apoptosis

We analyzed the expression of Fas on the 3 subpopulations of CB- and PB-CIK cells on days 0, 21, and 28 of the culture. As shown in Figure 1A and B, on day 21, Fas was expressed on CD3⁺CD56⁺, CD3⁺CD56⁻ and CD3⁻CD56⁺ CB-CIK and PB-CIK cell subpopulations, whereas Fas expression on day 0 was undetectable or very weakly expressed on the CB-CIK subpopulations and weakly expressed on the PB-CIK subpopulations. The 3 PB-CIK cell subpopulations expressed significantly stronger Fas than the CB-CIK subpopulations on day 21 (Figure 1A). The expression of Fas on day 28 was comparable to day 21 for PB-CIK cells, whereas for CB-CIK cells, there was a weak not significant diminution on day 28. The observed Fas expression was comparable between PB-CIK cells and T cells activated by PHA and rhIL2 for 8 days, but not for CB-CIK cells that expressed Fas more weakly.

Given that both CB-CIK and PB-CIK cell subpopulations expressed Fas, we next wanted to determine if they were sensitive to Fas-mediated apoptosis. To do this, we used bulk CB-CIK and PB-CIK cells, as well as CD3⁺CD56⁻ and CD56⁺ (that included CD3⁺CD56⁺ and CD3⁻CD56⁺ cells) purified subpopulations. Two known antibody inducers of apoptosis of Fas-expressing cells, APO1 and CH11 (5, 7), were tested at the following concentrations: 100 ng/mL and 250 ng/mL for the APO-1 antibody (8) and 1 µg/mL for the CH11 antibody (5). Bulk PB-CIK, CD56⁺ PB-CIK and CD3⁺CD56⁻ PB-CIK cells were sensitive to Fas-mediated apoptosis when induced with either antibody (Figure 1C) and the percentage of apoptosis was comparable to that observed with activated T cells. In addition, bulk, CD56⁺ and CD3⁺CD56⁻ CB-CIK and PB-CIK cells were significantly less sensitive to apoptosis induced by the CH11 antibody than the APO-1 antibody even when used at the lower concentration.

Fas engagement inhibits CD56⁺ CIK cell antitumor cytotoxicity

Finally, we tested if CIK cells, sensitive to Fas, could still kill tumor cells when they were stimulated to undergo apoptosis. In this experiment, in which we used a cytotoxicity assay, the CH11 or the APO-1 antibody, along with an affiniPure rabbit antimouse IgG antibody were added to CD56⁺ CB- and PB-CIK cells (that included CD3⁺CD56⁺ and CD3⁻CD56⁺ cells). Then, after 1 hour of incubation, SU-DHL-4 tumor cells were added to effector cells. The cytotoxicity assay was only done with the CD56⁺ CIK fraction as we and others have showed that the CD3⁺CD56⁻ cells did not display any cytotoxic activity, and that the main cytotoxic activity was issued to CD3⁺CD56⁺ cells, and a few to CD3⁻CD56⁺ cells (6, 10). We chose the SU-DHL-4 cell line as a target because it was reported to be resistant to Fas-mediated apoptosis (9) and because it is the cell line used by Verneris *et al* (5) As shown in Figure 2, Fas engagement with CH11 and APO-1 inducers inhibited completely the cytotoxic activity of CD56⁺ PB-CIK cells against SU-DHL-4 tumor cells and only partially but significantly of CD56⁺ CB-CIK cells. We also confirmed our data when we used exactly the same protocol that was performed by Verneris *et al.*, ie, by adding the apoptosis inducers to target cells and effector cells without preincubation (data not shown).

Discussion

In this short report, we have shown that the different subpopulations of CB-CIK and PB-CIK cells expressed Fas and were sensitive to Fas-mediated apoptosis, and that it could influence their cytotoxic activity *in vitro*.

Many research groups have observed in the microenvironment of several tumors the presence of tumor-infiltrating lymphocytes (TIL) that display cytotoxic activity against these tumor cells *in vitro* (11, 12). Tumor cells have developed several mechanisms to escape the immune system (13). One such strategy involves the expression of FasL on tumor cells that can induce the apoptosis of Fas expressing TILs. FasL has been detected on cells from various tumor cell lines (14, 15). Also, O'Connell *et al* (14) have shown that FasL on colon cancer cells was functional and could induce the apoptosis of Jurkat T cells.

Verneris *et al* have investigated the sensitivity of PB-CIK cells to Fas-mediated apoptosis. They have shown that Fas engagement did not induce apoptosis of PB-CIK cells nor did it inhibit their antitumor cytotoxicity. In addition, they have observed that PB-CIK cells expressed several antiapoptotic genes such as CFLIP, Bcl-2, Bcl-xL, DAD-1 and survivin. The expression of these genes could potentially explain why PB-CIK cells were not sensitive to Fas-mediated apoptosis because when protein synthesis was inhibited, PB-CIK cells became sensitive to Fas-mediated apoptosis. They have also shown that the resistance to apoptosis of PB-CIK cells could be due to the synthesis of FasL by CIK cells. In the supernatant of CIK cells, there was therefore active soluble FasL that could act against tumor cells.

While Verneris *et al* showed that bulk PB-CIK as well as CD3⁺CD56⁻ and CD3⁺CD56⁺ PB-CIK cell subpopulations, were resistant to Fas-mediated apoptosis, we found, however, that

bulk PB-CIK and CB-CIK cells, as well as CD3⁺CD56⁻ and CD56⁺ PB and CB-CIK (that included CD3⁺CD56⁺ and CD3⁻CD56⁺ cells) subpopulations, were sensitive to Fas-mediated apoptosis induced by CH11, also used by Verneris *et al*, and APO-1 (8). In addition, apoptosis of CIK-cells was significantly more pronounced with the APO-1 than the CH11 antibody.

This contradictory result may reflect the fact that in our hands, Fas expression by PB and CB-CIK cells was much greater than what was observed by Verneris *et al*, thereby rendering them sensitive to Fas-mediated apoptosis. Indeed, we showed that the expression of Fas increased over the course of the culture period for all 3 subpopulations of PB- and CB-CIK cells, and by day 21, Fas expression (as measured by mean fluorescence intensity) was approximately 2-4 times greater (between 70 and 120) than that observed by Verneris *et al* (mean fluorescence intensity ~30) at the same timepoint. This difference of Fas expression is not due to the antibody because we used the same clone of antihuman CD95 monoclonal antibody as used by Verneris *et al*. We did use a different concentration of OKT3 (50 ng/mL instead of 25 ng/mL), and a different culture medium (RPMI instead of x vivo 15 medium); however, we consider it unlikely that these modifications explain the difference in expression observed. In addition, Verneris *et al* did not always specify if they tested the sensitivity of CIK cells on day 21 or 28. This information is important because they observed a diminution of Fas expression on CIK cells on day 28, whereas we did not observe it or very little on CB- and PB-CIK cell subpopulations. We also confirmed our data when we used exactly the same protocol that was performed by Verneris *et al*, i.e. elimination of dead cells and incubation of cells during 24 h before the apoptotic assay.

Additionally, we found that the CH11 antibody provoked significantly less apoptosis than the APO-1 antibody. Also, unlike CH11-induced apoptosis, the APO-1-induced apoptosis for a given subpopulation (bulk, CD3⁺CD56⁻ or CD56⁺ fractions) was similar for CB- and PB-CIK cells. These differences between APO-1 and CH11 may be due to the fact that the CH11 antibody is an IgM, whereas the APO-1 antibody is an IgG. Thus, the dimeric APO-1 antibody, to provoke an apoptosis signal, has to be cross-linked by an IgG antimouse antibody, thereby inducing a more powerful and more consistent apoptosis.

To evaluate if CIK cell sensitivity to Fas-mediated apoptosis could disrupt the cytotoxic activity of these cells, we tested the activation of Fas-mediated apoptosis of CD56⁺ CB- and PB-CIK cell subpopulations against the SU-DHL-4 cell line. In contrast to those of Verneris *et al*, in the presence of CH11 and APO-1 inducers, CD56⁺ PB-CIK cells were unable to kill SU-DHL-4 cells, and CD56⁺ CB-CIK could do this only partially. The difference between CB- and PB-CIK cells for both the sensitivity of Fas-induced apoptosis and their ability to still have a cytotoxic effect on SU-DHL-4 cell line could be explained by the fact that CB-CIK cell subpopulations displayed a weaker Fas expression than PB-CIK cell subpopulations. This result is interesting because it suggests that CD56⁺ CB-CIK cells could be less sensitive to Fas-mediated apoptosis than CD56⁺ PB-CIK cells and may argue for a better efficacy of CB-CIK cells against tumor cells that express FasL, although this will have to be confirmed clinically. Indeed, all our experiments to evaluate the sensibility of CB- and PB-CIK cells to Fas-mediated apoptosis have been performed *in vitro* using inducers, and the results may be different in the clinical situations.

In conclusion, both CB- and PB-CIK cells are sensitive to Fas-mediated apoptosis but the intensity of the detected apoptosis depends upon which inducer is used. The sensitivity of

CIK cells to Fas-mediated apoptosis could perhaps explain why the efficacy of CB- and PB-CIK cells was variable in several patients compared to others. A more detailed understanding of the relation between CIK cells and Fas-mediated apoptosis may help elucidate their shortcomings while at the same time suggest ways of enhancing their clinical antitumor activity.

Acknowledgments

Conflict of interest statement : There are no conflicts of interest to report.

Financial disclosure : This work was supported by grants from the Fonds de recherche du Québec – Santé (FRQS), the Fondation du CHU Sainte-Justine and the Fondation Charles Bruneau. LD received a scholarship from the Fondation de l'Hôpital Sainte-Justine/Fondation des Étoiles and a doctoral studentship from the Department of Microbiology and Immunology, University of Montreal. EH is a scholar of the FRQS.

References

1. Itoh N, Yonehara S, Ishii A, Yonehara M, Mizushima S, Sameshima M, et al. The polypeptide encoded by the cDNA for human cell surface antigen Fas can mediate apoptosis. *Cell*. 1991 Jul 26;66(2):233-43.
2. Nagata S, Golstein P. The Fas death factor. *Science*. 1995 Mar 10;267(5203):1449-56.
3. Schmidt-Wolf IG, Negrin RS, Kiem HP, Blume KG, Weissman IL. Use of a SCID mouse/human lymphoma model to evaluate cytokine-induced killer cells with potent antitumor cell activity. *J Exp Med*. 1991 Jul 1;174(1):139-49.
4. Introna M, Franceschetti M, Ciocca A, Borleri G, Conti E, Golay J, et al. Rapid and massive expansion of cord blood-derived cytokine-induced killer cells: an innovative proposal for the treatment of leukemia relapse after cord blood transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 2006 Nov;38(9):621-7.
5. Verneris MR, Kornacker M, Mailander V, Negrin RS. Resistance of ex vivo expanded CD3+CD56+ T cells to Fas-mediated apoptosis. *Cancer Immunol Immunother*. 2000 Aug;49(6):335-45.
6. Durrieu L, Gregoire-Gauthier J, Dieng MM, Fontaine F, le Deist F, Haddad E. Human interferon-alpha increases the cytotoxic effect of CD56(+)cord blood-derived cytokine-induced killer cells on human B-acute lymphoblastic leukemia cell lines. *Cytotherapy*. 2012 Nov;14(10):1245-57.
7. Yonehara S, Ishii A, Yonehara M. A cell-killing monoclonal antibody (anti-Fas) to a cell surface antigen co-downregulated with the receptor of tumor necrosis factor. *J Exp Med*. 1989 May 1;169(5):1747-56.

8. Rieux-Laucat F, Blachere S, Danielan S, De Villartay JP, Oleastro M, Solary E, et al. Lymphoproliferative syndrome with autoimmunity: A possible genetic basis for dominant expression of the clinical manifestations. *Blood*. 1999 Oct 15;94(8):2575-82.
9. Godal R, Keilholz U, Uharek L, Letsch A, Asemissen AM, Busse A, et al. Lymphomas are sensitive to perforin-dependent cytotoxic pathways despite expression of PI-9 and overexpression of bcl-2. *Blood*. 2006 Apr 15;107(8):3205-11.
10. Lu PH, Negrin RS. A novel population of expanded human CD3+CD56+ cells derived from T cells with potent in vivo antitumor activity in mice with severe combined immunodeficiency. *J Immunol*. 1994 Aug 15;153(4):1687-96.
11. Coulie PG, Somville M, Lehmann F, Hainaut P, Brasseur F, Devos R, et al. Precursor frequency analysis of human cytolytic T lymphocytes directed against autologous melanoma cells. *Int J Cancer*. 1992 Jan 21;50(2):289-97.
12. Mackensen A, Ferradini L, Carcelain G, Triebel F, Faure F, Viel S, et al. Evidence for in situ amplification of cytotoxic T-lymphocytes with antitumor activity in a human regressive melanoma. *Cancer Res*. 1993 Aug 1;53(15):3569-73.
13. Igney FH, Krammer PH. Immune escape of tumors: apoptosis resistance and tumor counterattack. *J Leukoc Biol*. 2002 Jun;71(6):907-20.
14. O'Connell J, O'Sullivan GC, Collins JK, Shanahan F. The Fas counterattack: Fas-mediated T cell killing by colon cancer cells expressing Fas ligand. *J Exp Med*. 1996 Sep 1;184(3):1075-82.
15. Niehans GA, Brunner T, Frizelle SP, Liston JC, Salerno CT, Knapp DJ, et al. Human lung carcinomas express Fas ligand. *Cancer Res*. 1997 Mar 15;57(6):1007-12.

Legends

Figure 1: Expression of Fas on CB- and PB-CIK cells and sensitivity of CB- and PB-CIK cells to Fas-mediated apoptosis. PB mononuclear cells and CB mononuclear cells were cultured with rhIFN γ , rhIL2 and OKT3 over a 28-day period. **(A)** On days 0, 21 and 28, CB- and PB-CIK cells were stained with anti-CD3, anti-CD56 and anti-CD95 antibodies, and were analyzed by flow cytometry. Mean fluorescence intensity of Fas is shown for each population: CD3⁺CD56⁺, CD3⁺CD56⁻ and CD3⁻CD56⁺ CB- and PB-CIK cells, and activated T cells. T cells from PB mononuclear cells were activated by PHA (3.125 μ g/ml) and rhIL2 (40 IU/ml) for 8 days. In the histogram, CB cell populations are shown as white bars, PB cell populations are shown as black bars and activated T cells are shown as grey bars. Results are represented as the mean value \pm SEM. The experiment was repeated 2 to 6 times using independent CB- and PB-CIK cell cultures. * $p \leq 0.038$, ** $p \leq 0.0095$, Mann Whitney test (2-tailed). **(B)** A representative example of an overlay of Fas expression using flow cytometry for the different subpopulation of CB- and PB-CIK cells on days 0, 21 and 28, and activated T cells on days 0 and 8. Isotype control is depicted as a grey filled histogram and day 0, 21, and 28 as thin, bold, and dashed lines, respectively. **(C)** On day 21, CD56⁺ and CD3⁺CD56⁻ subpopulations were isolated from bulk CB- and PB-CIK cells using CD56 magnetic microbeads. The different fractions (bulk, CD56⁺ and CD3⁺CD56⁻) were incubated 18 h with CH11 (1 μ g/mL) or APO-1 (100ng/mL and 250ng/mL) antibodies. In the histogram, CB cell populations are shown as white bars, PB cell populations are shown as black bars, and activated T cells are shown as grey bars. The experiment was repeated 3 times using independent CB- and PB-CIK cell cultures. * $p \leq 0.01$, ** $p \leq 0.001$, Mann Whitney test (2-tailed).

Apoptosis was visualized using annexin and 7AAD. Cells were counted as apoptotic when they were annexin⁺/7AAD⁻ (early apoptotic), and annexin⁺/7AAD⁺ (late apoptotic). The percent specific apoptosis was calculated as follows: % specific apoptosis = ((% of experimental apoptosis) – (% spontaneous apoptosis)) / (100 – spontaneous apoptosis) x 100. Results are represented as the mean value +/-SEM.

Figure 2: Fas engagement inhibits the cytotoxic activity of CD56⁺ CB- and PB-CIK cells against the SU-DHL-4 cell line. The CD56⁺ fraction from CB- and PB-CIK cells were purified using CD56 magnetic microbeads. The cytotoxic activity of CD56⁺ CB- and PB-CIK cells was tested against the SU-DHL-4 cell line in the absence (thick lines) or presence of the CH11 antibody (1µg/mL; dashed lines) or the APO1 antibody (250µg/mL; thin lines). Results are represented as the mean value +/-SEM (n=2 independent CD56⁺ CB- and CD56⁺ PB-CIK cell cultures). The curves with the presence of the CH11 and APO-1 antibodies were compared to the curve without antibody. *p≤0.05, **p≤0.01 and ***p≤0.001, ANOVA test with a Bonferroni post-test.

Figure 4.1.A.

Figure 1A

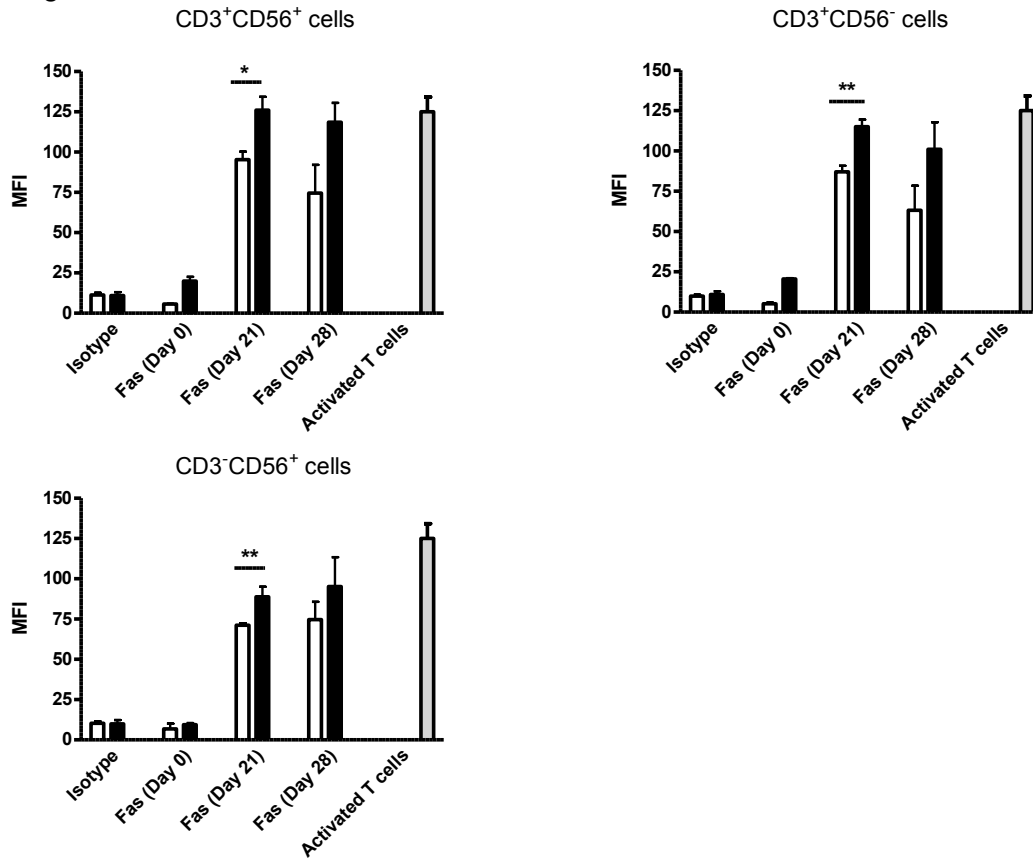


Figure 4.1.B.

Figure 1B

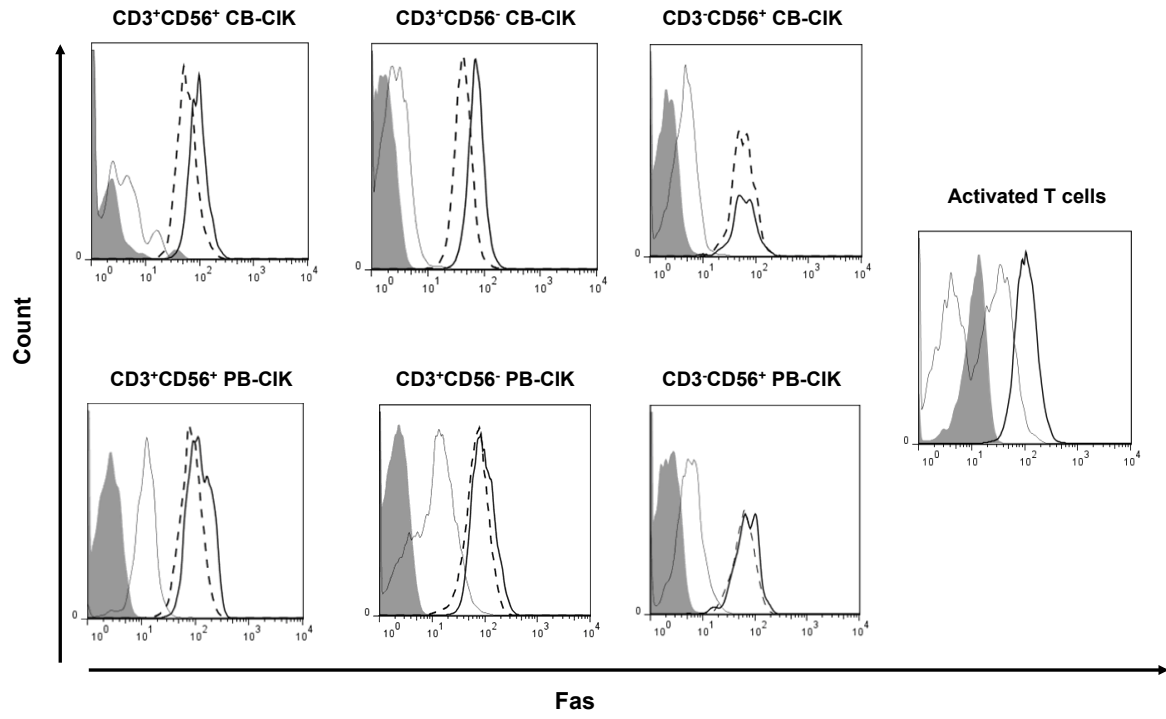


Figure 4.1.C.

Figure 1C

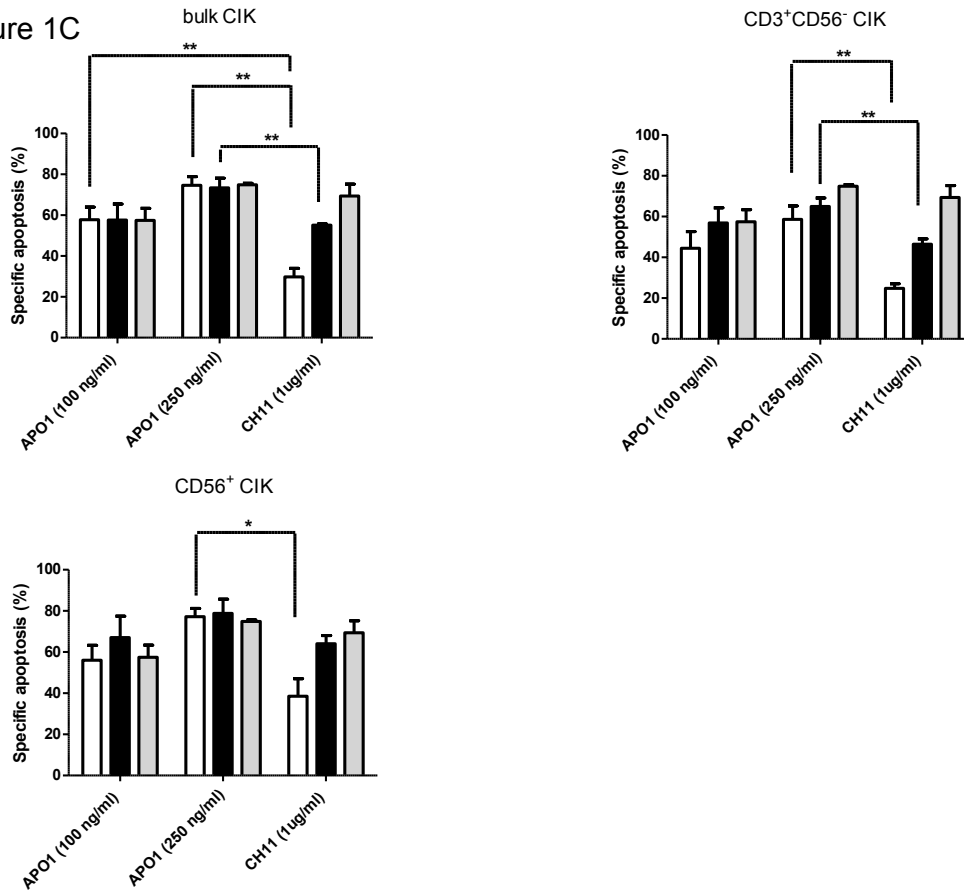
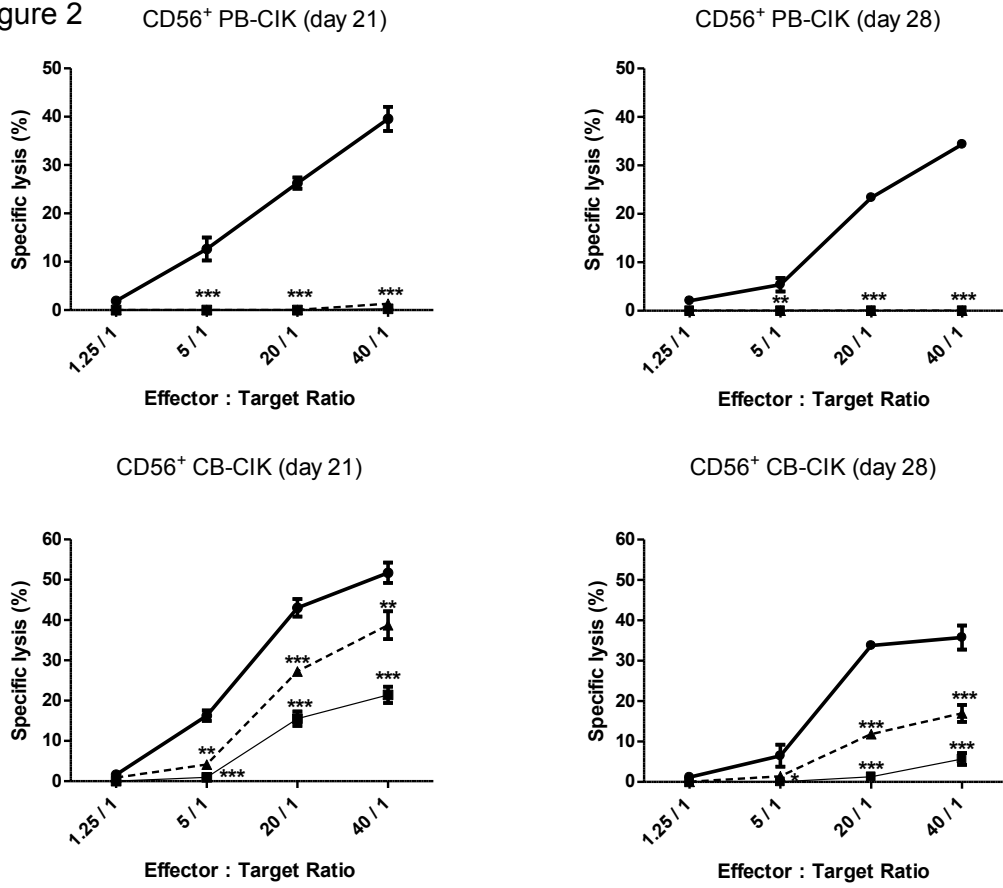


Figure 4.2.

Figure 2



CHAPITRE 5 : DISCUSSION

Au cours de mes études doctorales, j'ai étudié la population cellulaire nommée « les cellules CIK » afin de développer une nouvelle thérapie cellulaire contre la pré-B LAL chez les enfants en rechute de la maladie après TCSH. J'ai pu démontrer à la fois *in vitro* et *in vivo* dans un modèle murin xénogénique que les cellules CIK, plus particulièrement la fraction CD56⁺ des cellules CIK, sont cytotoxiques contre les cellules pré-B LAL, et que leur activité lytique peut être augmentée par un traitement à l'IFN- α . De plus, pour éliminer les cellules pré-B LAL, les cellules CD56⁺ de la culture CIK peuvent utiliser à la fois les voies NKG2D et TRAIL, selon la lignée cellulaire pré-B LAL utilisée. Selon la provenance des cellules mononucléées ayant servies à l'expansion des cellules CIK, l'efficacité du mécanisme d'action pour tuer la lignée cellulaire pré-B LAL peut différer. Il semble aussi que les cellules CD56⁺ dérivées de sang de cordon sont plus efficaces pour tuer les cellules pré-B LAL que celles obtenues avec des cellules mononucléées de sang périphériques. Enfin, les cellules CIK semblent être sensibles à l'apoptose par Fas, ce qui pourrait avoir un impact sur leur efficacité en clinique advenant leur utilisation chez un patient dont les cellules tumorales pourraient exprimer le FasL.

I- Utilisation des cellules tueuses induites par des cytokines dans le cadre de l'immunothérapie

Le protocole d'expansion des cellules CIK a été mis en place il y a environ une vingtaine d'années (Schmidt-Wolf, Negrin et al. 1991) et depuis, de nombreuses études ont démontré à la fois *in vitro* et *in vivo* dans des modèles murins xénogéniques, l'efficacité des cellules CIK pour éliminer les cellules tumorales (Introna, Franceschetti et al. 2006; Kim, Lim et al. 2007).

Par ailleurs, le mécanisme d'action de ces cellules a été étudié par quelques équipes, démontrant l'implication de certains récepteurs, tels que le NKG2D, le LFA-1 et le TRAIL (Schmidt-Wolf, Lefterova et al. 1993; Verneris, Karami et al. 2004; Kuci, Rettinger et al. 2010). De plus, il a été montré que l'utilisation *in vivo* des cellules CIK est sécuritaire, puisque leur injection dans les souris et chez les patients n'entraîne pas ni de toxicité ni de GVHD. C'est l'ensemble des caractéristiques citées ci-dessus qui nous a conduit à travailler sur ces cellules CIK, en particulier l'absence de GVHD suite à leur utilisation, comparativement aux cellules T, tout en ayant une activité anti-tumorale (Nishimura, Baker et al. 2008).

Il est vrai qu'avant le début de mon projet de doctorat, il a été observé dans quelques études que les cellules CIK ne sont pas efficaces à l'élimination des cellules LAL contrairement aux cellules LAM (Linn, Lau et al. 2002), et que la transduction du CAR-CD19 dans les cellules CIK permet d'augmenter la lyse des cellules LAL exprimant le récepteur CD19 (Marin, Kakuda et al. 2007). À l'inverse, une équipe a démontré que les cellules CIK dérivées de patients peuvent tuer de façon efficace les cellules LAL (Hongeng, Petvises et al. 2003). De plus, une autre étude a montré que l'activité cytotoxique des cellules CIK peut être améliorée par l'intermédiaire de cytokine (Zoll, Lefterova et al. 1998).

Ces différentes études, quelque peu contradictoires, nous ont encouragés à utiliser les cellules CIK pour développer une immunothérapie contre la pré-B LAL. Néanmoins, il a fallu utiliser ces cellules CIK selon un protocole différent de ce qui a déjà été fait si nous voulions observer une activité cytotoxique contre les cellules pré-B LAL.

Par ailleurs, nous avons décidé de développer notre stratégie immunothérapeutique à partir de sang de cordon, puisqu'il a été démontré que les cellules CIK peuvent être facilement

amplifiées à partir de sang de cordon, voir même à partir du résidu cellulaire des unités de sang de cordon après infusion chez les patients (Introna, Franceschetti et al. 2006), ce qui est intéressant, puisque la TCSH à partir de sang de cordon est de plus en plus utilisée chez les patients pédiatriques (mai 2012).

II- Stratégie d'une meilleure utilisation des cellules tueuses induites par des cytokines

Les cellules CIK sont différenciées à partir de cellules mononucléées de sang périphérique ou de sang de cordon. Au bout de vingt et un à vingt-huit jours de culture, il y a un mélange de trois populations cellulaires : c'est ce que nous appelons les cellules CIK. Les trois populations cellulaires qui constituent les cellules CIK sont les cellules $CD3^+CD56^-$ (lymphocytes T), les cellules $CD3^-CD56^+$ (cellules NK) et les cellules $CD3^+CD56^+$. La particularité des cellules CIK est l'expansion au cours de la culture des cellules doubles positives $CD3^+CD56^+$. Quelques études ont analysé l'activité cytotoxique de ces sous-populations cellulaires afin de déterminer si les trois types de cellules contribuent à l'élimination des cellules tumorales (Lu and Negrin 1994; Sangiolo, Martinuzzi et al. 2008). Comme nous l'avons observé et ce qui a été démontré, les cellules $CD3^+CD56^-$ ont peu ou pas d'activité lytique contre les cellules tumorales. Par contre, la fraction $CD56^+$ incluant les cellules $CD3^+CD56^+$ et $CD3^-CD56^+$, ainsi que les cellules $CD3^+CD56^+$ seules, peuvent tuer efficacement les cellules tumorales. Il est intéressant de noter que toutes les études effectuées avec les cellules CIK pour déterminer leur activité cytotoxique contre des cellules tumorales ont été réalisées à partir des cellules CIK non purifiées, et non des cellules cytotoxiques à savoir la fraction $CD56^+$ (Schmidt-Wolf, Negrin et al. 1991; Linn, Lau et al. 2002; Introna,

Franceschetti et al. 2006). Il en est de même pour les études impliquant les cellules CIK vis-à-vis des cellules LAL (Linn, Lau et al. 2002). De ce fait, nous avons décidé d'utiliser seulement la fraction $CD56^+$ des cellules CIK, puisque c'est cette fraction qui possède le potentiel cytotoxique, et que le reste des cellules ($CD3^+CD56^-$), n'intervienne pas dans la lyse tumorale. De plus, l'élimination des cellules $CD3^+CD56^-$ entraîne sûrement la suppression des cellules T régulateurs, qui peuvent favoriser une tolérance immunitaire vis-à-vis des cellules tumorales, et donc inhiber l'activité cytotoxique des cellules effectrices. En effet, l'ajout de l'IL-6 au début de la culture des cellules CIK permet d'augmenter la prolifération des cellules, ainsi que leur activité cytotoxique (Lin, Wang et al. 2012). Cette amélioration de l'activité lytique peut être reliée indirectement à la diminution des cellules T régulateurs dans la culture. De ce fait, la suppression des cellules T régulateurs lors de la sélection de la fraction $CD56^+$ pourrait donc favoriser l'activité cytotoxique contre les cellules tumorales, en particulier contre les cellules pré-B LAL. En effet, nous avons pu observer une augmentation de la lyse des cellules pré-B LAL en utilisant la fraction $CD56^+$ comparativement aux cellules CIK non purifiées. Il serait intéressant de récupérer les cellules T régulateurs classiques qui sont $CD3^+CD4^+CD25^+FoxP3^+$ de la culture afin de les ajouter dans la fraction $CD56^+$ lors des tests de cytotoxicité. Ceci nous permettrait de déterminer leur influence sur l'activité cytotoxique de la fraction $CD56^+$. Aussi, il faudrait regarder l'impact des cellules T régulateurs du patient sur l'activité cytotoxique des cellules CIK après injection. Des études approfondies aussi bien *in vitro* qu'*in vivo* seraient nécessaires, afin de savoir si l'activité cytotoxique des cellules CIK est inhibée par ces cellules régulatrices.

Par ailleurs, nous observons que la lyse des cellules pré-B LAL par les cellules CIK est plus faible que les autres lignées cancéreuses (K562 et U266; voir chapitre 3). D'autres équipes

ont également observé cet effet (Linn, Lau et al. 2002; Marin, Dander et al. 2006). Il serait donc intéressant d'étudier cet effet afin de comprendre ce qui peut rendre les cellules pré-B LAL plus résistantes à la lyse par les cellules CIK par rapport aux autres cellules cancéreuses. Par exemple, nous pourrions étudier la liaison cellulaire entre les cellules CIK et les cellules cibles, comme déjà testé sur des cellules LAM (Pievani, Borleri et al. 2011), et voir s'il y a une plus faible liaison avec les cellules pré-B LAL comparé à d'autres cellules cancéreuses. Aussi, il serait intéressant d'analyser l'implication du CMH sur l'activité cytotoxique des cellules CIK, puisqu'une équipe a montré que la lyse des cellules LAM par les cellules CIK est inhibée avec l'ajout d'un anticorps anti-CMH bloquant (Linn, Lau et al. 2009). De ce fait, une expression plus faible des molécules HLA de classe I sur les cellules pré-B LAL comparé aux autres cellules cancéreuses pourrait expliquer la faible cytotoxicité de ces cellules. Et il serait donc important de tester la voie du CMH/TCR sur les cellules pré-B LAL. Enfin, l'analyse complète des récepteurs inhibiteurs et activateurs des cellules NK se retrouvant sur les cellules CIK serait intéressante ainsi que les différents ligands de ces récepteurs sur les cellules pré-B LAL. Ceci pourrait peut-être expliquer pourquoi les cellules pré-B LAL sont moins sensibles aux cellules CIK que les cellules LAM (Linn, Lau et al. 2002). La différence pourrait se situer dans une « up-régulation » des ligands inhibiteurs et une « down-régulation » des ligands activateurs sur les cellules pré-B LAL comparé aux cellules LAM.

Plusieurs études ont modifié l'expansion des cellules CIK en ajoutant ou en inter-changeant une cytokine ou un anticorps. Il y a eu la comparaison entre l'IL-2 et l'IL-7, l'IL-2 et l'IL-15, l'OKT3 et la thymoglobuline, ou encore l'ajout de l'anticorps anti-CD137, pour ne citer que quelques uns (Zoll, Lefterova et al. 1998; Zhu, Ju et al. 2009; Bonanno, Iudicone et al. 2010; Kuci, Rettinger et al. 2010; Rettinger, Kuci et al. 2012). L'IL-7 a été utilisée pour sa capacité

à induire la prolifération des cellules T CD4⁺ et CD8⁺, (Chazen, Pereira et al. 1989; Hickman, Crim et al. 1990) et pour son implication dans l'activité des cellules LAK (Armitage, Namen et al. 1990; Jicha, Mule et al. 1991). L'IL-15 a été choisi pour son rôle majeur dans la différenciation et l'activation des cellules NK (Becknell and Caligiuri 2005). La thymoglobuline a été utilisée pour sa capacité dans la stimulation, la prolifération et la production de cytokines sur les lymphocytes (Deeks and Keating 2009). Enfin, l'anticorps anti-CD137 a été choisi pour son rôle dans la prolifération et production de cytokines par les cellules T et NK (Takahashi, Mittler et al. 2001). Tous ces cytokines et anticorps agissent donc au niveau des cellules T et/ou NK. Toutes ces études ont observé une amélioration de l'activité cytotoxique des cellules CIK. De ce fait, nous avons également voulu utiliser également une cytokine afin d'améliorer l'activité cytotoxique de la fraction CD56⁺ contre les cellules pré-B LAL. Nous nous sommes donc intéressés à la cytokine IFN- α . Cette cytokine est produite lors de réponses aux infections par divers types cellulaires incluant les DC. Des études ont montré que l'IFN- α est impliqué dans l'activation et la fonction des cellules T et NK (Lehtonen, Lund et al. 2003; Swann, Hayakawa et al. 2007). De plus, l'utilisation de l'IFN- α dans des essais cliniques chez des patients avec un mélanome métastatique (Gogas, Ioannovich et al. 2006), une LMC (Molldrem, Lee et al. 2000) et une LAL (Wassmann, Scheuring et al. 2003; Piccaluga, Martinelli et al. 2008) montre quelques réponses cliniques. Sachant que la sous-population cellulaire CD3⁺CD56⁺ des cellules CIK provient des cellules T qui acquièrent le marqueur CD56⁺ (Schmidt-Wolf, Lefterova et al. 1993), nous avons émis l'hypothèse que l'IFN- α pourrait à la fois influencer la fonction de cette sous-population et celle des cellules NK. Nous avons pu démontrer que le traitement par l'IFN- α sur la fraction CD56⁺ des cellules CIK entraîne une augmentation de la lyse des cellules pré-B LAL. De

plus, nous avons pu observer que le traitement par l'IFN- α agit sur l'expression de certains récepteurs de surface, dont le CD69 et le TRAIL. La molécule CD69 est un marqueur d'activation précoce qui est exprimé sur les lymphocytes T au tout début d'une réponse immunitaire et provoque l'activité cytotoxique de ces cellules NK, mais pas des cellules T α/β (Moretta, Poggi et al. 1991). L'augmentation de l'intensité de ce récepteur sur la sous-population cellulaire CD3⁺CD56⁺ pourrait laisser supposer que l'IFN- α augmenterait encore plus fortement l'activation de ces cellules, voir peut être leur effet cytotoxique. La molécule la plus intéressante est cependant le TRAIL, dont l'intensité (et le nombre) est également augmentée sur la population double positive CD3⁺CD56⁺. Plusieurs groupes ont déjà montré que l'IFN- α peut augmenter l'activité cytotoxique des cellules T et NK en augmentant l'expression de TRAIL (Kayagaki, Yamaguchi et al. 1999; Sato, Hida et al. 2001). Nous pouvons donc supposer que les cellules CD3⁺CD56⁺ utilisent en partie la cytotoxicité par TRAIL pour éliminer les cellules pré-B LAL lorsque traitées par l'IFN- α . Afin de démontrer ce mécanisme d'action des cellules CD56⁺, il faudrait tester l'activité cytotoxique avec ou sans l'IFN- α , sur une lignée cellulaire résistante à l'apoptose par TRAIL, comme la lignée K562 (Di Pietro, Secchiero et al. 2001; Qiu, Jiang et al. 2012). De ce fait, nous avons déjà confirmé que la lignée cellulaire K562 est bien insensible à l'apoptose par TRAIL (Figure 3.4). Ensuite, l'activité cytotoxique des cellules CD56⁺ traitées ou non par l'IFN- α contre la lignée cellulaire K562 devrait être testée. Si nous n'observons pas de différence de lyse des cellules cibles entre les cellules CD56⁺ traitées et celles non traitées par l'IFN- α , ce résultat permettra de confirmer que l'IFN- α agit sur l'activité cytotoxique des cellules CD56⁺ seulement par la voie TRAIL, puisque si d'autres voies lytiques sont impliquées, nous observerons une augmentation de la lyse des cellules K562.

Par ailleurs, nous avons analysé l'expression des récepteurs KIR sur les cellules CB-CIK (Figure 7 en annexe). Nous avons observé que les sous-populations cellulaires $CD3^+CD56^+$ et $CD3^+CD56^-$ n'expriment pas les récepteurs KIR tels que KIR2DL1, KIR2DL2/DL3 et KIR3DL1. Pour la sous-population cellulaire $CD3^-CD56^+$, il y a une petite partie des cellules qui exprime les récepteurs KIR2DL2/DL3 et KIR3DL1, mais pas KIR2DL1. L'effet de l'IFN- α n'entraîne pas de changement dans l'expression de ces trois récepteurs KIR. Il est important de noter que nous n'avons pas regardé l'ensemble des KIR sur les cellules CB-CIK, mais seulement les trois récepteurs déjà étudiés dans la littérature (Franceschetti, Pievani et al. 2009). Par ailleurs, nous avons analysé l'expression des récepteurs KIR seulement sur les cellules CIK provenant de sang de cordon. Il serait donc judicieux de faire également l'analyse de ces récepteurs sur les cellules CIK provenant de sang périphérique, puisque l'expression de ces récepteurs pourrait être différente comme nous l'avons observée avec d'autres récepteurs (voir chapitre 3). Aussi, le manque d'expression des récepteurs KIR sur les sous-populations cellulaires $CD3^+CD56^+$ et $CD3^+CD56^-$ n'est pas forcément étonnant, puisque ce sont des cellules T, et non des cellules NK. Cependant, il a déjà été montré que des cellules T CD8 peuvent acquérir des marqueurs KIR (Battistini, Borsellino et al. 1997; Bjorkstrom, Beziat et al. 2012). Enfin, comparé à l'étude d'Introna et al 2009, nous observons une différence d'expression des récepteurs KIR, à savoir une expression de ces récepteurs sur les sous-populations cellulaires $CD3^+CD56^+$ et $CD3^+CD56^-$. Ce résultat peut s'expliquer par le fait que les cellules provenant de sang de cordon comparé aux cellules de sang périphérique, puisqu'il existe des différences entre ces deux sources de cellules dans la fréquence de cellules T naïves et mémoires, et dans la fonction (Lin, Yan et al. 2012).

De plus, il serait intéressant de voir l'effet de l'IFN- α sur l'expression de certains marqueurs sur les cellules pré-B LAL, tels que les récepteurs DR4, DR5 et les ligands NKG2D. En effet, il a été montré dans la littérature que l'IFN- α stimule l'expression de ces récepteurs permettant ainsi l'élimination des cellules cancéreuses (Shigeno, Nakao et al. 2003; Zhang, Niu et al. 2008). Par conséquent, l'activité cytotoxique des cellules CIK serait peut-être plus efficace si les cellules pré-B LAL étaient traitées également par l'IFN- α .

Par ailleurs, l'IFN- α a aussi été montré à être impliqué dans la régulation du système immunitaire (Le Bon, Etchart et al. 2003; Le Bon, Schiavoni et al. 2001). L'IFN- α exerce ses effets sur les cellules immunitaires soit directement, à travers le récepteur de l'IFN- α , ou indirectement, (1) soit par l'induction de chimiokines, (2) soit la sécrétion du deuxième vague de cytokines, ou (3) soit la stimulation d'autres types cellulaires. Sachant que les cellules CIK, en particulier les cellules CD3⁺CD56⁺ partagent des propriétés fonctionnelles à la fois des cellules T et NK, l'IFN- α pourrait donc agir de plusieurs manières. Il a été montré que les IFN de type 1 améliorent la capacité des cellules NK à tuer les cellules cibles et à produire l'IFN- γ par des mécanismes directes ou indirectes (Nguyen, Salazar-Mather et al. 2002; Lee, Rao et al. 2000). Par conséquent, les IFN de type 1 permettent l'accumulation et/ou la survie des cellules NK par l'induction de l'IL-15 dépendant de la voie STAT1 (Nguyen, Salazar-Mather et al. 2002). Les IFN de type 1 améliorent aussi la production ou sécrétion d'autres cytokines à travers une boucle autocrine d'IFN- γ (Ortaldo, Phillips et al. 1980). Sur les cellules T CD4⁺, les IFN de type 1 ont été décrits à avoir des effets directs en favorisant leur différenciation en cellules T de type Th1 sécrétant l'IFN- γ (Brinkmann, Geiger et al. 1993). De plus, d'autres études indiquent que les IFN de type 1 pourraient agir sur les cellules T CD8⁺. Les effets des IFN de type 1 permettent la production de l'IFN- γ par ces cellules par la

voie dépendante de STAT4 (Nguyen, Watford et al. 2002), et permettent leur survie cellulaire (Marrack, Kappler et al. 1999). De plus, les IFN de type 1 agissent directement sur les cellules T CD8⁺, en favorisant leur prolifération et différenciation en cellules mémoires (Kolumam, Thomas et al. 2005). En complément, l'IFN- α pourrait réguler des gènes critiques impliqués dans les fonctions de LTC (Agarwal, Raghavan et al. 2009). Il serait donc important d'approfondir nos données sur l'implication de l'IFN- α sur les cellules CIK, et d'analyser plus en détail les différents effets que peut avoir cette cytokine sur ces cellules, comme par exemple sur la survie cellulaire, sur la production d'autres cytokines, et sur la différenciation. De plus, il faut s'assurer d'avoir un pourcentage et un nombre élevés de cellules CD3⁺CD56⁺ puisque l'activité cytotoxique provient essentiellement de cette sous-population cellulaire. Nous utilisons donc les cellules CIK entre vingt et un et trente-cinq jours de culture, puisque c'est à ce moment que l'amplification massive des cellules CD3⁺CD56⁺ a été répertoriée (Franceschetti, Pievani et al. 2009). Après 35 jours de culture, les cellules CIK, toutes sous-populations confondues, diminuent.

Il est important de noter que l'ensemble de ces expériences a été réalisé en utilisant des lignées pré-B LAL, et que les résultats observés peuvent être différents sur des blastes primaires de patients. Une expérience préliminaire a été effectuée, mais malheureusement nous n'avons pas pu analyser le résultat, puisque l'incorporation du chrome dans les blastes de patients était faible. En effet, il est important d'avoir une bonne incorporation du chrome dans les cellules cibles (minimum 600 cpm) afin de pouvoir interpréter le résultat. Une incorporation plus faible rendrait le résultat peu fiable, puisque le relargage spontané peut atteindre 200 cpm. Par ailleurs, une expérience de l'activité cytotoxique des cellules CIK contre des blastes de patients a été effectuée en cytométrie de flux. Nous avons observé que

les cellules CIK peuvent lyser les blastes de patients à environ 30% de lyse pour le ratio 1/40. Il serait donc intéressant d'utiliser la technique de cytotoxicité par la cytométrie de flux afin de ne plus avoir de problème d'incorporation du chrome dans les blastes de patients. De plus grâce à cette technique, nous pourrions tester l'activité cytotoxique des cellules CIK à quatre heures d'incubation avec les cellules tumorales, mais aussi à un temps plus long d'exposition. En effet, il se pourrait qu'une plus grande exposition des cellules CIK avec les cellules tumorales puisse augmenter la lyse de ces dernières.

D'autre part, il faudrait analyser les différentes molécules exprimées à la surface des cellules pré-B LAL, en particulier les molécules immuno-tolérantes qui permettent aux cellules tumorales d'échapper au système immunitaire. Il y a deux récepteurs de modulation qui ont été largement étudiés, à savoir le récepteur CTLA4 (cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4) et le récepteur PD1 (programmed cell death protein). Ces deux récepteurs sont des inhibiteurs qui permettent de réguler les réponses immunes à différents niveaux et par différents mécanismes.

Le récepteur CTLA4 est exprimé exclusivement sur les cellules T dont son rôle principal est de réguler l'amplification des cellules T activées. Ce récepteur entre en compétition avec le récepteur de co-stimulation CD28 (Schwartz. 1992; Lenschow, Walunas et al. 1996; Rudd, Taylor et al. 2009). Les récepteurs CD28 et CTLA4 partagent les mêmes ligands, tels que les molécules CD80 et CD86 (Hathcock et al. 1993; Freeman et al. 1993; Azuma et al. 1993). De ce fait, les cellules pré-B LAL pourraient exprimer les ligands de CTLA4 afin de bloquer la prolifération des cellules effectrices.

En opposition au récepteur CTLA4, le rôle majeur du récepteur PD1 est de limiter l'activité des cellules T dans les tissus périphériques lors d'une infection ou de limiter l'autoimmunité

(Ishida, Agata et al. 1992; Freeman et al. 2000; Keir et al. 2006). L'expression du récepteur PD1 est induite quand les cellules T sont activées (Ishida, Agata et al. 1992). Les deux ligands de PD1 sont PDL1 et PDL2 (Freeman et al. 2000; Dong, Zhu et al. 1999; Latchman et al. 2000). Quand le récepteur PD1 interagit avec ses ligands, il inhibe les kinases qui sont impliquées dans l'activation des cellules T (37). De ce fait, ce serait aussi un mécanisme que pourrait utiliser les cellules pré-B LAL pour échapper aux cellules effectrices.

L'étude de ces deux molécules modulatrices de la réponse immune ainsi que de leurs ligands permettrait peut-être de comprendre pourquoi les cellules pré-B LAL sont plus résistantes à la lyse par les cellules CIK que les autres cellules tumorales. De plus, il faudrait regarder l'effet de l'IFN- α sur l'expression de ces différentes molécules, afin de savoir s'il y a une augmentation ou diminution de ces récepteurs.

III- Développement de l'immunothérapie dans un modèle murin xénogénique

Pour développer un nouveau traitement d'immunothérapie cellulaire contre la LAL, nous avons utilisé un modèle préclinique constitué de souris NSG. Ces souris sont extrêmement immunodéficientes, puisqu'elles ne possèdent pas de lymphocytes T, B et de cellules NK. L'absence de ces populations cellulaires est due au fait qu'elles ne peuvent plus faire le réarrangement des chaînes TCR et BCR (B receptor cell), donc les cellules T et B ne peuvent plus se différencier et par conséquent meurent. Ceci est provoqué par la mutation de perte de fonction du gène *Prkdc*^{SCID}. Ce gène code pour une protéine qui répare les cassures de l'ADN, un processus qui se déroule dans le développement des lymphocytes T et B (recombinaison V(D)J). De plus, les souris ne possèdent plus la chaîne γ du récepteur à l'IL-2, laquelle est

commune à plusieurs cytokines impliquées dans le développement des lymphocytes et cellules NK. Par conséquent, ces souris n'ont pas de cellules NK. En plus, les souris sont sous le fond génétique NOD, ce qui fait que leurs macrophages et DC ont une fonction diminuée. De ce fait, ces souris ne rejettent pas des cellules humaines qui leur sont injectées. Nous avons aussi préféré les souris NSG aux souris NOD/SCID et nude, car les souris NOD/SCID possèdent toujours des cellules NK qui sont fonctionnelles et de ce fait ont une activité cytotoxique contre des cellules xénogéniques. D'autre part, les souris nude, par l'absence d'un thymus, n'ont pas de lymphocytes T, mais ont toujours des cellules NK qui peuvent agir sur les cellules xénogéniques (Carreno, Garbow et al. 2009; Sartelet, Durrieu et al. 2012) . Nous avons démontré qu'une lignée pré-B LAL injectée dans les souris NSG se développe plus rapidement que dans les souris NOD/SCID (données non montrées). De plus, le traitement par l'IFN- α d'origine murine entraîne une forte prolongation de la survie des souris NOD/SCID, et n'a aucun effet dans le modèle utilisant les souris NSG, laissant suggérer que l'IFN- α agit sur les cellules NK, puisque la différence entre ces deux modèles de souris se situent au niveau de la présence des cellules NK.

Nous avons donc utilisé la fraction CD56⁺ des cellules CIK que nous avons traitée par l'IFN- α avant d'injecter dans les souris NSG en même temps que la lignée pré-B LAL. Nous avons pu observer une prolongation de la survie des souris lorsqu'elles reçoivent à la fois la lignée pré-B LAL et la fraction CD56⁺ comparativement à celles ne recevant que la lignée pré-B LAL. De plus, le traitement par l'IFN- α permet d'augmenter encore plus la survie des souris, de façon significative. Il aurait été intéressant d'étudier plus en détail le traitement de l'IFN- α sur les cellules CD56⁺, à savoir si l'injection de l'IFN- α au quotidien dans les souris est nécessaire ou si seulement la pré-incubation avec les cellules CD56⁺ avant injection est

suffisante. Il faudrait donc répéter l'expérience du chapitre 2 (Figure 2.7), en ajoutant un groupe de souris NSG recevant la lignée pré-B LAL avec les cellules CD56⁺ non traitées par l'IFN- α et recevant au quotidien de l'IFN- α . De plus, il y aurait un groupe de souris NSG recevant la lignée pré-B LAL avec les cellules CD56⁺ traitées par l'IFN- α , mais n'étant pas traité au quotidien par l'IFN- α .

Par ailleurs, il serait intéressant d'étudier l'implication de l'augmentation de l'expression de TRAIL sur les cellules CIK par l'IFN- α (Figure 2.6; chapitre 2), à savoir si l'effet bénéfique observé *in vivo* est dû à celle-ci. Pour répondre à cette hypothèse, il faudrait répéter la même expérience (voir figure 2.7; chapitre 2) mais en utilisant la lignée cellulaire NALM6, puisque nous avons démontré que les cellules CB-CIK sans traitement par l'IFN- α n'utilisent pas la voie TRAIL pour tuer cette lignée (figure 3.5; chapitre 3). De plus, il faudrait ajouter un groupe de souris qui serait traité par un anticorps bloquant la voie TRAIL. Si nous observons une augmentation de la survie dans le groupe de souris injectées avec les cellules CB-CIK et traitées par l'IFN- α , mais pas dans le groupe de souris injectées avec les cellules CB-CIK, et traitées par l'IFN- α et par l'anticorps bloquant (qui devrait être comparable au groupe de souris non traitées avec l'IFN- α), alors nous pourrions confirmer que l'augmentation de l'expression de TRAIL par l'IFN- α sur les cellules CIK est responsable de cet effet bénéfique. Par la suite, le point faible de notre modèle d'immunothérapie dans les souris NSG est que toutes les souris finissent par mourir, qu'aucune ne parvient à éliminer complètement les cellules pré-B LAL injectées, et que la prolongation de la survie, même si elle est significative, reste modérée (10 jours). Cette augmentation de la durée de survie est quand même encourageante, puisque les souris NSG ne produisent pas de cytokine humaine, en particulier l'IL-2 et l'IL-15, qui sont deux cytokines importantes pour la prolifération et la

survie des lymphocytes T et des cellules NK. Par conséquent, lors de l'injection de la fraction CD56⁺ des cellules CIK, les cellules se retrouvent subitement dépourvues d'IL-2, étant donné que nous n'injections pas cette cytokine dans les souris. Sachant que nous ajoutons l'IL-2 à chaque changement de milieu lors de la culture cellulaire, les cellules CIK se retrouvent donc en carence. Il n'est donc pas forcément surprenant de n'observer qu'une courte prolongation de la survie des souris NSG. En plus, nous avons montré que le nombre de cellules CD3⁺ humaines diminue après injection dans le sang des souris, alors que ce n'est pas le cas lors de l'injection de ces cellules chez les patients (Olioso, Giancola et al. 2009; Yang, Lu et al. 2012). Aussi dans une expérience préliminaire, nous avons pu démontrer que le pourcentage des cellules CIK injectées dans les souris est plus élevé lorsque les souris reçoivent de l'IL-2 au quotidien (Figure 1 en annexe).

Par ailleurs, il serait important de mieux étudier la persistance des cellules CIK chez les patients injectées. La durée de vie de ces cellules serait essentielle à être déterminée, afin de savoir si elles peuvent toujours éliminer les cellules tumorales, et de savoir si une ré-injection de cellules CIK est nécessaire. L'ensemble des études cliniques ne fait pas une analyse à long terme (plusieurs années) de la présence des cellules CIK chez les patients ayant eu une réponse complète et survivant pendant plusieurs années. De plus, dans ces études, ils ne parlent que de l'augmentation des populations cellulaires, en particulier les cellules CD3⁺CD56⁺, et non de la survie cellulaire.

Vu que le point critique concerne la survie des cellules CIK, nous pourrions envisager de modifier ces cellules en rajoutant par exemple un gène de cytokine afin d'éviter une mortalité précoce dans les souris NSG. L'introduction de l'IL-2 dans les cellules CIK pourrait prolonger leur survie dans les souris NSG. Nous pourrions aussi ajouter le gène de l'IFN- α

dans les cellules CIK, afin que ce dernier agisse directement sur les cellules, et évitant l'injection au quotidien des souris avec cette cytokine.

IV. Absence de toxicité des cellules tueuses induites par des cytokines

Une des caractéristiques majeures des cellules CIK est qu'elles n'induisent pas ou très peu de GVHD lors de leur injection chez les souris et chez l'homme (Schmidt-Wolf, Finke et al. 1999; Introna, Borleri et al. 2007; Nishimura, Baker et al. 2008) contrairement à l'injection des DLI. Il a été démontré que la faible toxicité des cellules CIK repose en partie dans une prolifération diminuée de ces cellules et une migration plus faible dans les organes cibles de GVHD, comme les intestins et le foie (Nishimura, Baker et al. 2008). De plus, il a été suggéré que la forte production de la cytokine IFN- γ par les cellules CIK permet d'éviter le déclenchement de la GVHD dans les souris (Baker, Verneris et al. 2001). Nous avons démontré dans le modèle de souris NSG irradiées que l'injection de la fraction CD56⁺ des cellules CIK n'entraîne ni de mortalité des souris, ni de signe de GVHD. De plus, le traitement par l'IFN- α induit très peu de GVHD lorsque la fraction CD56⁺ des cellules CIK est injectée dans les souris. Cependant, nos expériences de l'effet GVHD des cellules CIK dans le modèle de souris NSG ont été effectuées seulement avec des cellules CIK provenant de sang de cordon. Il serait donc judicieux de faire les mêmes expériences en utilisant les cellules CIK de sang périphérique, puisque nous observons *in vitro* des différences au niveau de l'expression de certains marqueurs (voir figure 3.2; chapitre 3), et aussi au niveau du mécanisme d'action (voir figure 3.4; chapitre 3) entre les cellules CIK provenant de sang de cordon et de sang périphérique. Néanmoins, il ne devrait pas y avoir de différence de l'effet

GVHD des cellules CIK, puisqu'il a déjà été démontré par d'autres équipes que les cellules CIK de sang périphérique n'induisaient pas ou peu d'effet GVHD (Schmidt-Wolf, Negrin et al. 1991; Nishimura, Baker et al. 2008).

Par ailleurs, un patient atteint d'un hépatocarcinome recevant des cellules CIK avec de l'IFN- α dans le cadre d'un essai clinique s'est retrouvé en rémission complète, sans aucune toxicité attribuable à l'injection des cellules CIK et de l'IFN- α (Olios, Giancola et al. 2009). Ce résultat est fort pertinent et il serait donc intéressant de tester dans un nombre plus élevé de patients les cellules CIK avec l'IFN- α .

V. Mécanisme d'action des cellules tueuses induites par des cytokines

Le mécanisme d'action des cellules CIK a été étudié par plusieurs équipes. Les cellules CIK utilisent le récepteur LFA-1 pour interagir avec les cellules cibles exprimant à leur surface ICAM-1 (Lu and Negrin 1994). De plus, les cellules CIK n'utilisent pas la reconnaissance du complexe TCR/CMH pour supprimer les cellules tumorales, tel que démontré par l'absence d'inhibition par des anticorps bloquants dirigés contre ces récepteurs (Lu and Negrin 1994). Il a également été démontré que les cellules CIK éliminent les cellules tumorales par l'intermédiaire du récepteur NKG2D et que les cellules cibles peuvent exprimer les ligands de NKG2D (Verneris, Karami et al. 2004). Un point critique de cette étude est que le mécanisme d'action des cellules CIK a été analysé que sur une seule lignée cellulaire, alors que certaines études en font référence au niveau de l'introduction et affirme que les cellules CIK tuent principalement les cellules tumorales par la voie du NKG2D, en omettant de mentionner que l'étude a été réalisée seulement avec des cellules myéloïdes (Kornacker, Verneris et al. 2006;

Sangiolo, Martinuzzi et al. 2008). Quelques équipes ont poursuivi l'analyse de ce mécanisme d'action cytotoxique des cellules CIK. Une étude a démontré que les cellules CIK peuvent tuer les lignées cellulaires de lymphome B en utilisant le récepteur NKG2D, ainsi que d'autres récepteurs, dont le NKp30 et le DNAM-1 (Pievani, Borleri et al. 2011). De plus, ils ont observé que les cellules CIK peuvent ne pas utiliser la voie du NKG2D pour tuer les cellules tumorales comme la lignée RAJI, alors qu'elles l'utilisent contre la lignée MOLT4. Dans une autre étude, les auteurs ont regardé l'efficacité des cellules CIK contre le rhabdomyosarcome (Kuci, Rettinger et al. 2010), où ils ont démontré que la voie principale utilisée passe par le récepteur NKG2D, mais qu'il est aussi possible d'emprunter le mécanisme TRAIL.

Lorsque nous avons commencé à analyser le mécanisme d'action des cellules CIK, nous nous sommes tout d'abord intéressé à la voie de perforine/granzyme, tel que déjà démontré (Mehta, Schmidt-Wolf et al. 1995). Nous avons d'abord observé la présence de perforine, granzyme B et granulysine dans les cellules CIK (Figure 3.2). Par la suite, nous avons utilisé des inhibiteurs de la voie perforine/granzyme, tels que EGTA/MgCl₂ (ethylene glycol tetraacetic acid / chlorure de magnésium) et Concanamycine A (CMA). Il a été montré que le chélateur de calcium EGTA permet d'inhiber la voie perforine/granzyme qui est dépendante du calcium, mais pas la voie Fas/FasL (Rouvier, Luciani et al. 1993; Brandau, Suttman et al. 2000). Nous avons aussi rajouté le MgCl₂ avec le EGTA afin de conserver le contact cellulaire (Martz 1980). Pour le CMA, il a été décrit à être un inhibiteur spécifique de l'activité lytique faisant intervenir perforine. En effet, il inhibe spécifiquement les ATPase vacuolaires de type H⁺ et la fonction des granules lytiques, tandis que la cytotoxicité induite par Fas/FasL n'est pas touchée (Kataoka, Takaku et al. 1994; Kataoka, Shinohara et al. 1996).

De plus, ces 2 inhibiteurs ne devraient avoir aucun effet sur la voie TRAIL, puisque cette voie et celle de Fas/FasL ont les mêmes molécules intracellulaires qui interviennent dans l'apoptose des cellules cibles, telles que FADD et caspase 8 (Chavez-Galan, Arenas-Del Angel et al. 2009; Falschlehner, Schaefer et al. 2009). Nous avons observé que l'activité cytotoxique des cellules CD56⁺ contre les lignées cellulaires pré-B LAL est complètement ou quasiment inhibée en présence de EGTA/MgCl₂ et de CMA (Figure 2 et 3 respectivement en annexe). Ce premier résultat nous a laissé supposé que les cellules CD56⁺ utilisent seulement la voie perforine/granzyme pour tuer les cellules pré-B LAL. Pour renforcer ce résultat, nous avons donc effectué des expériences de dégranulation qui permettent de visualiser si les cellules CIK peuvent libérer la perforine et le granzyme B lors de leur interaction avec les cellules pré-B LAL. Nous avons observé que les sous-populations cellulaires CD3⁺CD56⁺ et CD3⁻CD56⁺ ne dégranulent pas contre les cellules pré-B LAL, mais le font contre les cellules cibles contrôles K562 (Figure 4 en annexe). Ceci laisse supposer que les cellules CD56⁺ n'utilisent pas la voie perforine/granzyme pour tuer les cellules pré-B LAL, vu que nous n'observons pas de dégranulation. Soit la technique de dégranulation n'est pas la technique idéale dans notre modèle, soit les deux inhibiteurs utilisés ne sont pas spécifiques pour la voie perforine/granzyme, mais peuvent bloquer d'autres voies. Néanmoins, nos résultats de dégranulation sont en concordance avec la littérature, puisqu'il a déjà été observé aucune dégranulation des cellules CIK par une autre équipe (Pievani, Belussi et al. 2011). En effet, contre la lignée BJAB, un lymphome B, les trois sous-populations cellulaires ne dégranulent pas. Un des points critiques de cet article est que les auteurs ne discutent pas de ce résultat, c'est-à-dire qu'ils observent une lyse des cellules tumorales par les cellules CIK sans dégranulation. Suite à l'ensemble de ces résultats, nous n'avons pas pu conclure sur le

mécanisme cytotoxique qu'utilise les cellules CD56⁺ pour tuer les cellules pré-B LAL. De ce fait, nous avons donc analysé le mécanisme d'action des cellules CD56⁺ contre deux lignées cellulaires pré-B LAL, REH et NALM-6 en utilisant des anticorps bloquant et en observant la sensibilité de nos lignées cellulaires pré-B LAL aux voies Fas et TRAIL. Suite aux différentes études sur le mécanisme de cytotoxicité des cellules CIK publiées dans la littérature, nous avons regardé plusieurs voies susceptibles d'être utilisées par ces cellules. Nous avons donc testé les voies du NKG2D, TRAIL, Fas, NKp30 et NKp44. Nous avons démontré que les cellules CIK utilisent à la fois ou séparément les voies NKG2D et TRAIL, dépendamment de la lignée cellulaire pré-B LAL et de la source des cellules CIK. En effet, les cellules CIK dérivées de sang de cordon utilisent les voies NKG2D et TRAIL contre la lignée REH, et seulement la voie NKG2D contre la lignée NALM6. Pour les cellules CIK dérivées de sang périphérique, les résultats sont inversés, à savoir qu'elles utilisent seulement la voie NKG2D pour tuer la lignée cellulaire REH, et les voies NKG2D et TRAIL pour éliminer la lignée cellulaire NALM6. Par conséquent, la voie faisant intervenir le récepteur NKG2D n'est pas toujours le mécanisme préférentiellement utilisé par les cellules CIK. De plus, dans nos tests d'inhibition des voies NKG2D et TRAIL, nous n'avons pas toujours observé une inhibition complète laissant suggérer que les cellules CIK peuvent utiliser une ou plusieurs voies supplémentaires pour éliminer les cellules pré-B LAL. Il serait donc intéressant de déterminer les autres voies qui seraient impliquées dans la lyse des cellules pré-B LAL. Les autres récepteurs à tester peuvent être par exemple le DNAM-1 tel que déjà montré dans une étude (Pievani, Borleri et al. 2011), et le TCR/CMH, afin de confirmer que la lyse des cellules pré-B LAL par les cellules CIK se fait bien de façon non spécifique.

L'ensemble de tous ces résultats démontre bien l'implication des voies NKG2D et de TRAIL, ce qui laisse suggérer que les inhibiteurs, EGTA/MgCl₂ et CMA, ne sont pas spécifique à la voie perforine, puisque la voie TRAIL est impliquée dans la lyse des cellules pré-B LAL. Par ailleurs, pour l'implication de la voie NKG2D, ce résultat peut sembler ambiguë, puisque nous n'observons pas de dégranulation. En effet, il a été démontré depuis plusieurs années que l'engagement du récepteur NKG2D dans les cellules effectrices déclenche la libération de perforine et granzyme B (Perussia 2000; Hayakawa and Smyth 2006). Sachant que nous et d'autres équipes avons démontré que les cellules CIK utilisent le récepteur NKG2D pour éliminer les cellules tumorales, il est vraiment incohérent de ne pas observer de dégranulation. De plus, comme une autre équipe avant nous, nous avons observé que les cellules CIK ont la capacité de dégranuler par le récepteur NKG2D (Figure 5 en annexe), mais que cette capacité de dégranulation est plus faible comparé à celle provoquée par le récepteur CD3 (Pievani, Borleri et al. 2011) (Figure 5 en annexe). L'ensemble de ces résultats laisse supposer que l'engagement du récepteur NKG2D n'implique pas automatiquement la dégranulation de la perforine et du granzyme B. Par conséquent, notre hypothèse est que la fraction CD56⁺ des cellules CIK utilise le récepteur NKG2D sans provoquer de dégranulation et qu'il y a donc une nouvelle autre voie que celle de la dégranulation qui induit la cytotoxicité de la cible après l'engagement du récepteur NKG2D. Pour répondre en partie à cette hypothèse, il faudrait revoir la voie du récepteur NKG2D, à savoir toutes les molécules intracellulaires qui sont impliquées jusqu'à la libération de la perforine et du granzyme B. Tout d'abord, il serait intéressant de voir l'implication directe de la perforine dans la lyse des cellules pré-B LAL. Pour cela, on pourrait utiliser des cellules CIK provenant de patients déficients en perforine ou en Munc13.4 (protéine essentielle pour le processus de dégranulation) ou bien supprimer

l'ARN messenger de la perforine ou Munc13-4. La suppression de l'ARN messenger est un processus appelé siRNA, c'est-à-dire que le siRNA va interférer au niveau de l'ARN messenger cible, et va bloquer la traduction ou alors va entraîner la dégradation. En transduisant un siRNA spécifique de perforine ou Munc13.4 dans les cellules CIK, nous pourrions tester l'implication de ces deux molécules dans l'activité cytotoxique de ces cellules contre les cellules pré-B LAL. Si nous observons toujours une lyse des cellules pré-B LAL, ceci indiquera que les cellules CIK n'utilisent pas la voie de la dégranulation. Par contre, s'il y a une diminution de l'activité cytotoxique des cellules CIK contre les cellules pré-B LAL, ceci réfutera notre hypothèse et laissera supposer que la technique de dégranulation ne serait pas fiable. Dans tous les cas, une étude approfondie de la voie du NKG2D qui est déclenchée dans les cellules CIK est nécessaire pour mieux comprendre le fonctionnement de ce récepteur dans ces cellules, en regardant toutes les molécules intracellulaires connues qui sont impliquées, telles que DAP10 (DNAX activating protein), DAP12 et PI3-Kinase (phosphatidyl-inositol-3-kinase), pour ne citer que certaines d'entre elles (Perussia 2000; Smyth, Cretney et al. 2005). La technique du siRNA est le meilleur moyen pour voir l'engagement de ces molécules intracellulaires. Bien sûr, afin de voir le lien direct avec le récepteur NKG2D, l'utilisation de l'anticorps bloquant est nécessaire. Par exemple, si nous observons une diminution semblable de l'activité cytotoxique des cellules CIK en inhibant DAP10 par un siRNA, comparé à l'utilisation d'un anticorps bloquant la voie du NKG2D avec des cellules CIK normales, ceci suggèrera un lien entre NKG2D et DAP10. Aussi, il ne faudra pas observer d'effet cumulatif de la diminution de l'activité cytotoxique des cellules CIK dépourvues de DAP10 quand l'anticorps bloquant la voie NKG2D est rajouté, car si nous

observons un effet cumulatif, ceci révélera que le déclenchement de la voie du NKG2D dans les cellules CIK ne fait pas intervenir la molécule DAP10.

Enfin, il pourrait être intéressant de regarder les cellules pré-B LAL en elles-mêmes, c'est-à-dire d'analyser le processus qui est déclenché dans ces cellules, tel que l'activation des différentes caspases ou encore la voie de la mitochondrie. Ces processus induisant la mort cellulaire ont déjà été décrites, et peuvent être déclenchées par les voies de perforine/granzymes, de Fas/FasL et TRAIL (Cullen and Martin 2008; Chavez-Galan, Arenas-Del Angel et al. 2009; Falschlehner, Schaefer et al. 2009).

Il se pourrait cependant que le récepteur NKG2D joue un autre rôle sur les cellules CIK que celui de l'engagement de l'activité cytotoxique par la dégranulation. En effet, le récepteur NKG2D pourrait intervenir dans la prolifération, la production d'IFN- γ ou la production de TNF- α en association avec d'autres activateurs (Andre, Castriconi et al. 2004; Bryceson, March et al. 2005; Carbone, Neri et al. 2005).

Il est important de noter que toutes les expériences sont effectuées avec des lignées cellulaires pré-B LAL, et de ce fait, le résultat peut être différent en utilisant des blastes de patients. Ceci pourrait être le cas vu que nous observons des différences de mécanisme utilisées par les cellules CIK entre chaque lignée cellulaire. De plus, ces expériences ont été réalisées *in vitro*, et il serait intéressant de voir le processus mécanistique des cellules CIK contre les cellules pré-B LAL *in vivo*.

VI. Sensibilité de l'apoptose par Fas des cellules tueuses induites par des cytokines

Un des mécanismes d'échappement des cellules tumorales au système immunitaire est l'expression de FasL sur leur membrane et la sécrétion de ce ligand dans le microenvironnement (O'Connell, O'Sullivan et al. 1996; Niehans, Brunner et al. 1997). Par conséquent, la présence de FasL au niveau membranaire et/ou dans le microenvironnement tumoral peut provoquer l'apoptose des cellules exprimant Fas en particulier les cellules T et NK. Il est donc important d'analyser la sensibilité des cellules CIK à l'apoptose par Fas afin de s'assurer qu'elles sont encore efficaces contre des cellules tumorales exprimant FasL. L'équipe de Verneris *et al* a montré que les cellules CIK sont résistantes à l'apoptose par Fas vis-à-vis soit d'anticorps provoquant l'apoptose ou de cellules exprimant FasL (Verneris, Kornacker et al. 2000). De plus, ils ont observé que cette résistance à l'apoptose provient de l'expression des protéines anti-apoptotiques. Un des points faibles de ce papier est que lors des expériences de sensibilité à l'apoptose, les auteurs ne précisent pas exactement à quel jour de culture les cellules CIK sont utilisées. Ils disent seulement entre les jours vingt et un et vingt-huit de culture. Cette information est cruciale puisqu'ils observent une diminution de l'expression de Fas entre les jours vingt et un et vingt-huit de culture. Par conséquent, les cellules CIK pourraient passer d'un état de sensible à un état de résistante à l'apoptose par Fas du jour vingt et un au jour vingt-huit. De notre côté, lors de nos expériences de sensibilité, nous avons observé un résultat opposé, à savoir que les cellules CIK sont sensibles et non résistantes à l'apoptose par Fas. Pour expliquer ces différences, il est à noter que les expériences ont été effectuées avec des anticorps qui ne représentent pas de façon physiologique ce qui peut se dérouler *in vivo*. Cependant, d'autres expériences sont

nécessaires pour comprendre l'impact de ce résultat, à savoir la sensibilité des cellules CIK à l'apoptose par Fas vis-à-vis de leur efficacité contre les cellules tumorales exprimant et/ou sécrétant le FasL. Il serait intéressant d'utiliser des modèles plus physiologiques, à savoir des cellules tumorales exprimant FasL telles que la lignée K562 (Figure 6 en annexe). En utilisant cette lignée, nous pourrions étudier si le FasL exprimé à leur surface peut induire l'apoptose des cellules CIK. Si tel est le cas, il faudra par la suite supprimer l'expression de FasL par la technique du siRNA afin de valider que l'apoptose des cellules CIK est bien déclenchée par le contact Fas/FasL. Par ailleurs, il serait essentiel de le tester dans des modèles animaux en utilisant à la lignée K562 exprimant FasL et celle dépourvue de FasL, et voir l'efficacité de l'éradication de la tumeur par les cellules CIK. Si les cellules CIK éliminent plus rapidement la tumeur ou permet une survie des souris plus longue quand elles sont face à la lignée cellulaire dépourvues de FasL, ceci reflètera la sensibilité des cellules CIK à l'apoptose par Fas. Pour ce qui concerne les essais cliniques chez les patients, il serait intéressant d'observer l'expression de FasL sur les tumeurs et de voir si il y a une corrélation entre l'efficacité des cellules CIK et l'expression de FasL sur les tumeurs.

VII. Conclusions

La pré-B LAL est le cancer le plus fréquent chez les enfants et de 10 à 20% des patients pédiatriques rechutent de la maladie après TCSH et en meurent. Il est donc important de trouver de nouveaux traitements. Mon projet de recherche de doctorat a consisté à proposer une nouvelle immunothérapie contre la pré-B LAL.

J'ai pu développer *in vitro* et *in vivo* dans un modèle murin xénogénique une nouvelle stratégie d'immunothérapie cellulaire contre la pré-B LAL. Cette thérapie consiste à utiliser la

fraction CD56⁺ des cellules CIK dérivées de sang de cordon et de les traiter avec l'IFN- α avant injection, et chaque jour après injection. J'ai pu démontrer que cette stratégie d'immunothérapie permet d'augmenter la survie des souris. De plus, j'ai pu détailler le mécanisme d'action utilisé par la fraction CD56⁺ des cellules CIK, à savoir que ces cellules utilisent la ou les voie(s) NKG2D et/ou TRAIL, dépendamment de la lignée cellulaire pré-B LAL utilisée. Aussi, j'ai pu observer que la fraction CD56⁺ des cellules CIK dérivées du sang de cordon est plus efficace à éliminer les cellules pré-B LAL que celle dérivées du sang périphérique. Enfin, un aspect critique de ces cellules est qu'elles sont sensibles à l'apoptose par Fas *in vitro*, et ceci pourrait peut-être les empêcher à être encore plus efficace *in vivo*.

Il serait donc important de mieux étudier la sensibilité des cellules CIK à l'apoptose par Fas, surtout à partir de modèle d'animaux. Ceci permettrait de confirmer que la sensibilité observée *in vitro* est représentative de ce qui se passe *in vivo* lorsque des cellules tumorales expriment FasL. De plus, il serait intéressant de continuer à améliorer cette stratégie d'immunothérapie afin de pouvoir augmenter la survie des souris, voir d'éradiquer complètement les cellules pré-B LAL. Pour cela, il faudrait sûrement modifier les cellules CIK en les transduisant avec un gène de survie ou de cytokine afin de les maintenir plus longtemps en circulation lorsqu'elles sont injectées. Enfin, il faudrait approfondir le mécanisme des cellules CIK, surtout en particulier l'implication de la voie du NKG2D et de perforine/granzyme.

REFERENCES

- (mai 2012). "Trends in Allogeneic Transplants. National Marrow Donor Program." http://marrow.org/Physicians/Unrelated_Search_and_Transplant/Trends_in_Allo_Transplants.aspx.
- Agarwal, P., A. Raghavan, et al. (2009). "Gene regulation and chromatin remodeling by IL-12 and type I IFN in programming for CD8 T cell effector function and memory." *J Immunol* 183: 1695-704.
- Alvarnas, J. C., Y. C. Linn, et al. (2001). "Expansion of cytotoxic CD3+ CD56+ cells from peripheral blood progenitor cells of patients undergoing autologous hematopoietic cell transplantation." *Biol Blood Marrow Transplant* 7(4): 216-222.
- Ancuta, P., L. Weiss, et al. (2000). "CD14+CD16++ cells derived in vitro from peripheral blood monocytes exhibit phenotypic and functional dendritic cell-like characteristics." *Eur J Immunol* 30(7): 1872-1883.
- Anderlini, P., J. D. Rizzo, et al. (2001). "Peripheral blood stem cell donation: an analysis from the International Bone Marrow Transplant Registry (IBMTR) and European Group for Blood and Marrow Transplant (EBMT) databases." *Bone Marrow Transplant* 27(7): 689-692.
- Anderson, B. E., J. McNiff, et al. (2003). "Memory CD4+ T cells do not induce graft-versus-host disease." *J Clin Invest* 112(1): 101-108.
- Anderson, B. E., J. M. McNiff, et al. (2005). "Distinct roles for donor- and host-derived antigen-presenting cells and costimulatory molecules in murine chronic graft-versus-host disease: requirements depend on target organ." *Blood* 105(5): 2227-2234.
- Andre, P., R. Castriconi, et al. (2004). "Comparative analysis of human Nk cell activation induced by NKG2D and natural cytotoxicity receptors." *Eur J Immunol* 34: 961-71.
- Armitage, R. J., A. E. Namen, et al. (1990). "Regulation of human T cell proliferation by IL-7." *J Immunol* 144(3): 938-941.
- Asavaroengchai, W., R. T. Bronson, et al. (2003). "Donor-derived IFN- γ inhibits GVHD in mice after CD4-depleted allogeneic hematopoietic cell transplantation: an essential role for IFN- γ in controlling donor CD8 T cell activation, proliferation, and survival." *Blood* 102: 949a.
- Azuma, M., et al. (1993). "B70 antigen is a second ligand for CTLA-4 and CD28." *Nature* 366: 76-79.
- Baker, J., M. R. Verneris, et al. (2001). "Expansion of cytolytic CD8(+) natural killer T cells with limited capacity for graft-versus-host disease induction due to interferon gamma production." *Blood* 97(10): 2923-2931.
- Ballen, K. K., T. R. Spitzer, et al. (2007). "Double unrelated reduced-intensity umbilical cord blood transplantation in adults." *Biol Blood Marrow Transplant* 13(1): 82-89.
- Banchereau, J. and R. M. Steinman (1998). "Dendritic cells and the control of immunity." *Nature* 392(6673): 245-252.
- Barker, J. N., D. J. Weisdorf, et al. (2005). "Transplantation of 2 partially HLA-matched umbilical cord blood units to enhance engraftment in adults with hematologic malignancy." *Blood* 105(3): 1343-1347.

- Battistini, L., G. Borsellino, et al. (1997). "Phenotypic and cytokine analysis of human peripheral blood gamma delta T cells expressing NK cell receptors." J Immunol **159**(8): 3723-3730.
- Becknell, B. and M. A. Caligiuri (2005). "Interleukin-2, interleukin-15, and their roles in human natural killer cells." Adv Immunol **86**: 209-239.
- Beutler, E., K. G. Blume, et al. (1979). "Bone marrow transplantation as the treatment of choice for "good risk" adult patients with acute leukemia." Trans Assoc Am Physicians **92**: 189-195.
- Biondi, A., M. G. Valsecchi, et al. (2000). "Molecular detection of minimal residual disease is a strong predictive factor of relapse in childhood B-lineage acute lymphoblastic leukemia with medium risk features. A case control study of the International BFM study group." Leukemia **14**(11): 1939-1943.
- Bjorkstrom, N. K., V. Beziat, et al. (2012). "CD8 T cells express randomly selected KIRs with distinct specificities compared with NK cells." Blood **120**(17): 3455-3465.
- Bonanno, G., P. Iudicone, et al. (2010). "Thymoglobulin, interferon-gamma and interleukin-2 efficiently expand cytokine-induced killer (CIK) cells in clinical-grade cultures." J Transl Med **8**: 129.
- Bottino, C., R. Biassoni, et al. (2000). "The human natural cytotoxicity receptors (NCR) that induce HLA class I-independent NK cell triggering." Hum Immunol **61**(1): 1-6.
- Brandau, S., H. Suttman, et al. (2000). "Perforin-mediated lysis of tumor cells by Mycobacterium bovis Bacillus Calmette-Guerin-activated killer cells." Clin Cancer Res **6**(9): 3729-3738.
- Brandt, C. S., M. Baratin, et al. (2009). "The B7 family member B7-H6 is a tumor cell ligand for the activating natural killer cell receptor NKp30 in humans." J Exp Med **206**(7): 1495-1503.
- Brentjens, R. J. (2004). "Novel approaches to immunotherapy for B-cell malignancies." Curr Oncol Rep **6**(5): 339-347.
- Brentjens, R. J., J. B. Latouche, et al. (2003). "Eradication of systemic B-cell tumors by genetically targeted human T lymphocytes co-stimulated by CD80 and interleukin-15." Nat Med **9**(3): 279-286.
- Brentjens, R. J., I. Riviere, et al. (2011). "Safety and persistence of adoptively transferred autologous CD19-targeted T cells in patients with relapsed or chemotherapy refractory B-cell leukemias." Blood **118**(18): 4817-4828.
- Brentjens, R. J., E. Santos, et al. (2007). "Genetically targeted T cells eradicate systemic acute lymphoblastic leukemia xenografts." Clin Cancer Res **13**(18 Pt 1): 5426-5435.
- Brinkmann, V., T. Geiger, et al. (1993). "Interferon alpha increases the frequency of interferon gamma-producing human CD4⁺ T cells." J Exp Med **178**: 1655-63.
- Brok, H. P., J. M. Vossen, et al. (1998). "IFN-gamma-mediated prevention of graft-versus-host disease: pharmacodynamic studies and influence on proliferative capacity of chimeric spleen cells." Bone Marrow Transplant **22**(10): 1005-1010.
- Brok, H. P., J. M. Vossen, et al. (1997). "Interferon-gamma-mediated prevention of graft-versus-host disease: development of immune competent and allo-tolerant T cells in chimeric mice." Bone Marrow Transplant **19**: 601-606.
- Bryceron, Y. T., M. E. March, et al. (2005). "Synergy among receptors on resting NK cells for the activation of natural cytotoxicity and cytokine secretion." Blood.

- Bryson, J. S., C. D. Jennings, et al. (2007). "Adoptive transfer of murine syngeneic graft-vs.-host disease by CD4+ T cells." *J Leukoc Biol* **82**(6): 1393-1400.
- Canada. (2012). "Canada." from www.lightthenight.ca/chapter/tor/2609266/2012Stats.
- Carbone, E., P. Neri, et al. (2005), "HLA class I, NKG2D, and natural cytotoxicity receptors regulate multiple myeloma cell recognition by natural killer cells." *Blood* **105**: 251-8.
- Cardoso, A. A., J. L. Schultze, et al. (1996). "Pre-B acute lymphoblastic leukemia cells may induce T-cell anergy to alloantigen." *Blood* **88**(1): 41-48.
- Carreno, B. M., J. R. Garbow, et al. (2009). "Immunodeficient mouse strains display marked variability in growth of human melanoma lung metastases." *Clin Cancer Res* **15**(10): 3277-3286.
- Carretero, M., C. Cantoni, et al. (1997). "The CD94 and NKG2-A C-type lectins covalently assemble to form a natural killer cell inhibitory receptor for HLA class I molecules." *Eur J Immunol* **27**(2): 563-567.
- Chavez-Galan, L., M. C. Arenas-Del Angel, et al. (2009). "Cell death mechanisms induced by cytotoxic lymphocytes." *Cell Mol Immunol* **6**(1): 15-25.
- Chazen, G. D., G. M. Pereira, et al. (1989). "Interleukin 7 is a T-cell growth factor." *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**(15): 5923-5927.
- Chen, B. J. (2008). "Allogeneic memory T cell response." *Biol Blood Marrow Transplant* **14**(1 Suppl 1): 20-22.
- Choi, S. J., J. H. Lee, et al. (2005). "Treatment of relapsed acute lymphoblastic leukemia after allogeneic bone marrow transplantation with chemotherapy followed by G-CSF-primed donor leukocyte infusion: a prospective study." *Bone Marrow Transplant* **36**(2): 163-169.
- Collins, R. H., Jr., S. Goldstein, et al. (2000). "Donor leukocyte infusions in acute lymphocytic leukemia." *Bone Marrow Transplant* **26**(5): 511-516.
- Cooper, L. J., Z. Al-Kadhimi, et al. (2004). "Development and application of CD19-specific T cells for adoptive immunotherapy of B cell malignancies." *Blood Cells Mol Dis* **33**(1): 83-89.
- Cooper, L. J., Z. Al-Kadhimi, et al. (2005). "Enhanced antilymphoma efficacy of CD19-redirected influenza MP1-specific CTLs by cotransfer of T cells modified to present influenza MP1." *Blood* **105**(4): 1622-1631.
- Cooper, N., K. Rao, et al. (2012). "Alpha interferon augments the graft-versus-leukaemia effect of second stem cell transplants and donor lymphocyte infusions in high-risk paediatric leukaemias." *Br J Haematol* **156**(4): 550-552.
- Cosman, D., J. Mullberg, et al. (2001). "ULBPs, novel MHC class I-related molecules, bind to CMV glycoprotein UL16 and stimulate NK cytotoxicity through the NKG2D receptor." *Immunity* **14**(2): 123-133.
- Coulie, P. G., M. Somville, et al. (1992). "Precursor frequency analysis of human cytolytic T lymphocytes directed against autologous melanoma cells." *Int J Cancer* **50**(2): 289-297.
- Cullen, S. P. and S. J. Martin (2008). "Mechanisms of granule-dependent killing." *Cell Death Differ* **15**(2): 251-262.
- Cullup, H. and G. Stark (2005). "Interleukin-1 polymorphisms and graft-vs-host disease." *Leuk Lymphoma* **46**(4): 517-523.

- Dalle, J. H., M. Duval, et al. (2004). "Results of an unrelated transplant search strategy using partially HLA-mismatched cord blood as an immediate alternative to HLA-matched bone marrow." Bone Marrow Transplant **33**(6): 605-611.
- Deeks, E. D. and G. M. Keating (2009). "Rabbit antithymocyte globulin (thymoglobulin): a review of its use in the prevention and treatment of acute renal allograft rejection." Drugs **69**(11): 1483-1512.
- Dey, B. Y. G. Yang, et al. (1998). "IL-12 inhibits GVHD through a Fas-mediated mechanism associated with alterations in donor T cell activation and expansion." Blood **91**: 3315-3322.
- Dhodapkar, M. V., R. M. Steinman, et al. (2001). "Antigen-specific inhibition of effector T cell function in humans after injection of immature dendritic cells." J Exp Med **193**(2): 233-238.
- Di Pietro, R., P. Secchiero, et al. (2001). "Ionizing radiation sensitizes erythroleukemic cells but not normal erythroblasts to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)--mediated cytotoxicity by selective up-regulation of TRAIL-R1." Blood **97**(9): 2596-2603.
- Dieu-Nosjean, M. C., C. Massacrier, et al. (2000). "Macrophage inflammatory protein 3alpha is expressed at inflamed epithelial surfaces and is the most potent chemokine known in attracting Langerhans cell precursors." J Exp Med **192**(5): 705-718.
- Distler, E., A. Bloetz, et al. (2011). "Alloreactive and leukemia-reactive T cells are preferentially derived from naive precursors in healthy donors: implications for immunotherapy with memory T cells." Haematologica **96**(7): 1024-1032.
- Dong, H., G. Zhu, et al. (1999). "B7-H1, a third member of the B7 family, co-stimulates T cells proliferation and interleukin-10 secretion." Nature Med **5**: 1365-1369.
- Dossett, M. L., R. M. Teague, et al. (2009). "Adoptive immunotherapy of disseminated leukemia with TCR-transduced, CD8+ T cells expressing a known endogenous TCR." Mol Ther **17**(4): 742-749.
- Durrieu, L., J. Gregoire-Gauthier, et al. (2012). "Human interferon-alpha increases the cytotoxic effect of CD56(+)cord blood-derived cytokine-induced killer cells on human B-acute lymphoblastic leukemia cell lines." Cytotherapy **14**(10): 1245-1257.
- Dustin, M. L. and T. A. Springer (1989). "T-cell receptor cross-linking transiently stimulates adhesiveness through LFA-1." Nature **341**(6243): 619-624.
- Edinger, M., Y. A. Cao, et al. (2003). "Revealing lymphoma growth and the efficacy of immune cell therapies using in vivo bioluminescence imaging." Blood **101**(2): 640-648.
- Enk, A. H., H. Jonuleit, et al. (1997). "Dendritic cells as mediators of tumor-induced tolerance in metastatic melanoma." Int J Cancer **73**(3): 309-316.
- Erhardt, M., I. G. Schmidt-Wolf, et al. (2006). "Anti-tumoral capabilities of effector cells after IFN-alpha or CpG-motif treatment of cocultured dendritic cells." Arch Immunol Ther Exp (Warsz) **54**(6): 403-409.
- Falschlehner, C., U. Schaefer, et al. (2009). "Following TRAIL's path in the immune system." Immunology **127**(2): 145-154.
- Fan, Q. R. and D. C. Wiley (1999). "Structure of human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-Cw4, a ligand for the KIR2D natural killer cell inhibitory receptor." J Exp Med **190**(1): 113-123.

- Ferrara, J. L., K. R. Cooke, et al. (2003). "The pathophysiology of acute graft-versus-host disease." Int J Hematol **78**(3): 181-187.
- Finke, S., B. Trojaneck, et al. (1998). "Increase of proliferation rate and enhancement of antitumor cytotoxicity of expanded human CD3+ CD56+ immunologic effector cells by receptor-mediated transfection with the interleukin-7 gene." Gene Ther **5**(1): 31-39.
- Foster, A. E., M. Marangolo, et al. (2004). "Human CD62L- memory T cells are less responsive to alloantigen stimulation than CD62L+ naive T cells: potential for adoptive immunotherapy and allodepletion." Blood **104**(8): 2403-2409.
- Franceschetti, M., A. Pievani, et al. (2009). "Cytokine-induced killer cells are terminally differentiated activated CD8 cytotoxic T-EMRA lymphocytes." Exp Hematol **37**(5): 616-628 e612.
- Freeman, G. J., et al. (1993). "Cloning of B7-2: a CTLA-4 counter-receptor that costimulates human T cell proliferation." Science **262**: 909-911.
- Freeman, G. J., et al. (2000). "Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation." J Exp Med **192**: 1027-1034.
- Frohn, C., P. Schlenke, et al. (1997). "The repertoire of HLA-Cw-specific NK cell receptors CD158 a/b (EB6 and GL183) in individuals with different HLA phenotypes." Immunology **92**(4): 567-570.
- Fujisaki, H., H. Kakuda, et al. (2009). "Expansion of highly cytotoxic human natural killer cells for cancer cell therapy." Cancer Res **69**(9): 4010-4017.
- Galea-Lauri, J., D. Darling, et al. (2002). "Eliciting cytotoxic T lymphocytes against acute myeloid leukemia-derived antigens: evaluation of dendritic cell-leukemia cell hybrids and other antigen-loading strategies for dendritic cell-based vaccination." Cancer Immunol Immunother **51**(6): 299-310.
- Geissmann, F., C. Auffray, et al. (2008). "Blood monocytes: distinct subsets, how they relate to dendritic cells, and their possible roles in the regulation of T-cell responses." Immunol Cell Biol **86**(5): 398-408.
- Ghosh, A., Y. Dogan, et al. (2013). "Adoptively transferred TRAIL+ T cells suppress GVHD and augment antitumor activity." J Clin Invest **123**(6): 2654-2662.
- Gluckman, E. and V. Rocha (2008). "Indications and results of cord blood transplant in children with leukemia." Bone Marrow Transplant **41 Suppl 2**: S80-82.
- Gluckman, E., V. Rocha, et al. (1997). "Outcome of cord-blood transplantation from related and unrelated donors. Eurocord Transplant Group and the European Blood and Marrow Transplantation Group." N Engl J Med **337**(6): 373-381.
- Godal, R., U. Keilholz, et al. (2006). "Lymphomas are sensitive to perforin-dependent cytotoxic pathways despite expression of PI-9 and overexpression of bcl-2." Blood **107**(8): 3205-3211.
- Gogas, H., J. Ioannovich, et al. (2006). "Prognostic significance of autoimmunity during treatment of melanoma with interferon." N Engl J Med **354**(7): 709-718.
- Gottschalk, S., C. Y. Ng, et al. (2001). "An Epstein-Barr virus deletion mutant associated with fatal lymphoproliferative disease unresponsive to therapy with virus-specific CTLs." Blood **97**(4): 835-843.

- Grage-Griebenow, E., H. D. Flad, et al. (2000). "Human MO subsets as defined by expression of CD64 and CD16 differ in phagocytic activity and generation of oxygen intermediates." *Immunobiology* **202**(1): 42-50.
- Gregoire-Gauthier, J., L. Durrieu, et al. (2011). "Use of immunoglobulins in the prevention of GvHD in a xenogeneic NOD/SCID/gammac- mouse model." *Bone Marrow Transplant*.
- Gregoire-Gauthier, J., S. Selleri, et al. (2011). "Therapeutic Efficacy of Cord Blood-Derived Mesenchymal Stromal Cells for the Prevention of Acute Graft-Versus-Host Disease in a Xenogenic Mouse Model." *Stem Cells Dev*.
- Grimm, E. A., A. Mazumder, et al. (1982). "Lymphokine-activated killer cell phenomenon. Lysis of natural killer-resistant fresh solid tumor cells by interleukin 2-activated autologous human peripheral blood lymphocytes." *J Exp Med* **155**(6): 1823-1841.
- Groh, V., J. Wu, et al. (2002). "Tumour-derived soluble MIC ligands impair expression of NKG2D and T-cell activation." *Nature* **419**(6908): 734-738.
- Grzywacz, B., J. S. Miller, et al. (2008). "Use of natural killer cells as immunotherapy for leukaemia." *Best Pract Res Clin Haematol* **21**(3): 467-483.
- Gumperz, J. E., V. Litwin, et al. (1995). "The Bw4 public epitope of HLA-B molecules confers reactivity with natural killer cell clones that express NKB1, a putative HLA receptor." *J Exp Med* **181**(3): 1133-1144.
- Gutgemann, S., S. Frank, et al. (2007). "Cytokine-induced killer cells are type II natural killer T cells." *Ger Med Sci* **5**: Doc07.
- Hathcock, K. S., et al. (1993). "Identification of an alternative CTLA-4 ligand costimulatory for T cell activation." *Science* **262**: 905-907.
- Hayakawa, Y. and M. J. Smyth (2006). "NKG2D and cytotoxic effector function in tumor immune surveillance." *Semin Immunol* **18**(3): 176-185.
- Hayes, M. P., J. Wang, et al. (1995). "Regulation of interleukin-12 expression in human monocytes: selective priming by interferon-gamma of lipopolysaccharide-inducible p35 and p40 genes." *Blood* **86**(2): 646-650.
- Hickman, C. J., J. A. Crim, et al. (1990). "Regulation of human cytotoxic T lymphocyte development by IL-7." *J Immunol* **145**(8): 2415-2420.
- Hill, G. R., J. M. Crawford, et al. (1997). "Total body irradiation and acute graft-versus-host disease: the role of gastrointestinal damage and inflammatory cytokines." *Blood* **90**(8): 3204-3213.
- Hill, G. R. and J. L. Ferrara (2000). "The primacy of the gastrointestinal tract as a target organ of acute graft-versus-host disease: rationale for the use of cytokine shields in allogeneic bone marrow transplantation." *Blood* **95**(9): 2754-2759.
- Hill, G. R., T. Teshima, et al. (2000). "The p55 TNF-alpha receptor plays a critical role in T cell alloreactivity." *J Immunol* **164**(2): 656-663.
- Ho, V. T. and C. Cutler (2008). "Current and novel therapies in acute GVHD." *Best Pract Res Clin Haematol* **21**(2): 223-237.
- Hollyman, D., J. Stefanski, et al. (2009). "Manufacturing validation of biologically functional T cells targeted to CD19 antigen for autologous adoptive cell therapy." *J Immunother* **32**(2): 169-180.

- Hongeng, S., S. Petvises, et al. (2003). "Generation of CD3+ CD56+ cytokine-induced killer cells and their in vitro cytotoxicity against pediatric cancer cells." Int J Hematol **77**(2): 175-179.
- Houchins, J. P., T. Yabe, et al. (1991). "DNA sequence analysis of NKG2, a family of related cDNA clones encoding type II integral membrane proteins on human natural killer cells." J Exp Med **173**(4): 1017-1020.
- Hoyle, C., C. D. Bangs, et al. (1998). "Expansion of Philadelphia chromosome-negative CD3(+)CD56(+) cytotoxic cells from chronic myeloid leukemia patients: in vitro and in vivo efficacy in severe combined immunodeficiency disease mice." Blood **92**(9): 3318-3327.
- Huisman, C., R. A. de Weger, et al. (2007). "Chimerism analysis within 6 months of allogeneic stem cell transplantation predicts relapse in acute myeloid leukemia." Bone Marrow Transplant **39**(5): 285-291.
- Igney, F. H. and P. H. Krammer (2002). "Immune escape of tumors: apoptosis resistance and tumor counterattack." J Leukoc Biol **71**(6): 907-920.
- Imai, C., S. Iwamoto, et al. (2005). "Genetic modification of primary natural killer cells overcomes inhibitory signals and induces specific killing of leukemic cells." Blood **106**(1): 376-383.
- Imai, C., K. Mihara, et al. (2004). "Chimeric receptors with 4-1BB signaling capacity provoke potent cytotoxicity against acute lymphoblastic leukemia." Leukemia **18**(4): 676-684.
- Inaba, H., M. Greaves, et al. (2013). "Acute lymphoblastic leukaemia." Lancet **381**(9881): 1943-1955.
- Introna, M., G. Borleri, et al. (2007). "Repeated infusions of donor-derived cytokine-induced killer cells in patients relapsing after allogeneic stem cell transplantation: a phase I study." Haematologica **92**(7): 952-959.
- Introna, M., M. Franceschetti, et al. (2006). "Rapid and massive expansion of cord blood-derived cytokine-induced killer cells: an innovative proposal for the treatment of leukemia relapse after cord blood transplantation." Bone Marrow Transplant **38**(9): 621-627.
- Introna, M., A. Pievani, et al. (2010). "Feasibility and safety of adoptive immunotherapy with CIK cells after cord blood transplantation." Biol Blood Marrow Transplant **16**(11): 1603-1607.
- Ishida, Y., Y. Agata, et al. (1992). "Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death." EMBO J **11**: 3887-3895.
- Ito, R., I. Katano, et al. (2009). "Highly sensitive model for xenogenic GVHD using severe immunodeficient NOG mice." Transplantation **87**(11): 1654-1658.
- Itoh, N., S. Yonehara, et al. (1991). "The polypeptide encoded by the cDNA for human cell surface antigen Fas can mediate apoptosis." Cell **66**(2): 233-243.
- Jacobsohn, D. A. and G. B. Vogelsang (2007). "Acute graft versus host disease." Orphanet J Rare Dis **2**: 35.
- Jacqy, C., B. Delepaut, et al. (1997). "A prospective study of minimal residual disease in childhood B-lineage acute lymphoblastic leukaemia: MRD level at the end of induction is a strong predictive factor of relapse." Br J Haematol **98**(1): 140-146.

- James, E., J. G. Chai, et al. (2003). "Multiparity induces priming to male-specific minor histocompatibility antigen, HY, in mice and humans." *Blood* **102**(1): 388-393.
- Jicha, D. L., J. J. Mule, et al. (1991). "Interleukin 7 generates antitumor cytotoxic T lymphocytes against murine sarcomas with efficacy in cellular adoptive immunotherapy." *J Exp Med* **174**(6): 1511-1515.
- Johnson, L. A., R. A. Morgan, et al. (2009). "Gene therapy with human and mouse T-cell receptors mediates cancer regression and targets normal tissues expressing cognate antigen." *Blood* **114**(3): 535-546.
- Kadowaki, N., S. Antonenko, et al. (2000). "Natural interferon alpha/beta-producing cells link innate and adaptive immunity." *J Exp Med* **192**(2): 219-226.
- Kagi, D., F. Vignaux, et al. (1994). "Fas and perforin pathways as major mechanisms of T cell-mediated cytotoxicity." *Science* **265**(5171): 528-530.
- Kalos, M., B. L. Levine, et al. (2011). "T cells with chimeric antigen receptors have potent antitumor effects and can establish memory in patients with advanced leukemia." *Sci Transl Med* **3**(95): 95ra73.
- Kataoka, T., N. Shinohara, et al. (1996). "Concanamycin A, a powerful tool for characterization and estimation of contribution of perforin- and Fas-based lytic pathways in cell-mediated cytotoxicity." *J Immunol* **156**(10): 3678-3686.
- Kataoka, T., K. Takaku, et al. (1994). "Acidification is essential for maintaining the structure and function of lytic granules of CTL. Effect of concanamycin A, an inhibitor of vacuolar type H(+)-ATPase, on CTL-mediated cytotoxicity." *J Immunol* **153**(9): 3938-3947.
- Kayagaki, N., N. Yamaguchi, et al. (1999). "Type I interferons (IFNs) regulate tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) expression on human T cells: A novel mechanism for the antitumor effects of type I IFNs." *J Exp Med* **189**(9): 1451-1460.
- Kayagaki, N., N. Yamaguchi, et al. (1999). "Involvement of TNF-related apoptosis-inducing ligand in human CD4+ T cell-mediated cytotoxicity." *J Immunol* **162**(5): 2639-2647.
- Keil, F., E. Prinz, et al. (2003). "Rapid establishment of long-term culture-initiating cells of donor origin after nonmyeloablative allogeneic hematopoietic stem-cell transplantation, and significant prognostic impact of donor T-cell chimerism on stable engraftment and progression-free survival." *Transplantation* **76**(1): 230-236.
- Keir, M. E., et al. (2006). "Tissue expression of PD-L1 mediates peripheral T cell tolerance." *J Exp Med* **203**: 883-895.
- Khong, H. T. and N. P. Restifo (2002). "Natural selection of tumor variants in the generation of "tumor escape" phenotypes." *Nat Immunol* **3**(11): 999-1005.
- Kim, H. M., J. Lim, et al. (2007). "Antitumor activity of cytokine-induced killer cells against human lung cancer." *Int Immunopharmacol* **7**(13): 1802-1807.
- Kim, H. M., J. Lim, et al. (2007). "Anti-tumor activity of ex vivo expanded cytokine-induced killer cells against human hepatocellular carcinoma." *Int Immunopharmacol* **7**(13): 1793-1801.
- Kim, Y. J., J. Lim, et al. (2010). "Adoptive immunotherapy of human gastric cancer with ex vivo expanded T cells." *Arch Pharm Res* **33**(11): 1789-1795.
- Kiyokawa, H., R. D. Kineman, et al. Enhanced growth of mice lacking the cyclin-dependent kinase inhibitor function of p27^{Kip1}. *Cell* **85**: 721-732.

- Kochenderfer, J. N., S. A. Feldman, et al. (2009). "Construction and preclinical evaluation of an anti-CD19 chimeric antigen receptor." *J Immunother* **32**(7): 689-702.
- Kochenderfer, J. N., W. H. Wilson, et al. (2010). "Eradication of B-lineage cells and regression of lymphoma in a patient treated with autologous T cells genetically engineered to recognize CD19." *Blood* **116**(20): 4099-4102.
- Kolb, H. J. (2008). "Graft-versus-leukemia effects of transplantation and donor lymphocytes." *Blood* **112**(12): 4371-4383.
- Kolb, H. J., A. Schattenberg, et al. (1995). "Graft-versus-leukemia effect of donor lymphocyte transfusions in marrow grafted patients." *Blood* **86**(5): 2041-2050.
- Kolumam, G. A., S. Thomas, et al. (2005). "Type I interferons act directly on CD8 T cells to allow clonal expansion and memory formation in response to viral infection." *J Exp Med* **202**: 637-50.
- Kornacker, M., M. Verneris, et al. (2006). "The apoptotic and proliferative fate of cytokine-induced killer cells after redirection to tumor cells with bispecific Ab." *Cytotherapy* **8**(1): 13-23.
- Kowolik, C. M., M. S. Topp, et al. (2006). "CD28 costimulation provided through a CD19-specific chimeric antigen receptor enhances in vivo persistence and antitumor efficacy of adoptively transferred T cells." *Cancer Res* **66**(22): 10995-11004.
- Krug, A., R. Veeraswamy, et al. (2003). "Interferon-producing cells fail to induce proliferation of naive T cells but can promote expansion and T helper 1 differentiation of antigen-experienced unpolarized T cells." *J Exp Med* **197**(7): 899-906.
- Ku, C. C., M. Murakami, et al. (2000). "Control of homeostasis of CD8+ memory T cells by opposing cytokines." *Science* **288**(5466): 675-678.
- Kubach, J., C. Becker, et al. (2005). "Dendritic cells: sentinels of immunity and tolerance." *Int J Hematol* **81**(3): 197-203.
- Kuci, S., E. Rettinger, et al. (2010). "Efficient lysis of rhabdomyosarcoma cells by cytokine-induced killer cells: implications for adoptive immunotherapy after allogeneic stem cell transplantation." *Haematologica* **95**(9): 1579-1586.
- Kwon, B. S., K. B. Tan, et al. (1997). "A newly identified member of the tumor necrosis factor receptor superfamily with a wide tissue distribution and involvement in lymphocyte activation." *J Biol Chem* **272**(22): 14272-14276.
- Lafreniere, R. and S. A. Rosenberg (1985). "Successful immunotherapy of murine experimental hepatic metastases with lymphokine-activated killer cells and recombinant interleukin 2." *Cancer Res* **45**(8): 3735-3741.
- Laport, G. G., K. Sheehan, et al. (2011). "Adoptive immunotherapy with cytokine-induced killer cells for patients with relapsed hematologic malignancies after allogeneic hematopoietic cell transplantation." *Biol Blood Marrow Transplant* **17**(11): 1679-1687.
- Laster, S. M., J. G. Wood, et al. (1988). "Tumor necrosis factor can induce both apoptic and necrotic forms of cell lysis." *J Immunol* **141**(8): 2629-2634.
- Latchman, Y., et al. (2001). "PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation." *Nature Immunol* **2**: 261-268.
- Laurin, D., V. Marin, et al. (2010). "Exploration of the lysis mechanisms of leukaemic blasts by chimaeric T-cells." *J Biomed Biotechnol* **2010**: 234540.

- Le Bon, A., N. Etchart, et al. (2003). "Cross-priming of CD8⁺ T cells stimulated by virus-induced type I interferon." Nat Immunol 4: 1009-15.
- Le Bon, A., G. Schiavoni, et al. (2001). "Type 1 interferons potently enhance humoral immunity and can promote isotype switching by stimulation dendritic cells in vivo." Immunity 14: 461-70.
- Lee, C. K., D. T. Rao, et al. (2000). "Distinct requirements for IFNs and STAT1 in NK cell function." J Immunol 165: 3571-7.
- Lefterova, P., A. Marten, et al. (2000). "Targeting of natural killer-like T immunologic effector cells against leukemia and lymphoma cells by reverse antibody-dependent cellular cytotoxicity." J Immunother 23(3): 304-310.
- Lehtonen, A., R. Lund, et al. (2003). "IFN-alpha and IL-12 activate IFN regulatory factor 1 (IRF-1), IRF-4, and IRF-8 gene expression in human NK and T cells." Cytokine 24(3): 81-90.
- Lenschow, D. J., T. L. Walumas, et al. (1996). "CD28/B7 system of T cell costimulation." Annu Rev Immunol 14: 233-258.
- Li, J. J., M. F. Gu, et al. (2012). "Autologous cytokine-induced killer cell transfusion in combination with gemcitabine plus cisplatin regimen chemotherapy for metastatic nasopharyngeal carcinoma." J Immunother 35(2): 189-195.
- Li, L., L. N. Liu, et al. (2010). "Expression of chimeric antigen receptors in natural killer cells with a regulatory-compliant non-viral method." Cancer Gene Ther 17(3): 147-154.
- Li, Y., I. G. Schmidt-Wolf, et al. (2010). "Optimized protocols for generation of cord blood-derived cytokine-induced killer/natural killer cells." Anticancer Res 30(9): 3493-3499.
- Liang, S., H. Wei, et al. (2003). "IFNalpha regulates NK cell cytotoxicity through STAT1 pathway." Cytokine 23(6): 190-199.
- Lin, G., J. Wang, et al. (2012). "Interleukin-6 inhibits regulatory T cells and improves the proliferation and cytotoxic activity of cytokine-induced killer cells." J Immunother 35(4): 337-343.
- Lin, S. J., D. C. Yan, et al. (2012). "Umbilical cord blood immunology: relevance to stem cell transplantation." Clin Rev Allergy Immunol 42(1): 45-57.
- Linn, Y. C. and K. M. Hui (2010). "Cytokine-induced NK-like T cells: from bench to bedside." J Biomed Biotechnol 2010: 435745.
- Linn, Y. C., L. C. Lau, et al. (2002). "Generation of cytokine-induced killer cells from leukaemic samples with in vitro cytotoxicity against autologous and allogeneic leukaemic blasts." Br J Haematol 116(1): 78-86.
- Linn, Y. C., S. K. Lau, et al. (2009). "Characterization of the recognition and functional heterogeneity exhibited by cytokine-induced killer cell subsets against acute myeloid leukaemia target cell." Immunology 126(3): 423-435.
- Linn, Y. C., M. Niam, et al. (2011). "The anti-tumour activity of allogeneic cytokine-induced killer cells in patients who relapse after allogeneic transplant for haematological malignancies." Bone Marrow Transplant.
- Linn, Y. C., M. Niam, et al. (2012). "The anti-tumour activity of allogeneic cytokine-induced killer cells in patients who relapse after allogeneic transplant for haematological malignancies." Bone Marrow Transplant 47(7): 957-966.
- Litwin, V., J. Gumperz, et al. (1994). "NKB1: a natural killer cell receptor involved in the recognition of polymorphic HLA-B molecules." J Exp Med 180(2): 537-543.

- Locatelli, F., R. Maccario, et al. (1996). "Hematopoietic and immune recovery after transplantation of cord blood progenitor cells in children." Bone Marrow Transplant **18**(6): 1095-1101.
- Lopez, R. D., E. K. Waller, et al. (2001). "CD58/LFA-3 and IL-12 provided by activated monocytes are critical in the in vitro expansion of CD56+ T cells." Cancer Immunol Immunother **49**(12): 629-640.
- Loskog, A., V. Giandomenico, et al. (2006). "Addition of the CD28 signaling domain to chimeric T-cell receptors enhances chimeric T-cell resistance to T regulatory cells." Leukemia **20**(10): 1819-1828.
- Lu, P. H. and R. S. Negrin (1994). "A novel population of expanded human CD3+CD56+ cells derived from T cells with potent in vivo antitumor activity in mice with severe combined immunodeficiency." J Immunol **153**(4): 1687-1696.
- Luft, T., K. C. Pang, et al. (1998). "Type I IFNs enhance the terminal differentiation of dendritic cells." J Immunol **161**(4): 1947-1953.
- Ma, X., J. M. Chow, et al. (1996). "The interleukin 12 p40 gene promoter is primed by interferon gamma in monocytic cells." J Exp Med **183**(1): 147-157.
- Mackensen, A., L. Ferradini, et al. (1993). "Evidence for in situ amplification of cytotoxic T-lymphocytes with antitumor activity in a human regressive melanoma." Cancer Res **53**(15): 3569-3573.
- Mahnke, K., E. Schmitt, et al. (2002). "Immature, but not inactive: the tolerogenic function of immature dendritic cells." Immunol Cell Biol **80**(5): 477-483.
- Manz, M. G., D. Traver, et al. (2001). "Dendritic cell development from common myeloid progenitors." Ann N Y Acad Sci **938**: 167-173; discussion 173-164.
- Marijt, W. A., N. A. Kernan, et al. (1995). "Multiple minor histocompatibility antigen-specific cytotoxic T lymphocyte clones can be generated during graft rejection after HLA-identical bone marrow transplantation." Bone Marrow Transplant **16**(1): 125-132.
- Marin, V., E. Dander, et al. (2006). "Characterization of in vitro migratory properties of anti-CD19 chimeric receptor-redirected CIK cells for their potential use in B-ALL immunotherapy." Exp Hematol **34**(9): 1219-1229.
- Marin, V., H. Kakuda, et al. (2007). "Enhancement of the anti-leukemic activity of cytokine induced killer cells with an anti-CD19 chimeric receptor delivering a 4-1BB-zeta activating signal." Exp Hematol **35**(9): 1388-1397.
- Marrack, P., J. Kappler, et al. (1999). "Type I interferons keep activated T cells alive." J Exp Med **189**: 521-30.
- Marten, A., S. Renoth, et al. (2001). "Enhanced lytic activity of cytokine-induced killer cells against multiple myeloma cells after co-culture with idiotype-pulsed dendritic cells." Haematologica **86**(10): 1029-1037.
- Marten, A., C. Ziske, et al. (2001). "Interactions between dendritic cells and cytokine-induced killer cells lead to an activation of both populations." J Immunother **24**(6): 502-510.
- Martz, E. (1980). "Immune T lymphocyte to tumor cell adhesion. Magnesium sufficient, calcium insufficient." J Cell Biol **84**(3): 584-598.
- Mattsson, J., O. Ringden, et al. (2008). "Graft Failure after Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation." Biol Blood Marrow Transplant **14**(Supplement 1): 165-170.

- Mazumder, A. and S. A. Rosenberg (1984). "Successful immunotherapy of natural killer-resistant established pulmonary melanoma metastases by the intravenous adoptive transfer of syngeneic lymphocytes activated in vitro by interleukin 2." J Exp Med **159**(2): 495-507.
- Mehta, B. A., I. G. Schmidt-Wolf, et al. (1995). "Two pathways of exocytosis of cytoplasmic granule contents and target cell killing by cytokine-induced CD3+ CD56+ killer cells." Blood **86**(9): 3493-3499.
- Merad, M. and M. G. Manz (2009). "Dendritic cell homeostasis." Blood **113**(15): 3418-3427.
- Merindol, N., E. Charrier, et al. (2011). "Complementary and contrasting roles of NK cells and T cells in pediatric umbilical cord blood transplantation." J Leukoc Biol **90**(1): 49-60.
- Milone, M. C., J. D. Fish, et al. (2009). "Chimeric receptors containing CD137 signal transduction domains mediate enhanced survival of T cells and increased antileukemic efficacy in vivo." Mol Ther **17**(8): 1453-1464.
- Molldrem, J. J., P. P. Lee, et al. (2000). "Evidence that specific T lymphocytes may participate in the elimination of chronic myelogenous leukemia." Nat Med **6**(9): 1018-1023.
- Moretta, A., R. Maccario, et al. (2001). "Analysis of immune reconstitution in children undergoing cord blood transplantation." Exp Hematol **29**(3): 371-379.
- Moretta, A., A. Poggi, et al. (1991). "CD69-mediated pathway of lymphocyte activation: anti-CD69 monoclonal antibodies trigger the cytolytic activity of different lymphoid effector cells with the exception of cytolytic T lymphocytes expressing T cell receptor alpha/beta." J Exp Med **174**(6): 1393-1398.
- Morgan, R. A., M. E. Dudley, et al. (2006). "Cancer regression in patients after transfer of genetically engineered lymphocytes." Science **314**(5796): 126-129.
- Mullighan, C. G. (2012). "The molecular genetic makeup of acute lymphoblastic leukemia." Hematology Am Soc Hematol Educ Program **2012**: 389-396.
- Muta, T., T. Kurosaki, et al. (1994). "A 13-amino-acid motif in the cytoplasmic domain of Fc gamma RIIb modulates B-cell receptor signalling." Nature **368**(6466): 70-73.
- Nagata, S. and P. Golstein (1995). "The Fas death factor." Science **267**(5203): 1449-1456.
- Nakajima, H., M. Cella, et al. (2000). "Patients with X-linked lymphoproliferative disease have a defect in 2B4 receptor-mediated NK cell cytotoxicity." Eur J Immunol **30**(11): 3309-3318.
- Nakayama, K., N. Ishida, et al. (1996). "Mice lacking p27^{Kip1} display increased body size, multiple organ hyperplasia, retinal dysplasia, and pituitary tumors." Cell **85**:707-720.
- NCT00840853 "<http://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00840853>."
- NCT01195480 "<http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01195480>."
- NCT01430390 "<http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01430390>."
- Nguyen, K. B., T. P. Salazar-Mather, et al. (2002). "Coordinated and distinct roles for IFN-alpha beta, IL-12, and IL-15 regulation of NK cell responses to viral infection." J Immunol **169**: 4279-87.
- Nguyen, K. B., W. T. Watford, et al. (2002). "Critical role for STAT4 activation by type 1 interferons in the interferon-gamma response to viral infection." Science **297**: 2063-6.
- Niehans, G. A., T. Brunner, et al. (1997). "Human lung carcinomas express Fas ligand." Cancer Res **57**(6): 1007-1012.

- Nishimura, R., J. Baker, et al. (2008). "In vivo trafficking and survival of cytokine-induced killer cells resulting in minimal GVHD with retention of antitumor activity." Blood **112**(6): 2563-2574.
- Niu, Q., W. Wang, et al. (2011). "Cord blood-derived cytokine-induced killer cells biotherapy combined with second-line chemotherapy in the treatment of advanced solid malignancies." Int Immunopharmacol **11**(4): 449-456.
- O'Connell, J., G. C. O'Sullivan, et al. (1996). "The Fas counterattack: Fas-mediated T cell killing by colon cancer cells expressing Fas ligand." J Exp Med **184**(3): 1075-1082.
- Ochoa, A. C., G. Gromo, et al. (1987). "Long-term growth of lymphokine-activated killer (LAK) cells: role of anti-CD3, beta-IL 1, interferon-gamma and -beta." J Immunol **138**(8): 2728-2733.
- Olioso, P., R. Giancola, et al. (2009). "Immunotherapy with cytokine induced killer cells in solid and hematopoietic tumours: a pilot clinical trial." Hematol Oncol **27**(3): 130-139.
- Onciu, M. (2009). "Acute lymphoblastic leukemia." Hematol Oncol Clin North Am **23**(4): 655-674.
- Ortaldo, J. R., W. Phillips, et al. (1980). "Effects of metabolic inhibitors on spontaneous and interferon-boosted human natural killer cell activity." J Immunol **125**: 1839-44.
- Ortaldo, J. R., R. T. Winkler-Pickett, et al. (1991). "Comparative studies of CD3- and CD3+ CD56+ cells: examination of morphology, functions, T cell receptor rearrangement, and pore-forming protein expression." Cell Immunol **136**(2): 486-495.
- Paris, F., Z. Fuks, et al. (2001). "Endothelial apoptosis as the primary lesion initiating intestinal radiation damage in mice." Science **293**(5528): 293-297.
- Park, J. H. and R. J. Brentjens (2010). "Adoptive immunotherapy for B-cell malignancies with autologous chimeric antigen receptor modified tumor targeted T cells." Discov Med **9**(47): 277-288.
- Pende, D., C. Cantoni, et al. (2001). "Role of NKG2D in tumor cell lysis mediated by human NK cells: cooperation with natural cytotoxicity receptors and capability of recognizing tumors of nonepithelial origin." Eur J Immunol **31**(4): 1076-1086.
- Perussia, B. (2000). "Signaling for cytotoxicity." Nat Immunol **1**(5): 372-374.
- Petvises, S., S. Pakakasama, et al. (2007). "Ex vivo generation of cytokine-induced killer cells (CD3+ CD56+) from post-stem cell transplant pediatric patients against autologous-Epstein-Barr virus-transformed lymphoblastoid cell lines." Pediatr Transplant **11**(5): 511-517.
- Phillips, J. H. and L. L. Lanier (1986). "Dissection of the lymphokine-activated killer phenomenon. Relative contribution of peripheral blood natural killer cells and T lymphocytes to cytotoxicity." J Exp Med **164**(3): 814-825.
- Piccaluga, P. P., G. Martinelli, et al. (2008). "Long-term molecular complete remission with IFN-alpha in Ph+ adult acute lymphoid leukemia patients." Leukemia **22**(8): 1617-1618.
- Pievani, A., C. Belussi, et al. (2011). "Enhanced killing of human B-cell lymphoma targets by combined use of cytokine-induced killer cell (CIK) cultures and anti-CD20 antibodies." Blood **117**(2): 510-518.
- Pievani, A., G. Borleri, et al. (2011). "Dual-functional capability of CD3+CD56+ CIK cells, a T-cell subset that acquires NK function and retains TCR-mediated specific cytotoxicity." Blood **118**(12): 3301-3310.

- Porter, D. L., B. L. Levine, et al. (2011). "Chimeric antigen receptor-modified T cells in chronic lymphoid leukemia." N Engl J Med **365**(8): 725-733.
- Pospisilova, D., J. Borovickova, et al. (2002). "Generation of functional dendritic cells for potential use in the treatment of acute lymphoblastic leukemia." Cancer Immunol Immunother **51**(2): 72-78.
- Pui, C. H. (1995). "Childhood leukemias." N Engl J Med **332**(24): 1618-1630.
- Pui, C. H., F. G. Behm, et al. (1993). "Clinical and biologic relevance of immunologic marker studies in childhood acute lymphoblastic leukemia." Blood **82**(2): 343-362.
- Pui, C. H. and W. E. Evans (1998). "Acute lymphoblastic leukemia." N Engl J Med **339**(9): 605-615.
- Pui, C. H. and W. E. Evans (2006). "Treatment of acute lymphoblastic leukemia." N Engl J Med **354**(2): 166-178.
- Qiu, G., J. Jiang, et al. (2012). "Pentamidine sensitizes chronic myelogenous leukemia K562 cells to TRAIL-induced apoptosis." Leuk Res **36**(11): 1417-1421.
- Randolph, S. S., T. A. Gooley, et al. (2004). "Female donors contribute to a selective graft-versus-leukemia effect in male recipients of HLA-matched, related hematopoietic stem cell transplants." Blood **103**(1): 347-352.
- Reddy, P., T. Teshima, et al. (2001). "Interleukin-18 regulates acute graft-versus-host disease by enhancing Fas-mediated donor T cell apoptosis." J Exp Med **194**: 1433-1440.
- Reddy, P., T. Teshima (2002). "Interleukin-18 preserves a perforin-dependent graft-versus-leukemia effect after allogeneic bone marrow transplantation." Blood **100**: 3429-3431.
- Renard, C., V. Barlogis, et al. (2011). "Lymphocyte subset reconstitution after unrelated cord blood or bone marrow transplantation in children." Br J Haematol **152**(3): 322-330.
- Rettinger, E., S. Kuci, et al. (2012). "The cytotoxic potential of interleukin-15-stimulated cytokine-induced killer cells against leukemia cells." Cytotherapy **14**(1): 91-103.
- Rettinger, E., V. Meyer, et al. (2012). "Cytotoxic Capacity of IL-15-Stimulated Cytokine-Induced Killer Cells Against Human Acute Myeloid Leukemia and Rhabdomyosarcoma in Humanized Preclinical Mouse Models." Front Oncol **2**: 32.
- Rieux-Laucat, F., S. Blachere, et al. (1999). "Lymphoproliferative syndrome with autoimmunity: A possible genetic basis for dominant expression of the clinical manifestations." Blood **94**(8): 2575-2582.
- Robb, R. J., E. Kreijveld, et al. (2011). "Type I-IFNs control GVHD and GVL responses after transplantation." Blood **118**(12): 3399-3409.
- Rocha, V., J. Cornish, et al. (2001). "Comparison of outcomes of unrelated bone marrow and umbilical cord blood transplants in children with acute leukemia." Blood **97**(10): 2962-2971.
- Romani, N., S. Holzmann, et al. (2003). "Langerhans cells - dendritic cells of the epidermis." APMIS **111**(7-8): 725-740.
- Rosenberg, S. A., M. T. Lotze, et al. (1987). "A progress report on the treatment of 157 patients with advanced cancer using lymphokine-activated killer cells and interleukin-2 or high-dose interleukin-2 alone." N Engl J Med **316**(15): 889-897.
- Rouvier, E., M. F. Luciani, et al. (1993). "Fas involvement in Ca(2+)-independent T cell-mediated cytotoxicity." J Exp Med **177**(1): 195-200.
- Rudd, C. E., A. Taylor, et al. (2009). "CD28 and CTLA-4 coreceptor expression and signal transduction." Immunol Rev **229**: 12-26.

- Ruggeri, L., M. Capanni, et al. (2002). "Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants." Science **295**(5562): 2097-2100.
- Sadelain, M., R. Brentjens, et al. (2009). "The promise and potential pitfalls of chimeric antigen receptors." Curr Opin Immunol **21**(2): 215-223.
- Sadelain, M., I. Riviere, et al. (2003). "Targeting tumours with genetically enhanced T lymphocytes." Nat Rev Cancer **3**(1): 35-45.
- Salih, H. R., H. Antropius, et al. (2003). "Functional expression and release of ligands for the activating immunoreceptor NKG2D in leukemia." Blood **102**(4): 1389-1396.
- Sangiolo, D., E. Martinuzzi, et al. (2008). "Alloreactivity and anti-tumor activity segregate within two distinct subsets of cytokine-induced killer (CIK) cells: implications for their infusion across major HLA barriers." Int Immunol **20**(7): 841-848.
- Sangiolo, D., G. Mesiano, et al. (2009). "Cytokine induced killer cells as adoptive immunotherapy strategy to augment graft versus tumor after hematopoietic cell transplantation." Expert Opin Biol Ther **9**(7): 831-840.
- Santos, G. W., P. J. Tutschka, et al. (1983). "Marrow transplantation for acute nonlymphocytic leukemia after treatment with busulfan and cyclophosphamide." N Engl J Med **309**(22): 1347-1353.
- Sartelet, H., L. Durrieu, et al. (2012). "Description of a new xenograft model of metastatic neuroblastoma using NOD/SCID/Il2rg null (NSG) mice." In Vivo **26**(1): 19-29.
- Sato, K., S. Hida, et al. (2001). "Antiviral response by natural killer cells through TRAIL gene induction by IFN-alpha/beta." Eur J Immunol **31**(11): 3138-3146.
- Schmidt-Wolf, I. G., S. Finke, et al. (1999). "Phase I clinical study applying autologous immunological effector cells transfected with the interleukin-2 gene in patients with metastatic renal cancer, colorectal cancer and lymphoma." Br J Cancer **81**(6): 1009-1016.
- Schmidt-Wolf, I. G., P. Lefterova, et al. (1994). "Propagation of large numbers of T cells with natural killer cell markers." Br J Haematol **87**(3): 453-458.
- Schmidt-Wolf, I. G., P. Lefterova, et al. (1993). "Phenotypic characterization and identification of effector cells involved in tumor cell recognition of cytokine-induced killer cells." Exp Hematol **21**(13): 1673-1679.
- Schmidt-Wolf, I. G., R. S. Negrin, et al. (1991). "Use of a SCID mouse/human lymphoma model to evaluate cytokine-induced killer cells with potent antitumor cell activity." J Exp Med **174**(1): 139-149.
- Schwartz, R. H., et al. (1992). "Costimulation of T lymphocytes: the role of CD28, CTLA-4, and B7/BB1 in interleukin-2 production and immunotherapy." Cell **71**: 1065-1068.
- Shi, L., Q. Zhou, et al. (2012). "Efficacy of adjuvant immunotherapy with cytokine-induced killer cells in patients with locally advanced gastric cancer." Cancer Immunol Immunother **61**(12): 2251-2259.
- Shigeno, M., K. Nakao, et al. (2003). "Interferon-alpha sensitizes human hepatoma cells to TRAIL-induced apoptosis through DR5 upregulation and NF-kappa B inactivation." Oncogene **22**(11): 1653-1662.
- Shlomchik, W. D., M. S. Couzens, et al. (1999). "Prevention of graft versus host disease by inactivation of host antigen-presenting cells." Science **285**(5426): 412-415.
- Shresta, S., C. T. Pham, et al. (1998). "How do cytotoxic lymphocytes kill their targets?" Curr Opin Immunol **10**(5): 581-587.

- Siegal, F. P., N. Kadowaki, et al. (1999). "The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood." Science **284**(5421): 1835-1837.
- Singh, H., M. J. Figliola, et al. (2011). "Reprogramming CD19-specific T cells with IL-21 signaling can improve adoptive immunotherapy of B-lineage malignancies." Cancer Res **71**(10): 3516-3527.
- Slavin, S., E. Naparstek, et al. (1996). "Allogeneic cell therapy with donor peripheral blood cells and recombinant human interleukin-2 to treat leukemia relapse after allogeneic bone marrow transplantation." Blood **87**(6): 2195-2204.
- Smyth, M. J., E. Cretney, et al. (2005). "Activation of NK cell cytotoxicity." Mol Immunol **42**(4): 501-510.
- Spisek, R., P. Chevallier, et al. (2002). "Induction of leukemia-specific cytotoxic response by cross-presentation of late-apoptotic leukemic blasts by autologous dendritic cells of nonleukemic origin." Cancer Res **62**(10): 2861-2868.
- Swann, J. B., Y. Hayakawa, et al. (2007). "Type I IFN contributes to NK cell homeostasis, activation, and antitumor function." J Immunol **178**(12): 7540-7549.
- Sweeney, T. J., V. Mailander, et al. (1999). "Visualizing the kinetics of tumor-cell clearance in living animals." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(21): 12044-12049.
- Sykes, M., G. L. Szot, et al. (1995). "Interleukin-12 inhibits murine graft-versus-host disease." Blood **86**: 2429-2438.
- Szebeni, J., M. G. Wang, et al. (1994). "IL-2 inhibits early increases in serum gamma interferon levels associated with graft-versus-host-disease." Transplantation **58**: 1385-1393.
- Tacke, F. and G. J. Randolph (2006). "Migratory fate and differentiation of blood monocyte subsets." Immunobiology **211**(6-8): 609-618.
- Takahashi, C., R. S. Mittler, et al. (2001). "Differential clonal expansion of CD4 and CD8 T cells in response to 4-1BB ligation: contribution of 4-1BB during inflammatory responses." Immunol Lett **76**(3): 183-191.
- Takami, K., N. Takuwa, et al. (2002). "Interferon- γ inhibits hepatocyte growth factor-stimulated cell proliferation of human bronchial epithelial cells. Upregulation of p27^{kip1} cyclin-dependent kinase inhibitor." Am J Respir Cell Mol Biol **26**: 231-238.
- Tamma, S., X. Huang, et al. (2010). "4-1BB and CD28 signaling plays a synergistic role in redirecting umbilical cord blood T cells against B-cell malignancies." Hum Gene Ther **21**(1): 75-86.
- Teshima, T., R. Ordemann, et al. (2002). "Acute graft-versus-host disease does not require alloantigen expression on host epithelium." Nat Med **8**(6): 575-581.
- Thomas, E. D., C. D. Buckner, et al. (1977). "One hundred patients with acute leukemia treated by chemotherapy, total body irradiation, and allogeneic marrow transplantation." Blood **49**(4): 511-533.
- Tita-Nwa, F., G. Moldenhauer, et al. (2007). "Cytokine-induced killer cells targeted by the novel bispecific antibody CD19xCD5 (HD37xT5.16) efficiently lyse B-lymphoma cells." Cancer Immunol Immunother **56**(12): 1911-1920.
- Topp, M. S., P. Kufer, et al. (2011). "Targeted therapy with the T-cell-engaging antibody blinatumomab of chemotherapy-refractory minimal residual disease in B-lineage acute lymphoblastic leukemia patients results in high response rate and prolonged leukemia-free survival." J Clin Oncol **29**(18): 2493-2498.

- Tosi, D., R. Valenti, et al. (2004). "Role of cross-talk between IFN-alpha-induced monocyte-derived dendritic cells and NK cells in priming CD8+ T cell responses against human tumor antigens." *J Immunol* **172**(9): 5363-5370.
- Toubai, T., Y. Sun, et al. (2008). "GVHD pathophysiology: is acute different from chronic?" *Best Pract Res Clin Haematol* **21**(2): 101-117.
- Trapani, J. A. and M. J. Smyth (2002). "Functional significance of the perforin/granzyme cell death pathway." *Nat Rev Immunol* **2**(10): 735-747.
- Uderzo, C., V. Conter, et al. (2001). "Treatment of childhood acute lymphoblastic leukemia after the first relapse: curative strategies." *Haematologica* **86**(1): 1-7.
- USA. (2012). "United State."
from <http://www.seer.cancer.gov/statfacts/html/aly1.html>.
- Verneris, M. R., M. Ito, et al. (2001). "Engineering hematopoietic grafts: purified allogeneic hematopoietic stem cells plus expanded CD8+ NK-T cells in the treatment of lymphoma." *Biol Blood Marrow Transplant* **7**(10): 532-542.
- Verneris, M. R., M. Karami, et al. (2004). "Role of NKG2D signaling in the cytotoxicity of activated and expanded CD8+ T cells." *Blood* **103**(8): 3065-3072.
- Verneris, M. R., M. Kornacker, et al. (2000). "Resistance of ex vivo expanded CD3+CD56+ T cells to Fas-mediated apoptosis." *Cancer Immunol Immunother* **49**(6): 335-345.
- Wang, J., M. Jensen, et al. (2007). "Optimizing adoptive polyclonal T cell immunotherapy of lymphomas, using a chimeric T cell receptor possessing CD28 and CD137 costimulatory domains." *Hum Gene Ther* **18**(8): 712-725.
- Wang, P., J. P. Yu, et al. (2008). "Experimental study on the treatment of intracerebral glioma xenograft with human cytokine-induced killer cells." *Cell Immunol* **253**(1-2): 59-65.
- Wang, Y., H. Dai, et al. (2011). "Growth of human colorectal cancer SW1116 cells is inhibited by cytokine-induced killer cells." *Clin Dev Immunol* **2011**: 621414.
- Wassmann, B., U. Scheuring, et al. (2003). "Efficacy and safety of imatinib mesylate (Gleevec) in combination with interferon-alpha (IFN-alpha) in Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia (Ph+ALL)." *Leukemia* **17**(10): 1919-1924.
- Weisdorf, D. J. (2010). "How closely related is graft-vs-leukemia to donor/recipient disparity?" *Best Pract Res Clin Haematol* **23**(4): 525-528.
- Weisdorf, D. J., G. Nelson, et al. (2009). "Sibling versus unrelated donor allogeneic hematopoietic cell transplantation for chronic myelogenous leukemia: refined HLA matching reveals more graft-versus-host disease but not less relapse." *Biol Blood Marrow Transplant* **15**(11): 1475-1478.
- Welniak, L. A., B. R. Blazar, et al. (2000). "Opposing roles of interferon- γ on CD4⁺ T cell-mediated graft-versus-host disease: effects of conditioning." *Biol Blood Marrow Transplant* **6**: 604-612.
- Wilcox, R. A., A. I. Chapoval, et al. (2002). "Cutting edge: Expression of functional CD137 receptor by dendritic cells." *J Immunol* **168**(9): 4262-4267.
- Wongkajornsilp, A., T. Somchitprasert, et al. (2009). "Human cytokine-induced killer cells specifically infiltrated and retarded the growth of the inoculated human cholangiocarcinoma cells in SCID mice." *Cancer Invest* **27**(2): 140-148.
- Xue, S. A., L. Gao, et al. (2005). "Elimination of human leukemia cells in NOD/SCID mice by WT1-TCR gene-transduced human T cells." *Blood* **106**(9): 3062-3067.

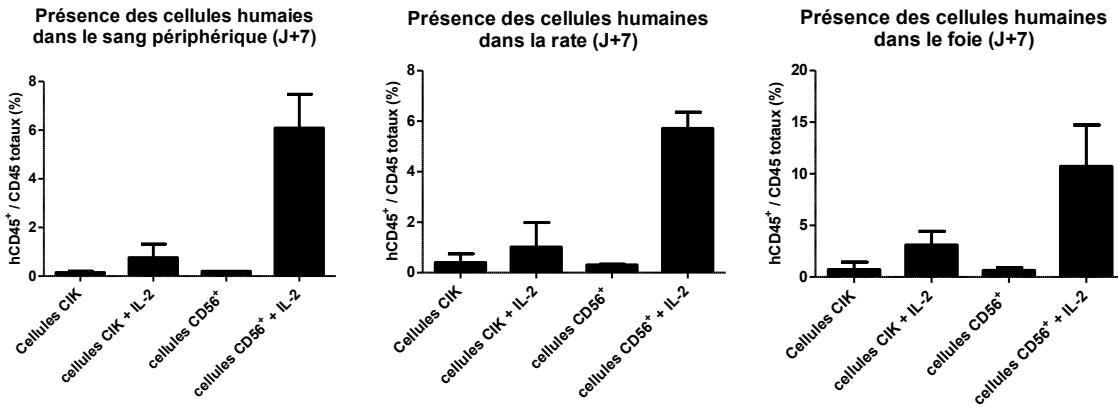
- Xun, C. Q., J. S. Thompson, et al. (1994). "Effect of total body irradiation, busulfan-cyclophosphamide, or cyclophosphamide conditioning on inflammatory cytokine release and development of acute and chronic graft-versus-host disease in H-2-incompatible transplanted SCID mice." Blood **83**(8): 2360-2367.
- Yamazaki, T., H. Akiba, et al. (2005). "Blockage of B7-H1 on macrophages suppresses CD4⁺ T cell proliferation by augmentation IFN- γ -induced nitric oxide production." J Immunol **175**: 1586-1592.
- Yang, B., X. C. Lu, et al. (2012). "Repeated transfusions of autologous cytokine-induced killer cells for treatment of haematological malignancies in elderly patients: a pilot clinical trial." Hematol Oncol **30**(3): 115-122.
- Yang, L., B. Ren, et al. (2013). "Enhanced antitumor effects of DC-activated CIKs to chemotherapy treatment in a single cohort of advanced non-small-cell lung cancer patients." Cancer Immunol Immunother **62**(1): 65-73.
- Yang, Y. G., B. R. Dey, et al. (1998). "Donor-derived interferon gamma is required for inhibition of acute graft-versus-host disease by interleukin 12." J Clin Invest **102**(12): 2126-2135.
- Yang, Y. G., J. Qi, et al. (2002). "Donor-derived interferon γ separates graft-versus-leukemia effects and graft-versus-host disease induced by donor CD8 T cells." Blood **99**: 4207-4215.
- Yang, Y. G., J. J. Sergio, et al. (1997). "Interleukin-12 preserves the graft-vs-leukemia effect of allogeneic CD8 T cells while inhibiting CD4-dependent graft-vs-host disease in mice." Blood **90**: 4651-4660.
- Yonehara, S., A. Ishii, et al. (1989). "A cell-killing monoclonal antibody (anti-Fas) to a cell surface antigen co-downregulated with the receptor of tumor necrosis factor." J Exp Med **169**(5): 1747-1756.
- Zhang, C., J. Niu, et al. (2008). "Opposing effects of interferon-alpha and interferon-gamma on the expression of major histocompatibility complex class I chain-related A in tumors." Cancer Sci **99**(6): 1279-1286.
- Zhang, H., Y. Cui, et al. (2011). "Activating signals dominate inhibitory signals in CD137L/IL-15 activated natural killer cells." J Immunother **34**(2): 187-195.
- Zhang, J., L. Zhu, et al. (2012). "The effects of cytokine-induced killer cells for the treatment of patients with solid tumors: a clinical retrospective study." J Cancer Res Clin Oncol **138**(6): 1057-1062.
- Zhang, Y., G. Joe, et al. (2005). "Alloreactive memory T cells are responsible for the persistence of graft-versus-host disease." J Immunol **174**(5): 3051-3058.
- Zhang, Y., G. Joe, et al. (2004). "Dendritic cell-activated CD44^{hi}CD8⁺ T cells are defective in mediating acute graft-versus-host disease but retain graft-versus-leukemia activity." Blood **103**(10): 3970-3978.
- Zhang, Y., J. P. Louboutin, et al. (2002). "Preterminal host dendritic cells in irradiated mice prime CD8⁺ T cell-mediated acute graft-versus-host disease." J Clin Invest **109**(10): 1335-1344.
- Zhong, R., J. Teng, et al. (2011). "Dendritic cells combining with cytokine-induced killer cells synergize chemotherapy in patients with late-stage non-small cell lung cancer." Cancer Immunol Immunother **60**(10): 1497-1502.

- Zhu, B. Q., S. W. Ju, et al. (2009). "CD137 enhances cytotoxicity of CD3(+)CD56(+) cells and their capacities to induce CD4(+) Th1 responses." Biomed Pharmacother **63**(7): 509-516.
- Ziske, C., A. Marten, et al. (2001). "Resistance of pancreatic carcinoma cells is reversed by coculturing NK-like T cells with dendritic cells pulsed with tumor-derived RNA and CA 19-9." Mol Ther **3**(1): 54-60.
- Zoll, B., P. Lefterova, et al. (1998). "Generation of cytokine-induced killer cells using exogenous interleukin-2, -7 or -12." Cancer Immunol Immunother **47**(4): 221-226.

ANNEXE

Influence de l'IL-2 lors de l'injection des cellules CIK dans les souris NSG

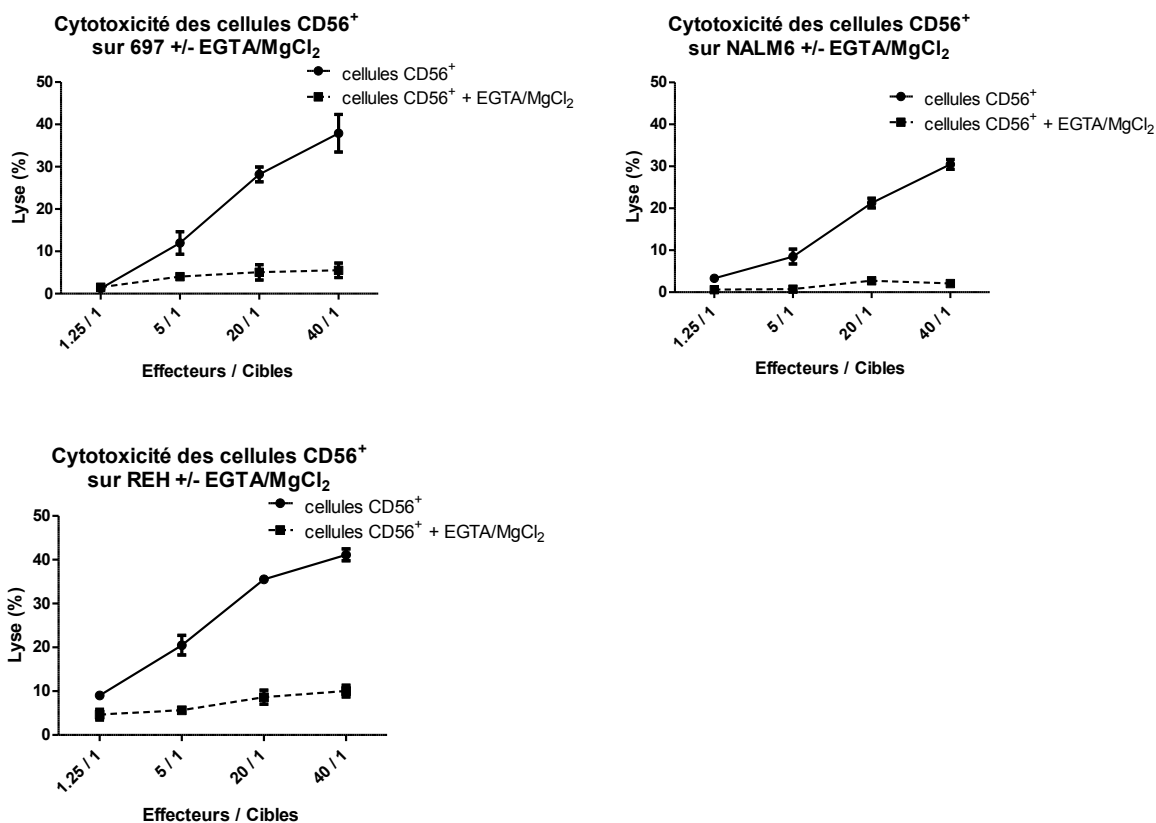
Figure 1



Les cellules CIK ont été expansées et différenciées à partir de cellules mononucléées de sang de cordon. Après différenciation, dix millions de cellules CIK ou de cellules CD56⁺ ont été injectées par intra-péritonéale dans le modèle de souris NSG. Les souris ont reçu au quotidien de l'IL-2 à 25000 unité, injectée en intra-péritonéale. Après sept jours post-injection, les souris ont été sacrifiées, puis le sang, la rate et le foie ont été récoltés et analysés pour la présence des cellules humaines (hCD45) en cytométrie en flux.

Activité cytotoxique des cellules CD56⁺ contre les lignées cellulaires pré-B LAL en présence ou absence de EGTA/MgCl₂

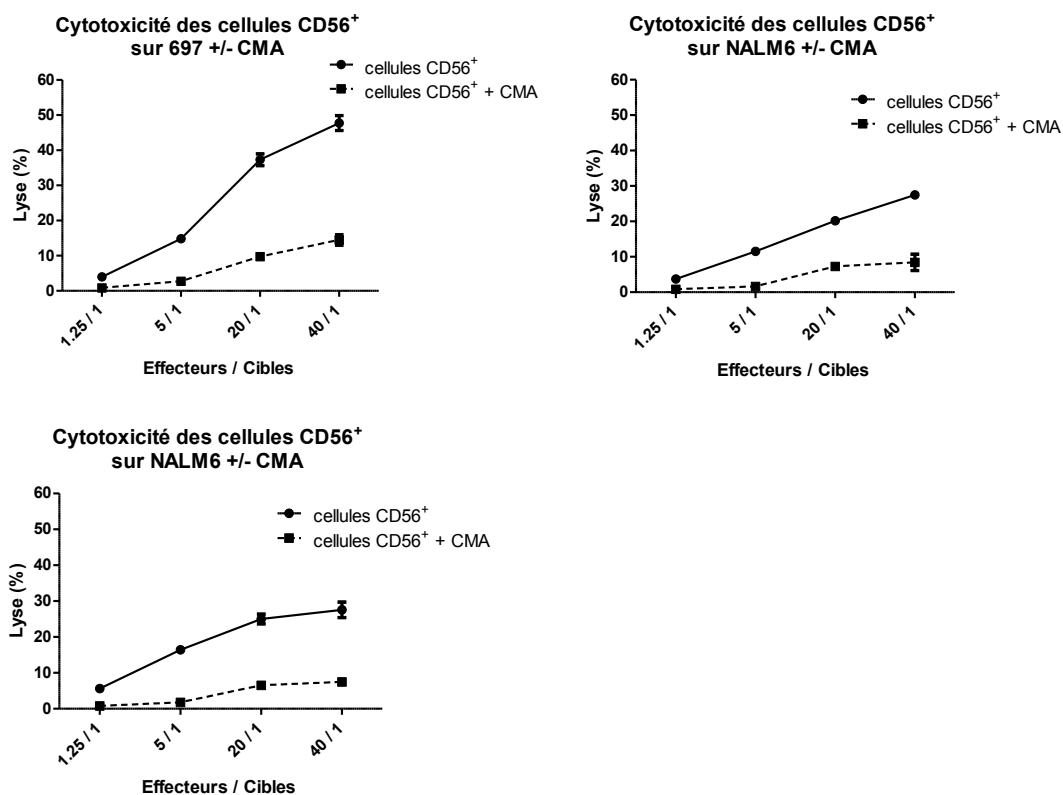
Figure 2



Les cellules CIK ont été amplifiées à partir de cellules mononuclées de sang de cordon, puis purifiées par l'anticorps anti-CD56 couplé avec une bille magnétique. Après purification, l'activité cytotoxique des cellules CD56⁺ a été testée sur trois lignées cellulaires pré-B LAL en présence ou absence de EGTA/MgCl₂ par la technique de relargage du chrome 51. La concentration de EGTA est de 6mM et celle de MgCl₂ est de 8mM.

Activité cytotoxique des cellules CD56⁺ contre les lignées cellulaires pré-B LAL en présence ou absence de Concanamycine A

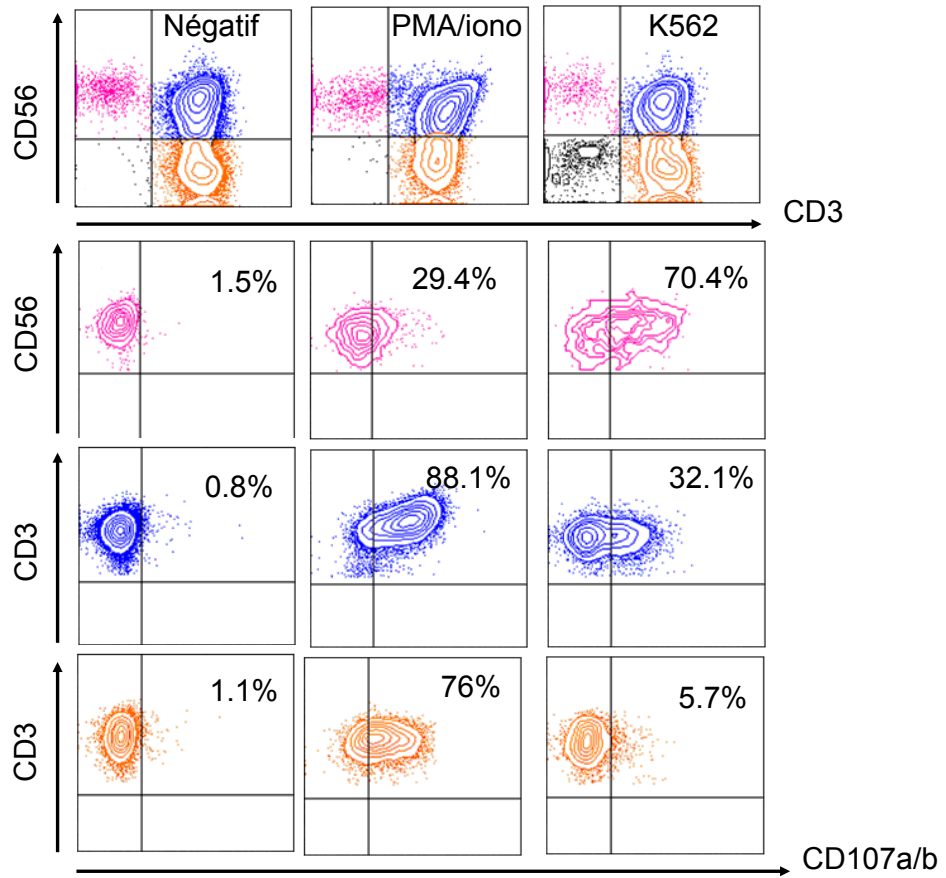
Figure 3

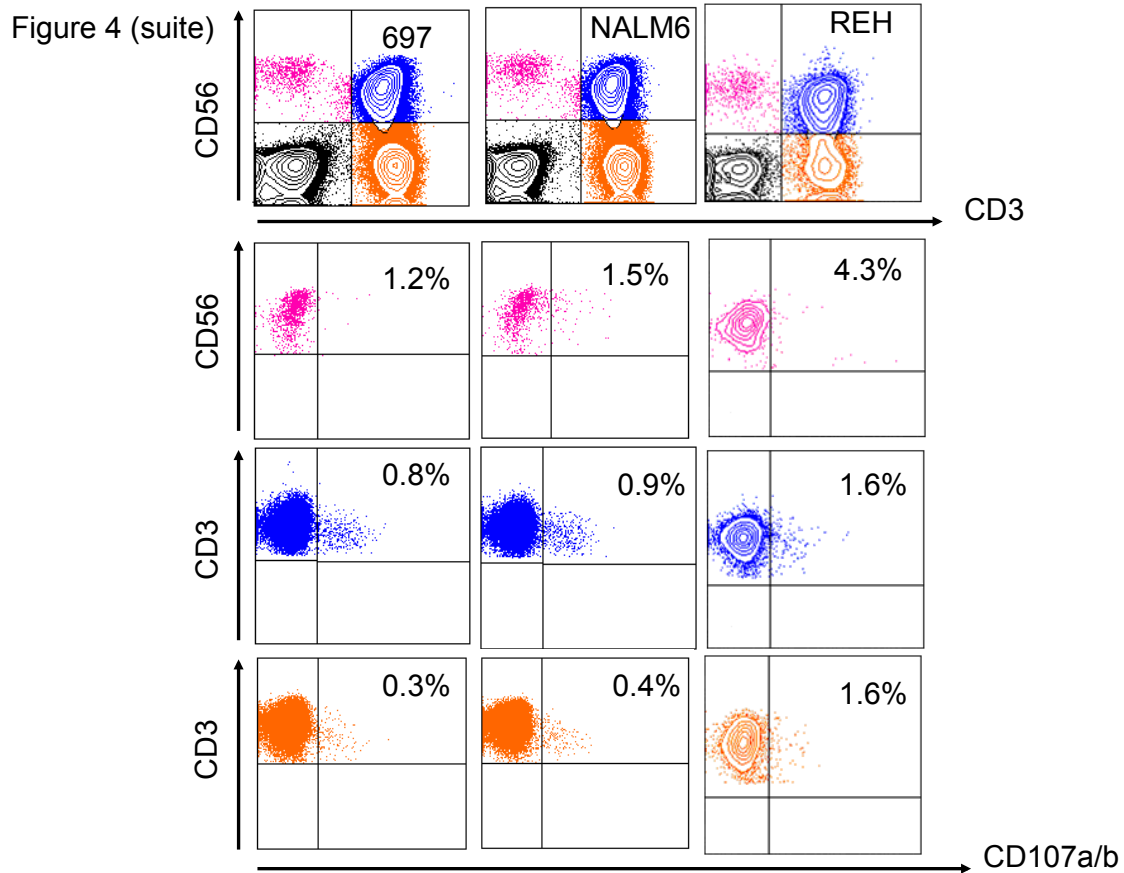


Les cellules CIK ont été amplifiées à partir de cellules mononuclées de sang de cordon, puis purifiées par l'anticorps anti-CD56 couplé avec une bille magnétique. Après purification, l'activité cytotoxique des cellules CD56⁺ a été testée sur trois lignées cellulaires pré-B LAL en présence ou absence de Concanamycine A par la technique de relargage de chrome 51. La concentration de Concanamycine A est de 230nM.

Dégranulation des cellules CIK contre les trois lignées cellulaires pré-B LAL

Figure 4



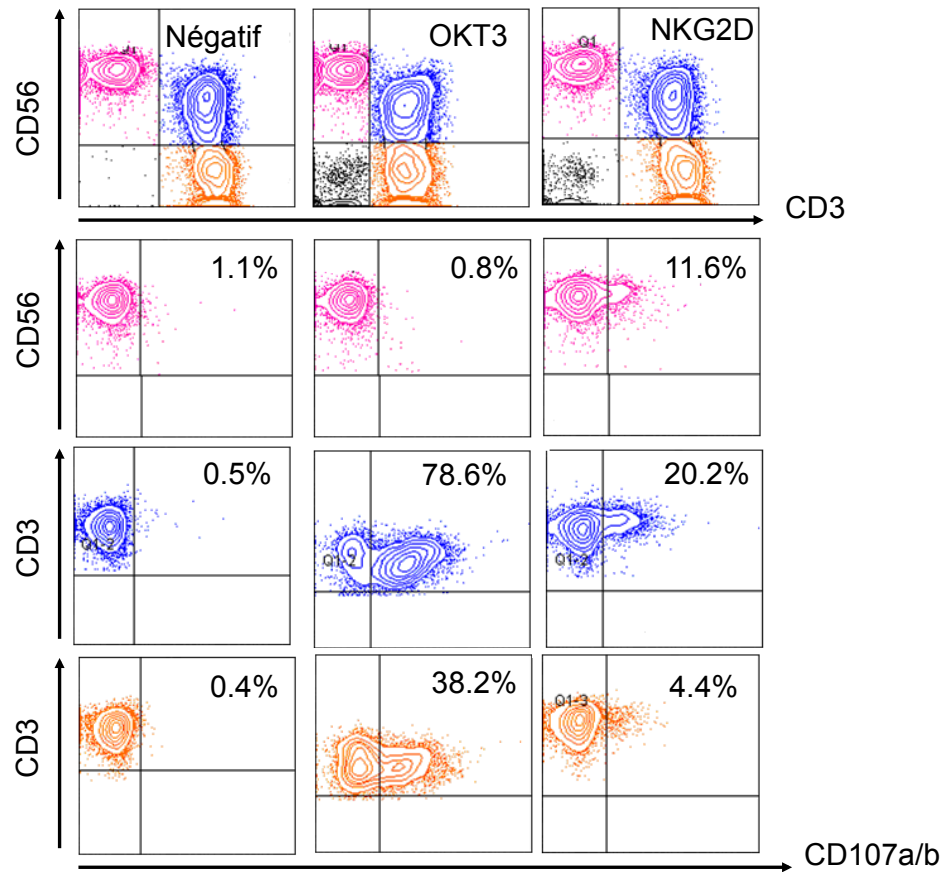


Les cellules CIK ont été amplifiées à partir de cellules mononucléées de sang de cordon, puis testées pour leur capacité à dégranuler contre les trois lignées cellulaires pré-B LAL (697, NALM6 et REH). À la fin de la culture, les cellules CIK ont été mises en présence des cellules 697, NALM6 et REH au ratio 1:1 (une cellule CIK pour une cellule cible) pendant 4 heures. Au moment de la mise en culture des cellules CIK avec les cellules cibles, les anticorps anti-CD107a et anti-CD107b ont été ajoutés (marqueurs permettant de visualiser la dégranulation). Après une heure de co-culture, le golgi Stop (monensine) a été ajouté (molécule permettant de bloquer dans cette expérience le recyclage des récepteurs exprimés en surface). Après les 4 heures de co-culture, les cellules ont été récupérées, lavées et marquées avec les anticorps anti-CD3 et anti-CD56, puis analysées en cytométrie en flux. Un

contrôle négatif a été ajouté afin de visualiser la dégranulation spontanée (cellules CIK mises en culture toutes seules), et deux contrôles positifs afin de vérifier que les cellules CIK sont capables de dégranuler (PMA/ionomycine (concentration de PMA: 2,5 ug/ml ; concentration de ionomycine: 0,5 ug/ml), et la lignée K562).

Capacité de dégranulation des cellules CIK à travers les récepteurs CD3 et NKG2D

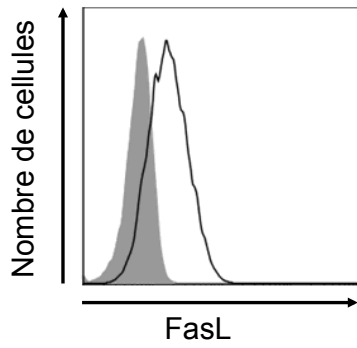
Figure 5



Les cellules CIK ont été différenciées et amplifiées à partir de cellules mononucléées, puis testées pour leur capacité à dégranuler à travers les récepteurs CD3 et NKG2D. À la fin de la culture, les cellules CIK ont été mises en culture avec l'anticorps anti-NKG2D ou anti-CD3 ou pas d'anticorps pendant 30 minutes. Les cellules P815 (possédant des récepteurs pouvant intercepter le Fc des anticorps) ont été ajoutées aux cellules CIK à un ratio 1:1 (une cellule CIK pour une cellule P815) avec les anticorps anti-CD107a et anti-CD107b. Après 4 heures de co-culture, les cellules ont été récupérées, lavées et marquées avec les anticorps anti-CD3 et anti-CD56, puis analysées en cytométrie en flux.

Expression de Fas ligand sur les cellules K562

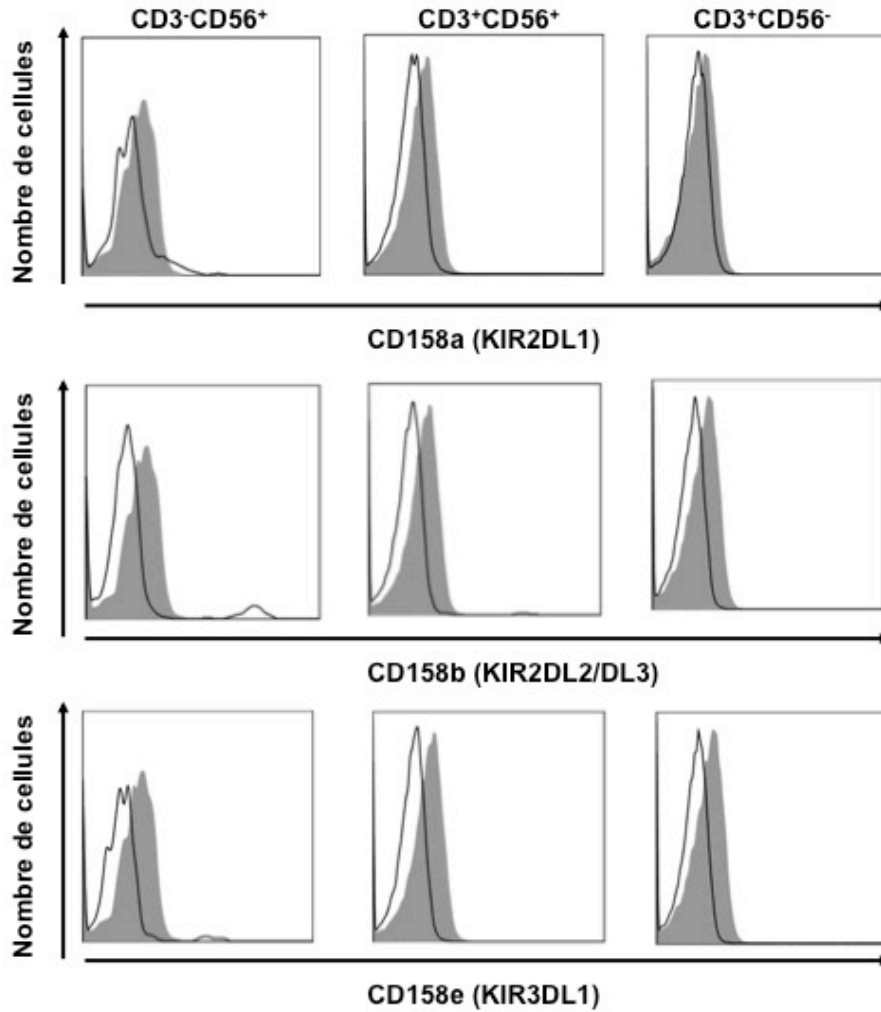
Figure 6



Les cellules K562 ont été marquées avec un anticorps isotypique (contrôle négatif en gris) ou avec un anticorps anti-FasL (ligne noire). Après marquage, les cellules ont été analysées en cytométrie en flux.

Expression des récepteurs KIR sur les cellules CB-CIK

Figure 7



Après amplification, les cellules CB-CIK ont été marquées avec les anticorps CD3, CD56 et CD158a ou CD158b ou CD158e. Les différentes sous-populations des cellules CB-CIK ont été sélectionnées et analysées pour les récepteurs KIR (CD158a, CD158b, et CD158e). Le contrôle isotypique est représenté en gris et le marquage avec l'anticorps anti-KIR d'intérêt est représenté en noir. Le Marquage a été analysé en cytométrie de flux.